UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**A quimioluminescência na quantificação da penetração de
componentes antioxidantes do extrato de açaí na pele**

Mirela Mara de Oliveira Lima Leite Vaz

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**A quimioluminescência na quantificação da penetração de
componentes antioxidantes do extrato de açaí na pele**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Mirela Mara de Oliveira Lima Leite Vaz

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

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 27/09/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

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.

Vaz, Mirela Mara de Oliveira Lima Leite

A quimioluminescência na quantificação da penetração de componentes antioxidantes do extrato de açaí na pele. Ribeirão Preto, 2013.
77 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira.

1. Açaí. 2. Antioxidantes. 3. Formulações tópicas. 4. Penetração cutânea. 5. Quimioluminescência. 6. Radiação UV.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mirela Mara de Oliveira Lima Leite Vaz

A quimioluminescência na quantificação da penetração de componentes antioxidantes do extrato de açaí na pele.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos
meus pais, Paulo e Ana
Maria e à minha irmã
Maíta.*

Agradecimientos

À minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca, pela oportunidade, incentivo, compreensão, por sempre se mostrar tão presente e ainda por seus preciosos ensinamentos;

Aos amigos do laboratório Ana Luiza, Daniele, Fernanda, Frederico, Rodrigo, Sílvia e Sônia, que conviveram comigo durante esses anos e que sempre foram muito generosos;

À Rebeca Oliveira de Souza, por me acolher desde o primeiro momento, por colaborar com meu trabalho e por se tornar essa amiga tão querida;

Ao técnico do laboratório de Controle de Qualidade, José Roberto Jabor, pela dedicação, paciência e amizade;

Aos técnicos Aninha e Luisão pelo auxílio prestado;

Aos professores Dr. Augusto Cesar Cropanese Spadaro, Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopes e Dr^a. Yara Maria Lucisano Valim e seus técnicos por disponibilizarem o uso de equipamentos indispensáveis para a realização desse trabalho;

À professora Dr^a. Marilisa Guimarães Lara pela valiosa contribuição dada a esse trabalho;

À empresa Amazon Dreams pelo fornecimento do extrato de *Euterpe oleracea* estudado, em especial ao Dr. Herve Rogez;

A todos os funcionários da FCFRP-USP, tanto da seção de pós-graduação, quanto da portaria ou copa pelo auxílio, eficiência e pelos bons momentos de convivência;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido;

A todos os meus amigos, pela amizade, força, carinho e por sempre se fazerem presentes;

Ao Rafael, pelo amor, paciência, incentivo e por estar ao meu lado nessa etapa tão importante;

À minha irmã Maíta, que eu tanto amo, pela amizade, companheirismo e por cuidar de mim em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais pelo amor incondicional, dedicação, apoio e por tudo o que representam para mim. Sem vocês nada disso seria possível;

A Deus, por me proteger, iluminar e por colocar anjos tão especiais na minha vida;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

*“Grandes realizações são
possíveis quando se dá
importância aos pequenos
começos”.*

Lao-Tsé

RESUMO

VAZ, M. M. O. L. L. **A quimioluminescência na quantificação da penetração de componentes antioxidantes do extrato de açaí na pele.** 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A exposição excessiva às radiações UV é capaz de limitar a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em nosso organismo, provocando o estresse oxidativo. Assim, extratos vegetais ricos em compostos antioxidantes são fortes candidatos a serem veiculados em formulações tópicas para a prevenção ou tratamento dos danos causados pela RUV na pele. Dentre a gama de extratos vegetais com atividade biológica, o extrato de açaí, fruto da espécie *Euterpe oleracea* Mart., tem se destacado por apresentar grande quantidade de antioxidantes na sua composição. Geralmente, a quantidade de ativos que consegue penetrar na pele é pequena, exigindo métodos analíticos muito sensíveis. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego do método de quimioluminescência para a quantificação da penetração dos componentes do extrato de açaí na pele por medida da atividade antioxidante. Os resultados mostraram que o IC₅₀ do extrato de açaí para o ensaio de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase foi de 0,63 µg/mL. Além disso, a quantificação do extrato de açaí utilizando esse método foi possível para porcentagens de inibição obtidas até o valor de 60%. Ainda, esse método mostrou-se preciso e exato na determinação da porcentagem de inibição da quimioluminescência do extrato de açaí na concentração próxima a IC₅₀, sendo essa inibição não influenciada pelos componentes das diferentes formulações estudadas. No entanto, o uso da quimioluminescência como um método de quantificação da penetração de componentes antioxidantes de extratos hidrossolúveis torna o processo de extração desses componentes da pele um fator importante, no qual a escolha do solvente extrator é um ponto crítico. Assim, o solvente extrator escolhido para a realização dos estudos de penetração/retenção cutânea foi metanol:água (80:20), visto que esse solvente foi capaz de extrair os componentes antioxidantes do extrato de açaí sem retirar grande quantidade dos compostos inerentes da pele com atividade antioxidante. Por fim, a determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase mostrou-se um método importante na medida da atividade antioxidante de extratos na pele. Ainda, esse método foi eficaz na quantificação do extrato de açaí nos estudos de penetração/retenção com célula de difusão vertical, apesar de todos os erros inerentes desse método.

Palavras-chave: açaí, antioxidantes, formulações tópicas, penetração cutânea, quimioluminescência, radiação UV.

ABSTRACT

VAZ, M. M. O. L. L. **The employment of chemiluminescence to quantify the penetration of the açai extract antioxidant components in the skin.** 2013. 77 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The excessive exposure to UV radiation is able to decrease the antioxidant defense systems in the skin leading to the oxidative stress. Thus, plant extracts, rich in antioxidant compounds, are strong candidates to be added in topical formulations for the prevention or treatment of UV radiation induced damages. Among the range of plant extracts with biological activity, the extract of açai, fruit of the *Euterpe oleracea* Mart. species has become known due to the considerable amount of antioxidants in its composition. Generally, the amount of active compounds that can penetrate in the skin is low requiring sensitive analytical methods. Thus, the present study aimed to evaluate the use of chemiluminescence assay for the quantification of the penetration of açai extract components in the skin by measuring the antioxidant activity. The results showed an IC₅₀ value of 0.63 µg/mL for the antioxidant activity determined by chemiluminescence assay using the xanthine/luminol/xanthine oxidase system. Moreover, the quantification of acai extract using this method was possible for percentages of inhibition obtained until the 60% of inhibition value. Additionally, this method proved to be precise and accurate in determining the percentage of chemiluminescence inhibition of acai extract at concentrations values close to the IC₅₀ value. Additionally, it was observed that the inhibition was not influenced by the different components of the formulations studied. However, the use of chemiluminescence assay to quantify the penetration of water-soluble extract antioxidant components makes the extraction process of these components from the skin an important step in which the selection of the extractor solvent is a critical point. In the present study it was selected methanol:water (80%) as an organic extractor solvent which was able to extract the antioxidant components of the acai extract without removing large amounts of inherent compounds of the skin with antioxidant activity. Finally, the determination of the chemiluminescence generated in the xanthine/luminol/xanthine oxidase system inhibition showed to be an important method for the measurement of the antioxidant activity of plant extracts in the skin. Still, this method was effective in quantifying the acai extract in cutaneous penetration/retention studies using vertical diffusion cells despite all the intrinsic errors of this used method.

Keywords: acai, antioxidants, topical formulations, cutaneous penetration, chemiluminescence, UV radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palmeira <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (açazeiro).....	3
Figura 2. Diferentes mecanismos que levam a uma reação de quimioluminescência, sendo que A= substrato, B= oxidante, P= produto, P*= produto no estado excitado, F= fluoróforo, F*= fluoróforo no estado excitado, $h\nu$ = emissão de radiação.....	8
Figura 3. Representação esquemática da reação xantina/xantina oxidase (XOD)/luminol.....	10
Figura 4. Célula de difusão vertical do tipo Franz.....	24
Figura 5. Curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase em função da concentração de extrato de açaí (E).....	32
Figura 6. Faixa linear da curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase em função da quantidade de extrato de açaí (E) no meio reacional.....	33
Figura 7. Porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para o extrato de açaí não veiculado (E) e o adicionado às formulações (F).....	37
Figura 8. Porcentagens de inibição da quimioluminescência das soluções obtidas empregando diferentes solventes extratores, em que Amostra = pele adicionada de extrato de açaí; Controle negativo = somente a pele extraída; Controle positivo = pele extraída adicionada de extrato na mesma concentração da amostra (IC_{50}) e Extrato = solução de extrato preparada na mesma concentração da amostra (IC_{50}).....	41
Figura 9. Porcentagens de inibição da quimioluminescência das soluções obtidas na avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí no estrato córneo.....	48
Figura 10. Quantidade de extrato de <i>Euterpe oleracea</i> retida na epiderme viável e derme, proporcionada por formulação gel-creme adicionada de diferentes quantidades de extrato nos estudos de penetração/retenção, em que E = extrato de <i>Euterpe oleracea</i>	53

Figura 11. Quantidade de extrato de *Euterpe oleracea* retida na epiderme viável e derme, proporcionada por diferentes formulações adicionadas de 1% de extrato nos estudos de penetração/retenção, em que E = extrato de *Euterpe oleracea*..... 57

Figura 12. Quantidade de extrato de *Euterpe oleracea* retida no estrato córneo proporcionada por diferentes formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí, em que E = extrato de *Euterpe oleracea*..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações adicionadas de extrato de <i>Euterpe oleracea</i>	18
Tabela 2. Quantidades de extrato de açaí (E) e suas porcentagens de inibição da quimioluminescência abaixo de 60% de inibição.....	33
Tabela 3. Porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas pela solução de extrato de açaí a 0,6 µg/mL do meio reacional e porcentagem de inibição esperada para solução de extrato de mesma concentração, de acordo com a IC ₅₀	38
Tabela 4. Recuperações das porcentagens de inibição da quimioluminescência do extrato adicionado na pele em diferentes quantidades.....	46
Tabela 5. Porcentagens de inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme após estudo de penetração de formulações gel-creme adicionadas de diferentes quantidades de extrato de açaí e de formulações gel-creme placebo.....	50
Tabela 6. Porcentagens de inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme após estudo de penetração de formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí e de suas formulações placebo.....	55
Tabela 7. Porcentagens de inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme após estudo de penetração de formulação gel-creme adicionada de 1% de extrato de açaí e de formulação gel-creme placebo.....	59
Tabela 8. Porcentagens de inibição da quimioluminescência no estrato córneo após estudo de penetração de formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µg/cm ²	Micrograma por centímetro quadrado
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Substrato
A	Amostra
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
B	Oxidante
C	Carbono
CLAE	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
cm ²	Centímetros quadrados
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH [*]	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
E	Extrato de <i>Euterpe oleracea</i>
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EQ	Equivalente de quercetina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F	Fluoróforo
F	Formulação
F [*]	Fluoróforo no estado excitado
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
G	Gramas

GSH	Glutathiona reduzida
$H^\bullet$	Hidrogênio radicalar
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
$HO^\bullet$	Radical hidroxila
<i>Hv</i>	Emissão de radiação
IC ₅₀	Concentração que inibe 50%
IQ	Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mg	Miligramas
um	Miliunidade
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetros
$NO^\bullet$	Óxido nítrico
1O_2	Oxigênio singlete
O_2	Oxigênio
O_2^-	Superóxido
OH^-	Hidroxila
$OH^\bullet$	Radical hidroxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito
P	Placebo
P*	Produto no estado excitado
PA	Pará
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinila
R	Coeficiente de correlação linear

RNA	Ácido ribonucleico
RO [•]	Radical alcoxila
RO ₂ [•]	Radical peroxila
ROOH	Hidroperóxido
RPM	Rotações por minuto
RUV	Radiação ultravioleta
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UFPA	Universidade Federal do Pará
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	vi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Material e Métodos.....	14
3.1. Obtenção do extrato de açaí.....	14
3.2. Caracterização química do extrato de açaí.....	14
3.2.1. Determinação do teor de polifenóis totais.....	14
3.2.2. Determinação do teor de flavonoides totais.....	15
3.3. Determinação da atividade antioxidante do extrato de açaí.....	15
3.3.1. Determinação da atividade doadora de H [•] ao radical DPPH [•]	16
3.3.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	16
3.3.3. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase.....	17
3.4. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção <i>in vitro</i> de formulações adicionadas de extrato de açaí.....	18
3.4.1. Elaboração de formulações tópicas adicionadas de extrato de açaí.....	18
3.4.2. Verificação da interferência dos componentes das formulações adicionadas de extrato de açaí na medida da atividade antioxidante por quimioluminescência.....	19
3.4.3. Utilização da quimioluminescência para avaliar a penetração/retenção <i>in vitro</i>	20
3.4.3.1. Obtenção da pele.....	20
3.4.3.2. Escolha do solvente para extração dos componentes antioxidantes do extrato de açaí retidos na epiderme viável e derme.....	20

3.4.3.3. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados na epiderme viável e derme.....	21
3.4.3.4. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados no estrato córneo.....	22
3.4.3.5. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção <i>in vitro</i>	23
3.4.3.5.1. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de uma formulação adicionada de diferentes quantidades de extrato de açaí.....	24
3.4.3.5.2. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí.....	25
3.4.3.5.3. Quantificação por quimioluminescência de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí retidos no estrato córneo.....	26
3.5. Cálculo do valor de IC ₅₀ e análise estatística dos resultados.....	26
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1. Caracterização química do extrato de açaí.....	28
4.1.1. Determinação do teor de polifenóis totais.....	28
4.1.2. Determinação do teor de flavonoides totais.....	28
4.2. Determinação da atividade antioxidante do extrato de açaí.....	29
4.2.1. Determinação da atividade doadora de H• ao radical DPPH•.....	29
4.2.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	30
4.2.3. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase.....	31
4.3. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção <i>in vitro</i> de formulações adicionadas de extrato de açaí.....	35
4.3.1. Elaboração de formulações tópicas adicionadas de extrato de açaí.....	35
4.3.2. Verificação da interferência dos componentes das formulações adicionadas de extrato de açaí na medida da atividade antioxidante por quimioluminescência.....	36

4.3.3. Utilização da quimioluminescência para avaliar a penetração/retenção <i>in vitro</i>	38
4.3.3.1. Escolha do solvente para extração dos componentes antioxidantes do extrato de açaí retidos na pele.....	39
4.3.3.2. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados na epiderme viável e derme.....	45
4.3.3.3. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados no estrato córneo.....	47
4.3.3.4. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção <i>in vitro</i>	48
4.3.3.4.1. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de uma formulação adicionada de diferentes quantidades de extrato de açaí.....	49
4.3.3.4.2. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí.....	54
4.3.3.4.3. Quantificação por quimioluminescência de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí retidos no estrato córneo.....	61
5. Conclusões.....	67
6. Referências.....	70

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Terra recebe constantemente a radiação solar, sendo 56% na forma de ondas eletromagnéticas infravermelhas (780 a 5000 nm), 39% na forma de luz visível (400 a 780 nm) e 5% como radiação ultravioleta (200 a 400 nm). A radiação ultravioleta (RUV) emitida pelo sol é composta por três tipos de energia conhecida: UVC (200 a 280 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVA (320 a 400 nm). A radiação UVC, por ser a mais energética, é a mais prejudicial biologicamente, entretanto, ela 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 agem diferentemente quanto aos sítios de ação na geração de suas lesões no corpo. Os raios UVB são mais energéticos que os raios UVA e podem induzir lesões diretamente no DNA. Já os raios UVA são menos energéticos, mas ainda assim são danosos por apresentarem maior capacidade de penetração, sendo que o seu principal modo de ação se dá através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), estruturas altamente oxidantes (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

A pele humana está exposta a um elevado estresse oxidativo como poucos tecidos do nosso corpo estão sujeitos ao longo da vida. Diferentes fontes exógenas de estresse agem sobre ela podendo levar seus efeitos nocivos à intimidade das estruturas celulares que a compõe. Sendo assim, inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos apresentam potencial para lesioná-la induzindo a formação de EROs. Dentre os agentes causadores desses efeitos deletérios, a RUV e a poluição merecem destaque (MELONI; NICOLAY, 2003).

Nesse aspecto particular, os efeitos da RUV na pele vem sendo largamente estudados. Essa radiação proveniente da energia solar é absorvida pelos cromóforos celulares como DNA, RNA, melanina, proteínas, NADP/NAPH, porfirina, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos, que ao absorverem essa energia, tornam-se energizados. Esses cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração das EROs, dentre as quais pode-se destacar os radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e superóxido (O_2^-), os radicais peroxila e alcóxila ($\text{RO}_2^\bullet$ e $\text{RO}^\bullet$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH). Além das EROs, com importância biológica significativa, também estão envolvidas em processos redox as espécies reativas de enxofre e de nitrogênio,

destacando-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o peroxinitrito (ONOO^-) (GUARANTINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; XU; FISHER, 2005).

Para se proteger, a célula possui um sistema de defesa que é responsável pelo equilíbrio entre a formação de EROs e o número de agentes antioxidantes existente nesse tecido. A maior parte desses agentes está presente no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Sendo assim, sob tensão normal de oxigênio esses mecanismos de defesa antioxidantes são suficientes para remover os radicais livres produzidos. No entanto, em condições adversas, a concentração de radicais livres pode aumentar incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante no organismo, em favor do primeiro, levando ao estresse oxidativo do tecido cutâneo, estrutura bastante susceptível aos danos provocados pela RUV (SIERENS et al., 2001). Nesses casos, as EROs podem reagir com as moléculas orgânicas, provocando a perda da integridade celular, da funcionalidade enzimática e da estabilidade genômica (MEAGHER; FITZGERALD, 2000). Dentre as moléculas orgânicas, os lipídios são, provavelmente, as mais susceptíveis a serem atacadas pelas EROs (INAL; KANBAK; SUNAL, 2001), pois as membranas biológicas contêm consideráveis quantidades de lipídios altamente insaturados e são banhadas por fluidos ricos em oxigênio e metal (BUEGE; AUST, 1978).

A partir desses estudos que mapearam com detalhes os complexos processos metabólicos que levam os tecidos biológicos ao estresse oxidativo, a ciência dedica atualmente seus recursos humanos, financeiros e tecnológicos para encontrar as soluções que visam impedir, amenizar, ou retardar os efeitos decorrentes desses processos deletérios, auxiliando e reforçando o sistema de defesa celular naturalmente existente.

Nesse sentido, o uso de compostos antioxidantes presentes em extratos vegetais, que desde a antiguidade são empiricamente utilizados na medicina popular, tem recebido considerável atenção, sendo eles fortes candidatos a serem veiculados em formulações tópicas para a prevenção ou tratamento dos danos causados pela RUV na pele.

Dentre a enorme gama de extratos vegetais com atividade biológica, o extrato de açaí, fruto da espécie *Euterpe oleracea* Mart., tem se destacado por apresentar grande quantidade de substâncias antioxidantes na sua composição (SCHAUSS et al., 2006 (a); SCHAUSS et al., 2006 (b)).

A espécie *Euterpe oleracea* Mart. (Figura 1), conhecida como açazeiro, é uma palmeira de grande porte nativa da Amazônia brasileira, encontrada espontaneamente nos estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins e principalmente no Pará, podendo ser vista também em países da América do Sul e América Central. Sua ocorrência é mais densa na região do estuário do Rio Amazonas, visto que essa árvore tem como habitat áreas úmidas e de elevadas temperaturas (NOGUEIRA et al., 2006).

Figura 1. Palmeira *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro).

Esta palmeira, pertencente à família Arecaceae, e à sub-família Ceroxylineae, é a maior fonte de palmito no Brasil, sendo que a maior parte da produção é destinada à exportação. O palmito é removido cortando-se o estipe da palmeira, que nessa espécie é ramificado. Esta característica permite que o açazeiro regenere rapidamente após a extração do palmito, permitindo sua exploração sustentada (JARDIM & ANDERSON, 1987; HENDERSON & GALEANO, 1996).

O açaí é arredondado, possui coloração roxa escura e pesa cerca de 2 gramas, porém somente 17% dele corresponde à parte comestível (OLIVEIRA, 2002). O despulpamento do fruto, realizado manual ou mecanicamente, resulta em um suco viscoso consumido em uma variedade de bebidas e preparações alimentares pelas populações de origem ribeirinha. Além disso, o óleo presente no

açaí tem sido usado como agente anti diarreico na medicina rural (SCHAUSS, et al., 2006 (a)). Durante os últimos anos, a demanda pela polpa do açaí por países da América do Norte, Europa e Japão tem aumentado bastante devido ao seu sabor exótico e aos efeitos benéficos à saúde, destacando-se seu conhecido potencial antioxidante (HEINRICH et al., 2010).

Estudos da composição fitoquímica e nutricional da polpa do açaí revelaram um alto conteúdo de polifenóis, principalmente antocianinas, proantocianidinas e outros flavonoides. As antocianinas mais predominantes encontradas são cianidina-3-o-glucosídeo e cianidina-3-o-rutinosídeo. Dentre as proantocianidinas, as mais importantes são epicatequina, catequina e polímeros, estando esses em maior quantidade. Do total de ácidos graxos presentes, 74% são ácidos graxos insaturados, destacando-se os ácidos oléico e linoléico (SCHAUSS et al., 2006 (b)). Na polpa do açaí estão presentes também grandes quantidades de vitamina E, fibras, manganês, cobre, boro, cromo, e ainda cálcio, magnésio, potássio e níquel, transformando-o em um dos frutos mais nutritivos da Amazônia (ROGEZ, et al., 2000).

Assim, a incorporação do extrato de açaí em formulações tópicas visando prevenir ou tratar a pele dos prejuízos causados pela RUV, torna-se muito interessante. No entanto, para o desenvolvimento de formulações tópicas, é importante conhecer a estrutura da pele e o modo como as substâncias podem penetrá-la (BERTOLINI, 2009).

A pele apresenta estruturas altamente complexas, compostas por três diferentes camadas, que desempenham funções específicas e distintas. São elas: a hipoderme, camada mais profunda, a derme, intermediária, e a epiderme, camada superior. Cada uma delas é constituída por diferentes moléculas de defesa, sendo que a susceptibilidade ao estresse oxidativo e a função de cada uma dessas camadas se diferem umas das outras (KOHEN & GATI, 2000).

A hipoderme é composta pelo tecido adiposo e conjuntivo, servindo de suporte e união com os órgãos subjacentes. Situa-se abaixo do sistema vascular, localizado na derme (BERTOLINI, 2009).

A derme constitui-se de tecido conjuntivo composto de fibroblastos, fibras colágenas e reticulíneas, na qual se situam os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Situa-se acima de hipoderme (BARRY, 1983; CHIEN, 1992).

A epiderme é a camada mais externa da pele. É um tecido estratificado queratinizado, composto por queratinócitos, melanócitos e células de Merkel, sendo um local de renovação celular contínua. É dividida em epiderme viável, parte mais interna, e no estrato córneo, que constitui a parte externa (BERTOLINI, 2009).

O estrato córneo é a interface do organismo com o meio ambiente. É composto por proteínas dispersas em uma matriz lipídica, cuja espessura varia de espécie para espécie e de região para região do corpo no mesmo indivíduo. Essa organização, que faz com que essa camada exerça a função de barreira contra o meio externo, é o principal obstáculo à permeação de ativos (VICENTINI, 2009).

Normalmente, a absorção de ativos através da pele ocorre de forma passiva. As principais rotas de penetração através do estrato córneo são: via transcelular, na qual o ativo passa diretamente através das células e da matriz lipídica intercelular; via intercelular, que envolve a difusão do ativo por entre as células, permanecendo na matriz lipídica; e via apêndices, na qual o ativo pode penetrar através dos folículos pilosos e ductos sudoríparos, porém como esses anexos ocupam somente pequena parte da pele, a contribuição dessa via é pequena (ANSEL et al., 1999).

Ao aplicar uma formulação na pele, uma série de eventos deve ocorrer para que a substância ativa atinja o local desejado. O ativo precisa difundir da formulação em direção à pele, particionar entre a formulação e o estrato córneo, onde pode se ligar a um sítio de depósito ou passar para a epiderme viável. Na epiderme viável, o ativo pode ser metabolizado ou interagir com o seu receptor, tendo, dessa forma, uma ação tópica. O fármaco pode, também, atravessar a derme e sofrer metabolização, se ligar a um sítio de depósito ou ser removido pela circulação sistêmica. Pode ocorrer ainda, de uma parte do fármaco atingir a hipoderme, dando origem a outro depósito, ou penetrar camadas musculares mais profundas (AULTON, 2005).

Para uma substância ser absorvida por difusão passiva através da pele, é necessário ter solubilidade, coeficiente de difusão e partição adequados, ter certa lipofilicidade e possuir massa molecular relativamente baixa, dentre outras propriedades. Quanto maior a concentração do ativo na formulação, maior será o gradiente de difusão. Assim, a solubilidade do ativo na formulação é de grande importância, uma vez que caso o ativo seja pouco solúvel na formulação, não será possível sua incorporação em grandes quantidades. Ainda, a substância ativa deve ter maior afinidade pelo estrato córneo do que pelo veículo, facilitando a partição da

interface para a pele. Além disso, quanto menor for o tamanho da molécula do fármaco, mais fácil será sua penetração através da pele (OLIVEIRA, 2007; BERTOLINI, 2009).

Da mesma forma, as características físico-químicas dos componentes que irão compor a formulação são decisivas e devem ser muito bem avaliadas. A absorção de ativos parece ser aumentada por veículos que se espalham facilmente sobre a superfície da pele e misturam-se rapidamente com o sebo do estrato córneo, colocando a substância ativa em contato com as células dessa camada da pele. Compostos voláteis presentes na formulação, tendem a evaporar com o espalhamento do veículo na pele, o que irá mudar o ambiente de partição e pode resultar em precipitação do ativo, ou mesmo alterar o potencial de partição entre o veículo e o estrato córneo. Componentes da formulação podem entrar ou ocluir as camadas do estrato córneo, dificultando a difusão do fármaco. Por outro lado, substâncias que hidratem e intumescam, ou então que desestruem a bicamada lipídica desse tecido, podem promover uma melhor difusão da substância ativa (OLIVEIRA, 2007; BERTOLINI, 2009).

Normalmente, o tratamento tópico visa produzir concentrações adequadas do ativo no tecido alvo e baixas concentrações sanguíneas. Isso porque a substância ativa, em contato com a parede dos vasos sanguíneos, é rapidamente absorvida pela corrente sanguínea, o que pode resultar em efeitos sistêmicos indesejados. Assim, para que substâncias que objetivem uma ação tópica exerçam sua atividade, como os antioxidantes, deve haver uma boa penetração e retenção dessas na pele, com mínimos níveis de permeação para os vasos sanguíneos (OLIVEIRA, 2007).

A fim de avaliar se o objetivo proposto pela formulação desenvolvida foi alcançado, a realização de estudos *in vitro* em que são utilizadas células de difusão vertical, como células de Franz, que permitem criar condições na qual pode ser medida a difusão de uma substância ativa por uma membrana, como a pele de orelha de porco, por exemplo, são muito utilizados (BONINA et al., 1996).

Geralmente, a quantidade de ativo que consegue penetrar e ficar retida na pele é pequena, exigindo métodos analíticos muito sensíveis. Portanto, para a realização de estudos de penetração e retenção cutânea de uma formulação, a substância ativa deve ser quantificada na pele por uma metodologia apropriada.

No caso da avaliação de formulações contendo extratos vegetais, como o extrato de açaí, por exemplo, há muitos compostos disponíveis para serem liberados

da formulação. Além disso, a elaboração de formulações tópicas adicionadas de açaí visa à penetração e retenção dos compostos antioxidantes presentes nesse fruto. Assim, a quantificação da atividade antioxidante na pele após os estudos de penetração e retenção cutânea torna-se imprescindível. Para que isso seja possível, a escolha de uma metodologia de análise adequada para essa quantificação é imperativa.

A luminescência é um termo empregado para descrever a emissão de radiação quando uma molécula ou átomo no estado excitado decai para o seu estado fundamental. Os vários tipos de luminescência são caracterizados em função da fonte de energia empregada para se obter o estado excitado. Na quimioluminescência, a energia de excitação é proporcionada por uma reação química, sendo a emissão de radiação observada geralmente nas regiões do ultravioleta, visível ou infravermelho (LEITE & FATIBELLO-FILHO, 2004). Esse processo ocorre devido à quebra de ligações ricas em energia e pode ser ativado enzimaticamente ou quimicamente (SANTOS & SANTOS, 1992).

A reação de quimioluminescência geralmente ocorre por uma variação de um dos mecanismos representados na Figura 2, na qual um reagente (**A**) sofre uma reação química para formar um produto em um estado excitado (**P***). Esse produto excitado pode perder energia por emissão de radiação (**hν**) (quimioluminescência direta) ou por transferência de energia para um fluoróforo (**F**) que posteriormente, pode emitir radiação (**hν**) (quimioluminescência indireta). Em alguns casos, as partículas excitadas são os produtos de uma reação entre o analito e um reagente adequado, geralmente um oxidante forte como ozônio ou peróxido de hidrogênio. Em outros casos, o analito pode desempenhar o papel de reagente, catalisador, supressor, ou até mesmo potencializar a reação quimioluminescente (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2005).

Figura 2. Diferentes mecanismos que levam a uma reação de quimioluminescência, sendo que A= substrato, B= oxidante, P= produto, P*= produto no estado excitado, F= fluoróforo, F*= fluoróforo no estado excitado, $h\nu$ = emissão de radiação.

O sinal típico de uma reação de quimioluminescência é formado quando há a mistura completa de um substrato com um agente oxidante. Esse sinal aumenta em função do tempo até um valor máximo e em seguida, há o decaimento exponencial do sinal formado. Tanto a altura do pico, quanto a área sob a curva do pico formado, são relacionadas com a concentração e pode-se verificar uma relação linear entre o sinal formado e a concentração presente em um amplo intervalo (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2005).

A quimioluminescência pode ser afetada pelas características do precursor da reação e pela presença de espécies supressoras, catalisadoras ou íons metálicos. Este tipo de reação é também fortemente dependente da temperatura e das propriedades do meio, incluindo composição, pH e força iônica. Além disso, o número de reações químicas que produzem quimioluminescência é pequeno, limitando esse procedimento a poucas espécies (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2005).

Por outro lado, procedimentos analíticos baseados em medidas de quimioluminescência caracterizam-se por apresentar baixo limite de detecção, alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear e à utilização de instrumentação simples para sua realização (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2005).

As reações quimioluminescentes podem ocorrer em fase gasosa, sólida ou líquida e têm sido utilizadas para análise quantitativa no ambiente, em alimentos, bebidas e áreas clínicas (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2005). As principais reações em fase gasosa já estudadas são aquelas que ocorrem entre o ozônio e óxidos de nitrogênio e são utilizadas para a determinação de ozônio na atmosfera (FERREIRA & ROSSI, 2002).

A fase líquida apresenta as maiores perspectivas para aplicação analítica da quimioluminescência, tanto em meio aquoso como não aquoso. Em solução, a quimioluminescência pode ser empregada em várias aplicações analíticas, como determinação de íons metálicos, ânions inorgânicos, biomoléculas, substâncias carcinogênicas e drogas em diferentes matrizes ambientais e clínicas (FERREIRA & ROSSI, 2002).

Muitas das análises efetuadas em fase líquida fazem o uso de substâncias quimioluminescentes que reagem com o oxigênio, peróxido de hidrogênio ou outros agentes oxidantes para produzir um produto de oxidação quimioluminescente, sendo o luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona) o exemplo mais comum desses compostos. Nessa reação, o luminol é oxidado em meio alcalino e na presença de um catalisador, passando para um estado de excitação. Ao voltar para seu estado basal, há a emissão de luz (SANTOS & SANTOS, 1992).

A aplicação dessa reação com luminol é ampla, pois redutores como frutose, ácido ascórbico e ácido úrico podem ser determinados indiretamente. Ainda, diversas reações enzimáticas produzem peróxido de hidrogênio e a reação de oxidação do luminol também permite a quantificação indireta dos substratos destas reações (FERREIRA & ROSSI, 2002).

Além disso, a quimioluminescência com luminol tem sido utilizada como um ensaio sensível para monitoramento de radicais livres, enzimas, células ou sistemas de órgãos e para *screening* de atividade antioxidante (GIROTTI et al., 2000). Nesse sentido, o ensaio de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase tem sido bastante empregado.

Nesse sistema, a enzima xantina oxidase (XOD), na presença de oxigênio, reage com seu substrato xantina, produzindo ácido úrico e o radical superóxido. Esse radical oxida o luminol que se rearranja passando para seu estado de excitação (SANTOS & SANTOS, 1992). A luz emitida pelo luminol, ao voltar para seu estado basal, é detectada por um equipamento denominado luminômetro (Figura 3). Dessa forma, a quantidade de luz emitida pelo luminol é proporcional à quantidade de ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase.

Figura 3. Representação esquemática da reação xantina/xantina oxidase (XOD)/luminol.

Assim, torna-se possível a quantificação de substâncias antioxidantes, como aquelas que estão presentes no açaí, que ao sequestrar os radicais superóxidos formados, provocam a diminuição da luminescência.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego do método de quimioluminescência para a quantificação da penetração dos componentes do extrato de açaí na pele por medida da atividade antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

Determinar a atividade antioxidante do extrato de açaí utilizando diferentes metodologias *in vitro*:

- Atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•];
- Atividade inibidora da peroxidação lipídica;
- Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase;

Elaborar formulações tópicas adicionadas de extrato de açaí;

Escolher o solvente extrator apropriado para retirar os componentes antioxidantes do extrato de açaí retidos na pele;

Desenvolver procedimento adequado para a extração dos componentes antioxidantes do extrato de açaí retidos na pele;

Avaliar o método de quimioluminescência e o procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção *in vitro* das formulações adicionadas de extrato de açaí.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do extrato de açaí

O extrato de *Euterpe oleracea* utilizado nesse trabalho foi gentilmente doado pela empresa Amazon Dreams Industrial E Comercial S.A., localizada em Belém – PA, incubada na UFPA.

Este processo como um todo, foi patenteado em regime de co-titularidade pela UFPA e Amazon Dreams e não pode, por motivos óbvios de propriedade intelectual, ser detalhado além daquilo que foi repassado.

Amostras de frutos de *Euterpe oleracea* foram coletadas em Ilha das Onças e Abaetetuba, perto de Belém – PA e imediatamente transportadas para o laboratório. Os frutos foram colhidos totalmente maduros, o que coincide com suas maiores concentrações de antocianinas (ROGEZ, 2000).

O extrato de açaí foi obtido a partir desses frutos, por uma sequência de processos, sendo eles extração aquosa mecânica, microfiltração, decantação, concentração em resinas macroporosas e liofilização. O extrato obtido caracterizou-se como um pó de cor roxo escuro (ROGEZ, 2000).

3.2. Caracterização química do extrato de açaí

3.2.1. Determinação do teor de polifenóis totais

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

Foram adicionados 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500 µL de solução de Na₂CO₃ (10%) em 100 µL da amostra de extrato preparada a 250 µg/mL em etanol:água (50:50) ou em 100 µL das soluções de ácido gálico preparadas no mesmo solvente. Um branco foi feito substituindo-se a alíquota da amostra, ou soluções padrão, por água deionizada. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo, a leitura da absorbância das amostras, ou soluções padrão, sobre o branco foi realizada por espectrofotometria em 760 nm (espectrofotômetro Hitashi® U2001). O conteúdo de polifenóis totais foi expresso

como µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extrato em relação ao peso seco (KUMAZAWA et al., 2004).

3.2.2. Determinação do teor de flavonoides totais

Para a determinação do teor de flavonoides totais no extrato de *Euterpe oleracea*, foi construída uma curva analítica, utilizando-se como padrão a quercetina.

Foram adicionados 500 µL de solução hidroalcoólica de cloreto de alumínio (2%) em 500 µL da amostra de extrato preparada a 500 µg/mL em etanol:água (50:50) ou em 500 µL das soluções de quercetina preparadas no mesmo solvente. Um branco foi feito substituindo-se a alíquota de cloreto de alumínio por etanol:água (50:50). A mistura foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 hora. Após esse tempo, a leitura da absorbância das amostras, ou soluções padrão, sobre o branco foi realizada por espectrofotometria em 420 nm (espectrofotômetro Hitachi U2001). O conteúdo de flavonoides totais foi expresso como µg de equivalente de quercetina (EQ) por mg de extrato em relação ao peso seco (KUMAZAWA et al., 2004).

3.3. Determinação da atividade antioxidante do extrato de açaí

A atividade antioxidante do extrato de *Euterpe oleracea* foi avaliada por diferentes métodos que simulam a formação de radicais livres *in vitro*.

A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição *versus* a concentração de extrato no meio reacional e a porcentagem de inibição foi estabelecida pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{resultado da amostra} \times 100}{\text{resultado do controle}} \right)$$

Desta forma, foi possível obter uma curva dose-resposta, assim como estimar a concentração de extrato que inibe o processo oxidativo em 50% (IC₅₀), utilizando uma curva hiperbólica. A determinação do IC₅₀ é um parâmetro muito utilizado para medir a atividade antioxidante (PAREJO et al., 2000), sendo que quanto menor o IC₅₀, maior será a atividade antioxidante.

O método considerado mais adequado, ou seja, com menor valor de IC₅₀, foi utilizado para analisar o extrato adicionado às formulações e para os estudos de penetração/retenção cutânea.

3.3.1. Determinação da atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•]

A atividade antioxidante do extrato de açaí foi determinada pela diminuição da absorbância da solução de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH[•]), modificando o método descrito por Blois (1958). Para essa determinação, preparou-se uma solução-mãe de extrato a 1000 µg/mL em etanol:água (50:50). Em seguida, foram feitas diluições seriadas utilizando o mesmo solvente.

Em tubos de ensaio, 25 µL das amostras de extrato de açaí foram adicionados a uma mistura contendo 500 µL de tampão acetato de sódio (0,1 M) pH 5,5, 500 µL de etanol e 250 µL de solução alcoólica de DPPH[•] (200 µM). Um controle positivo foi feito sem a adição da amostra e o branco foi constituído de 500 µL de tampão acetato 0,1M pH 5,5 e 750 µL de etanol. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura da absorbância em 517 nm, em espectrofotômetro (Hitachi U2001).

A variação da absorbância, proporcionada pelas amostras do extrato de açaí, foi comparada à absorbância do controle positivo (apenas DPPH[•]), que corresponde à absorbância máxima (100%).

3.3.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A medida da inibição da peroxidação lipídica pelo extrato de açaí foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), representadas principalmente pelo malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica. O MDA reage com duas moléculas de TBA, gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente em 535 nm (OHKAWA et al., 1979). Assim, para essa determinação, preparou-se uma solução-mãe de extrato a 4000 µg/mL em etanol:água (50:50). Em seguida, foram feitas diluições seriadas utilizando o mesmo solvente.

Em 1 mL de meio reacional contendo KCl (130 mM) e Tris-HCl (10 mM) pH 7,4, foram adicionados 10 µL de citrato de sódio (200 mM), 10µL de amostra de

extrato de açaí, suspensão de mitocôndria (1 mg de proteína) e 10 µL sulfato ferrosos amoniacal (50 mM). 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 (50 mM), 100 µL NaOH (10 M) e 500 µL 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 3000 rpm por 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 535 nm em espectrofotômetro (Hitachi U2001) (BUEGE; AUST, 1978). Concomitantemente, foram feitos o branco (ausência de mitocôndrias), o controle positivo (ausência de amostra), o controle do solvente (etanol:água (50:50) com ausência de amostra) 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).

3.3.3. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase

Esse ensaio foi realizado a fim de avaliar a atividade sequestradora do radical superóxido, segundo Girotti e colaboradores (2000). Para essa determinação, preparou-se uma solução-mãe de extrato de açaí a 250 µg/mL em metanol:água (50:50). Em seguida, foram feitas diluições seriadas utilizando o mesmo solvente.

Em tubos próprios para luminômetro, foram pipetados 400 µL de solução preparada acrescentando EDTA (1 mM) ao tampão glicina (0,1 M) pH 9,4. Foram adicionados 150 µL de xantina (6 mM), 10 µL de amostra de extrato de açaí e 10 µL da solução de luminol (0,6 mM). A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de solução recém preparada de xantina oxidase (20 mU/mL) mantida resfriada no gelo. Um controle foi feito, adicionado-se tampão no lugar da amostra. 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 comparando-se as áreas sob a curva (ASC) da amostra com a do controle, obtidas nesse gráfico.

3.4. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção *in vitro* de formulações adicionadas de extrato de açaí

3.4.1. Elaboração de formulações tópicas adicionadas de extrato de açaí

Foram elaboradas diferentes formulações de uso tópico, com variação dos componentes utilizados, visando obter maior liberação, penetração e retenção do extrato de *Euterpe oleracea* na pele.

A composição das formulações adicionadas de extrato pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das formulações adicionadas de extrato de *Euterpe oleracea*

Componentes (%)	F1E	F2E	F3E	F4E	F5E	F6E	F7E	F8E	F9E
Base com polímero	6	6	6	-	-	-	-	6	6
Polímero sintético	-	-	-	2	-	-	-	-	-
Cera não iônica	-	-	-	-	15	-	-	-	-
Dispersão coloidal	-	-	-	-	-	10	-	-	-
Base não iônica	-	-	-	-	-	-	24	-	-
Ácido oleico	-	-	-	-	-	-	-	5	1
Palmitato de isopropila	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-
Oleato de decila	-	-	-	-	-	5	5	-	-
Conservante	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilenoglicol	5	5	5	5	5	-	-	5	5
Glicerina	-	-	-	-	3	5	5	-	-
Água purificada	87,5	88,0	86,5	91,5	74	78,5	64,5	83,5	86,5
Extrato de açaí	1	0,5	2	1	1	1	1	1	1

As formulações gel-creme (F1E, F2E, F3E, F8E e F9E) e gel (F4E) foram preparadas a frio, por agitação manual (PHARMASPECIAL, 2011). O extrato foi previamente solubilizado em água e incorporado nas concentrações de 0,5% na formulação F2E, 2% na formulação F3E e de 1% nas demais formulações.

As formulações creme (F5E, F6E, F7E) foram preparadas pelo método de inversão de fases, sendo as fases aquosa e oleosa aquecidas separadamente até 80 °C e, em seguida, misturadas mantendo-se a agitação até resfriamento a temperatura ambiente (25 °C) (FONSECA, 2009). Após resfriamento foi acrescentado o conservante e após 24 horas foi incorporado o extrato na concentração de 1% previamente solubilizado em água.

Foram preparadas formulações placebo sem adição do extrato para cada formulação. As formulações foram acondicionadas em potes de PVC opacos, com capacidade para 50 g (FONSECA, 2009).

Após 24 horas da incorporação do extrato, todas as formulações, tanto as adicionadas de extrato quanto as placebo, foram submetidas à centrifugação por 3.000 rpm durante 30 minutos (Eppendorf 581OR) (BRASIL – ANVISA, 2005). Somente as formulações estáveis passaram para os estudos de penetração cutânea.

3.4.2. Verificação da interferência dos componentes das formulações adicionadas de extrato de açaí na medida da atividade antioxidante por quimioluminescência

As formulações foram avaliadas quanto à interferência dos seus constituintes na atividade antioxidante do extrato de açaí pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase. As formulações foram diluídas de forma a conseguir concentrações do extrato correspondentes à quantidade necessária para se obter aproximadamente 50% de porcentagem de inibição do sistema (FONSECA, 2009). Assim, para a realização do método, suspensões das formulações foram preparadas a 100 mg/mL em metanol:água (50:50) e foram posteriormente diluídas a 4000 µg/mL em tampão glicina. Procedeu-se a determinação da inibição da quimioluminescência conforme item 3.3.3. Os resultados obtidos para as formulações foram comparados com a porcentagem de inibição gerada por uma solução de extrato de açaí a 40 µg/mL, preparada na mesma concentração e utilizando os mesmos solventes das amostras das formulações.

3.4.3. Utilização da quimioluminescência para avaliar a penetração/retenção *in vitro*

Os estudos de penetração/retenção cutânea foram conduzidos utilizando células de difusão vertical do tipo Franz como modelo *in vitro*. A quantificação da atividade antioxidante aumentada pela retenção de componentes do extrato de açaí na pele foi realizada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase.

3.4.3.1. Obtenção da pele

Para a realização dos estudos *in vitro* de penetração/retenção cutânea, utilizou-se pele de orelha de porco. Para tal, a pele da parte externa das orelhas provenientes de animais recentemente sacrificados foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi e estocadas a -80 °C por um período de, no máximo, 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, modificando o método descrito por Fonseca (2009).

3.4.3.2. Escolha do solvente para extração dos componentes antioxidantes do extrato de açaí retidos na epiderme viável e derme

Secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco limpas tiveram o estrato córneo retirado pelo método de *tape stripping*, utilizando 15 fitas adesivas. Essas secções de pele foram enriquecidas com 200 µg de extrato de *Euterpe oleracea*, visando-se obter soluções que proporcionassem inibição da quimioluminescência de 50% (IC₅₀). Em seguida, a pele foi picotada com auxílio de tesoura, transferida para tubo falcon e adicionada de solvente extrator (FONSECA, 2009; VILELA, 2010).

Diferentes solventes extratores foram testados a fim de escolher o mais adequado para a extração do extrato, com menor interferência possível na determinação da atividade antioxidante por inibição da quimioluminescência provocada pelos componentes inerentes da pele, sendo eles água, metanol, etanol:água (50:50) e metanol:água (80:20) .

Adicionou-se 2,5 mL de solvente extrator no tubo contendo as peles picotadas e deixou-se em banho de ultrassom 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 (Eppendorf 581OR). O sobrenadante foi transferido para novo tubo falcon e adicionou-se mais 2,5 mL de solvente extrator ao tubo contendo a pele picotada, repetindo-se o procedimento de extração (VILELA, 2010). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para o tubo falcon e analisou-se sua atividade antioxidante pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, conforme descrito no item 3.3.3.

Fez-se, para cada solvente extrator utilizado, um controle negativo (somente a pele extraída), um controle positivo (pele extraída adicionada de extrato na mesma concentração da amostra (IC₅₀)) e uma solução de extrato preparada na mesma concentração da amostra (IC₅₀). Para todas as soluções o procedimento foi realizado em triplicata.

As porcentagens de inibição da quimioluminescência encontradas para as diferentes soluções foram comparadas entre si.

3.4.3.3. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados na epiderme viável e derme

Em secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco limpas e sem o estrato córneo, adicionou-se 200, 50 e 20 µg de extrato de *Euterpe oleracea*, correspondendo a 10%, 2,5% e 1% das quantidades do extrato presentes em 200 mg de formulação. Essa avaliação da recuperação foi feita utilizando-se três concentrações: alta (10%), média (2,5%) e baixa (1%), modificando o método descrito por Vilela (2010).

Fez-se um controle negativo (somente a pele extraída) e um controle positivo (pele extraída adicionada de extrato nas concentrações acima citadas).

Procedeu-se a extração conforme item 3.4.3.2, utilizando-se metanol:água (80:20), porém adicionando-se 1 mL do solvente em cada procedimento de extração, ao invés de 2,5 mL. Posteriormente, a porcentagem de inibição da quimioluminescência foi determinada, conforme item 3.3.3. Para todas as soluções realizou-se esse procedimento em triplicata.

As porcentagens de inibição da quimioluminescência encontradas para as amostras, em cada concentração de extrato (10, 2,5 e 1%), foram comparadas com as porcentagens de inibição geradas pelos controles positivos. A recuperação das porcentagens de inibição da quimioluminescência do extrato adicionado na pele para cada concentração foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

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

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

3.4.3.4. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados no estrato córneo

Secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco foram enriquecidas com 160 µg de extrato de *Euterpe oleracea*, visando-se obter soluções que proporcionassem inibição da quimioluminescência de 50% (IC₅₀). Em seguida, a camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo, foi retirada utilizando 15 fitas adesivas (*tape stripping*) (FONSECA, 2009). As fitas foram picotadas, colocadas em um tubo falcon contendo 4 mL de metanol:água (80:20) (solvente anteriormente escolhido para a extração) e submetidas a banho de ultrassom 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 (Eppendorf 581OR). O sobrenadante foi transferido para novo tubo falcon e sua atividade antioxidante foi analisada pela inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, conforme item 3.3.3.

Fez-se um controle negativo (*tape stripping* da pele) e uma solução de extrato preparada na mesma concentração da amostra (IC₅₀). Para todas as soluções o procedimento foi realizado em triplicata.

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para a amostra foi comparada com a porcentagem de inibição gerada pela solução de extrato de *Euterpe oleracea* preparada na mesma concentração da amostra (IC₅₀). A recuperação da porcentagem de inibição da quimioluminescência do extrato adicionado no estrato córneo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

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

% IQ Extrato

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

3.4.3.5. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção *in vitro*

Os estudos *in vitro* de penetração/retenção cutânea foram conduzidos utilizando-se células de difusão vertical do tipo Franz (Figura 4) com compartimento receptor com capacidade para 12 mL e área de difusão de 1,77 cm². O meio receptor consistiu de tampão fosfato 150 mM (pH 7,4) e foi mantido a 37 °C sob constante agitação de 300 rpm com barra magnética, modificando o método descrito por Fonseca (2009).

A pele de orelha de porco foi colocada na parte superior da célula de difusão, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor. Cuidou-se para 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 do extrato de *Euterpe oleracea* ou não. As células foram protegidas com filme plástico, modificando o método descrito por Vilela (2010). Em cada experimento, seis células de difusão eram montadas, sendo que três delas eram adicionadas de formulações com extrato de açaí e três delas eram adicionadas formulações placebo, sem o extrato.

Figura 4. Célula de difusão vertical do tipo Franz. Reproduzido de Vilela (2010).

Após 12 horas, as peles de orelha de porco foram retiradas e limpas com papel absorvente. A camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo foi retirada pressionando-se uniformemente 15 fitas adesivas (*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 3.4.3.4. A pele remanescente (epiderme viável e derme) foi submetida ao processo de extração conforme item 3.4.3.3. Posteriormente, procedeu-se a quantificação pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, conforme item 3.3.3.

3.4.3.5.1. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de uma formulação adicionada de diferentes quantidades de extrato de açaí

As formulações gel-creme (F2E, F1E e F3E) elaboradas com diferentes quantidades de extrato de açaí (0,5%, 1% e 2%, respectivamente) e sua formulação placebo foram submetidas ao estudo com célula de difusão vertical. A medida da

atividade antioxidante do extrato na pele foi realizada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, conforme item 3.3.3.

A porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pela formulação placebo na epiderme viável e derme foi subtraída da porcentagem de inibição gerada pelas formulações adicionadas de diferentes quantidades de extrato, devido à interferência dos compostos antioxidantes inerentes da pele.

A quantidade de extrato de açaí que penetrou/reteve na epiderme viável e derme, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, foi calculada comparando-se os resultados das diferenças entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para as formulações adicionadas de extrato e as formulações placebo com o valor de IC_{50} do extrato de açaí, fazendo-se uma relação simples.

Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.4.3.5.2. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí

Diferentes formulações preparadas com 1% de extrato de açaí (F1E, F4E, F6E, F8E e F9E) foram avaliadas quanto à capacidade de proporcionar a penetração e retenção do extrato nos estudos com célula de difusão vertical. A medida da atividade antioxidante desse extrato que penetrou/reteve na pele foi realizada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase conforme item 3.3.3.

As porcentagens de inibição da quimioluminescência geradas pelas formulações placebo na epiderme viável e derme foram subtraídas das porcentagens de inibição geradas pelas formulações adicionadas de extrato, devido à interferência dos compostos antioxidantes inerentes da pele.

A quantidade de extrato de açaí que penetrou/reteve na epiderme viável e derme, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, foi calculada comparando-se os resultados das diferenças entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para as formulações adicionadas de extrato e as formulações placebo com o valor de IC_{50} do extrato de açaí, fazendo-se uma relação simples.

Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.4.3.5.3. Quantificação por quimioluminescência de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí retidos no estrato córneo

As diferentes formulações preparadas com 1% de extrato de açaí adicionadas na pele (F1E, F4E, F6E, F8E e F9E) foram analisadas no estrato córneo. Para isso, após as 12 horas do estudo de penetração, a camada mais externa da epiderme foi retirada por *tape stripping*. O extrato foi extraído da fita adesiva conforme descrito em 3.4.3.4 e a porcentagem de inibição da quimioluminescência no estrato córneo foi avaliada, conforme 3.3.3.

A quantidade de extrato de açaí que reteve no estrato córneo, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, foi calculada comparando-se os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para as formulações adicionadas de extrato com o valor de IC_{50} do extrato de açaí, fazendo-se uma relação simples.

Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.5. Cálculo do valor de IC_{50} e análise estatística dos resultados

A concentração de extrato de açaí que inibe o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) foi estimada pelo programa GraphPad Prism (versão 5.0), utilizando uma curva hiperbólica (One site binding hyperbola).

Para a análise estatística dos resultados, o mesmo programa foi utilizado. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (EPM), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni ou teste *t student*. As diferenças consideradas significativas foram aquelas com valores de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química do extrato de açai

4.1.1. Determinação do teor de polifenóis totais

Diversos estudos mostram que a ação antioxidante de extratos vegetais, tais como sua propriedade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, relaciona-se ao teor de compostos fenólicos presentes nesses extratos. O método de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis totais tem como princípio a propriedade do íon fenolato ser oxidado. A reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (reagente de Folin-Ciocalteu) a óxidos de tungstênio e molibdênio em meio alcalino ($\text{pH} \geq 10$) é causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul (SINGLETON et al., 1999; ADELMANN, 2005).

O teor de polifenóis totais foi determinado pela equação obtida da curva padrão de ácido gálico $y = 0,0636x - 0,0179$ ($r = 0,9968$), onde x representa a concentração de polifenóis correspondente ao ácido gálico e y representa a absorbância. O conteúdo de polifenóis totais encontrado foi de 314,40 μg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extrato em relação ao peso seco. Esse resultado representa uma média de três determinações.

4.1.2. Determinação do teor de flavonoides totais

Dentre os compostos fenólicos, o grupo dos flavonoides é o mais estudado (SILVA et al., 2007). O método de determinação do teor desse grupo 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 (CHANG et al., 2002). Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos (WOISKY, 1996). O teor de flavonoides foi determinado pela equação $y = 0,0606x + 0,0065$ ($r = 0,9993$) obtida com padrão de quercetina. O conteúdo de flavonoides totais encontrado foi de 24,97 μg de equivalente de quercetina (EQ) por mg de extrato em relação ao peso seco. Esse resultado representa uma média de três determinações.

4.2. Determinação da atividade antioxidante do extrato de açaí

Uma vez que existem várias maneiras pelas quais um extrato pode exercer sua atividade antioxidante, como pela quelação de íons metálicos, neutralizando e/ou impedindo a formação de radicais livres ou melhorando o sistema antioxidante endógeno, é importante comparar diversos métodos antioxidantes a fim de proporcionar uma melhor compreensão do potencial antioxidante dos extratos estudados (PIETTA, 2000).

Assim, o extrato de *Euterpe oleracea* foi avaliado por diferentes ensaios, capazes de simular a formação de radicais livres diferentes. Os valores de IC₅₀ mostrados para os três ensaios foram calculados com o programa GraphPad Prism (versão 5.0) e são decorrências de avaliações em triplicata.

4.2.1. Determinação da atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•]

O DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é um radical livre caracterizado como estável devido à deslocalização de um elétron desemparelhado por toda sua molécula. Essa deslocalização eletrônica é responsável por sua cor violeta característica que absorve em uma faixa do comprimento de onda entre 515 e 520 nm. Compostos capazes de doar íons de hidrogênio, como os polifenóis presentes nos extratos vegetais, reduzem a molécula de DPPH[•] que perde sua cor (BLOIS, 1958; PAREJO et al., 2000).

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 espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton (CHOI; CHEE; LEE, 2003).

Vicentini e colaboradores (2007) encontraram o valor de IC₅₀ de 0,8 µg/mL para a quercetina, sendo o valor obtido para o extrato de *Euterpe oleracea*, de 5,43 µg/mL, cerca de cinco vezes maior. Entretanto, a quercetina é uma substância pura utilizada como padrão para esta técnica.

Comparando-se o valor de IC₅₀ obtido nesse estudo com os obtidos para o extrato de própolis verde e o extrato de *Eugenia protenta* que apresentaram valores

de IC₅₀ de 70 µg/mL (FONSECA, 2007) e 11,11 µg/mL (FORTE, 2012), respectivamente, fica evidente o alto poder antioxidante do extrato de açai.

Embora o método de DPPH• seja amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, ele não é o melhor método para a determinação de compostos antioxidantes, uma vez que o DPPH•, espécie radicalar centrada no nitrogênio, não está presente nos sistemas biológicos e a maioria dos radicais envolvidos na deteriorização oxidativa são espécies reativas de oxigênio (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

4.2.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é o processo iniciado pela reação de um radical livre com os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas biológicas e propagado por radicais peroxila. No sistema biológico, a peroxidação lipídica pode ser induzida pelas espécies reativas de oxigênio, geradas pela radiação solar na pele, e essas agredirem os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a sua entrada nas estruturas intracelulares (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; LIMA, ABDALLA, 2001).

O ensaio *in vitro* de inibição da peroxidação lipídica envolve uma reação colorimétrica entre o TBA e substâncias reativas ao TBA, como o 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 fosfolípidos 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 durante a trituração do tecido. Na presença de sais de Fe²⁺, esses peróxidos são decompostos e originam radicais peroxila e alcóxila (ROO• e RO•),

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.

Nesse ensaio, o extrato de *Euterpe oleracea* apresentou valor de IC₅₀ de 15,00 µg/mL. Comparando-se o valor de IC₅₀ de 0,34 µg/mL obtido para a quercetina (CASAGRANDE, 2005), com o valor encontrado nesse estudo, observa-se que esse foi cerca de 44 vezes maior.

4.2.3. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase

A principal função da enzima xantina oxidase (XOD) fisiologicamente é oxidar a hipoxantina à xantina e a xantina à ácido úrico. Durante a reoxidação da xantina oxidase, 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).

Para a determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, tem-se que a enzima xantina oxidase, na presença de oxigênio, reage com a xantina produzindo o radical superóxido, que por sua vez, oxida o luminol. Essa oxidação faz com que a molécula de luminol passe para um estado excitado e ao retornar para seu estado basal, há a emissão de luminescência que é detectada pelo luminômetro (SANTOS & SANTOS, 1992).

A redução da quantidade de radicais superóxido no meio reacional leva a diminuição da quimioluminescência (GIROTTI et al., 2000). Assim, a inibição da luminescência pode ocorrer por inibição da enzima xantina oxidase ou por sequestro dos radicais superóxido formados (PIETTA, 2000).

O extrato de *Euterpe oleracea* apresentou valor de IC₅₀ de 0,63 µg/mL no meio reacional para a inibição da quimioluminescência gerado no sistema xantina/luminol/xantina oxidase. Fonseca e colaboradores (2010), realizando este mesmo ensaio, encontraram valor de IC₅₀ para quercetina de 11,3 µg/mL, demonstrando o alto potencial antioxidante do extrato de açaí nesse sistema.

A curva formada pela porcentagem de inibição da quimioluminescência *versus* concentração de extrato no meio reacional (Figura 5) apresentou coeficiente de correlação de $r = 0,992$, estando esse valor acima do recomendado pela ANVISA para a realização de métodos bioanalíticos, cujo r deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL – ANVISA, 2003).

Apesar das amostras utilizadas nesse trabalho não serem matrizes biológicas, utilizou-se como referência os principais parâmetros propostos para métodos bioanalíticos. Isso devido ao extrato utilizado ser uma mistura complexa de substâncias, no qual cada uma delas está presente em quantidades muito baixas.

Figura 5. Curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase em função da concentração de extrato de açaí (E) no meio reacional. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP.

Ao analisar a Figura 5, observa-se uma relação linear entre a inibição da quimioluminescência e a concentração de extrato no meio reacional até o valor de 60% de inibição. A Tabela 2 mostra as quantidades de extrato de açaí no meio reacional que proporcionaram porcentagens de inibição da quimioluminescência abaixo de 60% e os seus respectivos coeficientes de variação.

Tabela 2. Quantidades de extrato de açaí (E) e suas porcentagens de inibição da quimioluminescência abaixo de 60% de inibição

Concentração de E no meio reacional ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de E no meio reacional (μg)	Inibição da quimioluminescência (%)			Média	DP	CV (%)
0,93	0,62	58,744	62,453	61,552	60,916	0,772	1,268
0,47	0,31	42,523	39,880	41,731	41,378	0,983	2,375
0,23	0,15	23,569	25,733	24,957	24,753	0,517	2,089
0,12	0,08	19,952	19,187	17,072	18,737	1,114	5,946

Ao analisar a Tabela 2, tem-se que os coeficientes de variação (CV) obtidos foram menores que 15%, estando em acordo com o preconizado pela ANVISA para métodos bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003).

Uma segunda figura foi construída na qual se relacionou as porcentagens de inibição da quimioluminescência até o valor próximo de 60% versus as respectivas quantidades de extrato de açaí no meio reacional (Figura 6).

Figura 6. Faixa linear da curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase em função da quantidade de extrato de açaí (E) no meio reacional. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP.

Observou-se que o valor do coeficiente de correlação r obtido para a faixa linear da curva foi de 0,993, maior que o valor de 0,98 preconizado pela ANVISA para ensaios bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003).

De acordo com os resultados obtidos tem-se que para porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas até o valor de 60%, seria possível a quantificação do extrato de açaí utilizando o método de quimioluminescência.

Para avaliar a existência de uma possível inibição da atividade da enzima xantina oxidase pelo extrato de açaí, esse foi pré-incubado com a xantina oxidase, quinze minutos antes da reação de quimioluminescência. A curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase em função da concentração de extrato obtida foi muito próxima à encontrada para o ensaio sem a pré-incubação enzimática (dados não mostrados). Esse resultado sugere que os componentes do extrato não interagiram com a enzima, ou se interagiram, essa interação não alterou a atividade enzimática nem a capacidade do extrato em inibir a quimioluminescência.

Diante dos resultados apresentados para a determinação da atividade antioxidante do extrato de açaí, viu-se que o valor de IC_{50} obtido para o extrato no ensaio de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase foi cerca de 8 vezes menor que o obtido para o ensaio de redução do DPPH[•]. Comparando-se o IC_{50} obtido para a inibição da quimioluminescência com o obtido para o ensaio de peroxidação lipídica, observou-se uma diferença maior, sendo essa cerca de 24 vezes menor. Sabe-se que os meios reacionais desses ensaios são diferentes, sendo majoritariamente etanol para o de redução do DPPH[•], Tris-HCl pH 7,4 para o da peroxidação lipídica e tampão glicina pH 9,4 para a inibição da quimioluminescência. Assim, as diferenças nos valores de IC_{50} observados podem estar relacionadas ao grau de solubilização dos componentes do extrato no meio reacional. O extrato de açaí utilizado nesse trabalho foi obtido por extração aquosa, sendo assim, esse é bastante solúvel em água. Sugere-se então, que a solubilização do extrato foi facilitada no meio de tampão glicina quando comparado com o etanol. Pela diferença observada entre o IC_{50} obtido para a peroxidação lipídica e o obtido para a quimioluminescência, ambos em solventes aquosos, sugere-se que o pH também deva influenciar a solubilização dos componentes do extrato. Além disso, as diferenças nos valores de IC_{50} encontrados ainda podem estar relacionadas com os diferentes mecanismos de ação envolvidos nos três diferentes ensaios.

Devido ao menor valor de IC_{50} obtido e à possibilidade de quantificação do extrato de açaí no método de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema

xantina/luminol/xantina oxidase, esse foi o escolhido para a avaliação da atividade antioxidante das formulações elaboradas e para os estudos de penetração/retenção com células de difusão vertical.

4.3. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção *in vitro* de formulações adicionadas de extrato de açaí

4.3.1. Elaboração de formulações tópicas adicionadas de extrato de açaí

As formulações tópicas foram elaboradas com matérias-primas amplamente utilizadas em preparações farmacêuticas e cosméticas, e em concentrações recomendadas pelos fabricantes. A composição delas foi anteriormente apresentada na Tabela 1.

Foram elaboradas diversas formulações, com conteúdo graxo distinto, a fim de verificar qual tipo de formulação permitiria uma melhor penetração dos componentes antioxidantes do extrato na pele.

As formulações gel-creme F1E, F2E e F3E foram elaboradas com Hostacerin SAF[®], um *blend* de emolientes, emulsionantes e doador de viscosidade, sendo esse um polímero. Essa matéria-prima permite a preparação a frio de emulsões óleo em água, aniônicas e bastante estáveis (PHARMASPECIAL, 2011). Dessa forma, foi possível incorporar o extrato de açaí na fase aquosa, o que proporcionou segurança na homogeneidade de conteúdo dos compostos adicionados.

A formulação tipo gel F4E foi preparada utilizando Aristoflex[®] AVC, um polímero sintético, aniônico, formador de géis cristalinos em sistemas aquosos, estáveis em ampla faixa de pH e que não necessitam neutralização (PHARMASPECIAL, 2011). Essa formulação, também elaborada a frio, permitiu a incorporação do extrato na fase aquosa, resultando em uma melhor homogeneização.

Para preparar a formulação creme F5E, foi utilizada a cera auto-emulsionante não iônica Polawax[®]. Esse tipo de cera é muito utilizada em formulações tópicas devido à sua baixa irritação na pele, estabilidade, compatibilidade com eletrólitos e com a maioria dos agentes cosméticos (CRODA, 2011).

A formulação F6E, outra formulação creme, foi preparada com Lanette N[®], uma dispersão coloidal composta por álcool graxo e tensoativo. Já a formulação F7E, foi elaborada com Crodabase, uma base autoemulsionante e emoliente, composta por ceras espessantes, emulsionantes não iônicos, emolientes de lanolina e hidrocarbonetos (CRODA, 2011).

Em todas as formulações creme, o extrato foi adicionado após 24 horas do preparo das mesmas na forma de solução aquosa, preparada com uma pequena parte da água de cada uma das formulações.

As formulações F8E e F9E foram preparadas adicionando-se ácido oleico em formulação gel-creme de Hostacerin SAF[®]. O ácido oleico, um ácido graxo de cadeia longa com configuração *cis*, interage e modifica os domínios lipídicos do estrato córneo e pode auxiliar na penetração tanto de substâncias de caráter lipofílico como de caráter hidrofílico (WILLIAMS, BARRY, 2004). Nessas formulações o extrato de açaí também foi incorporado a frio, juntamente com a fase aquosa da formulação.

Após 24 horas da incorporação do extrato, as formulações foram submetidas ao teste de centrifugação. As formulações creme F5E e F7E apresentaram separação de fases e foram excluídas dos estudos de penetração/retenção *in vitro*.

4.3.2. Verificação da interferência dos componentes das formulações adicionadas de extrato de açaí na medida da atividade antioxidante por quimioluminescência

A porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase obtida pelo extrato de açaí não veiculado e a porcentagem de inibição alcançada pelas formulações foram comparadas. As soluções foram preparadas de forma que a concentração final de extrato no meio reacional para extrato não veiculado foi equivalente à concentração para o incorporado nas formulações (concentração próxima à IC₅₀). Também foram realizados testes para as formulações placebo, não adicionadas de extrato. Os resultados encontram-se representados na Figura 7.

Figura 7. Porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para o extrato de açaí não veiculado (E) e o adicionado às formulações (F). Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. Valores não foram estatisticamente diferentes, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni's, com $p < 0,05$.

A análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa entre a inibição da quimioluminescência obtida para o extrato não veiculado e a encontrada para o extrato incorporado às diferentes formulações (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni's). Adicionalmente, as formulações placebo não apresentaram atividade antioxidante. Diante disso, os resultados sugerem que os componentes das formulações não interferem na avaliação da atividade antioxidante do extrato de açaí pelo método utilizado, sendo esse adequado para a finalidade proposta. Ainda, esses dados demonstram que o extrato foi veiculado de forma homogênea em todas as formulações elaboradas.

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.

As porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para a solução de extrato de açaí preparada na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (0,6 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional), estão apresentadas na Tabela 3.

Verificou-se que as porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para a solução de extrato de açaí nas diferentes determinações foram muito próximas. Adicionalmente, o coeficiente de variação (CV) calculado foi de 7,256%, estando em acordo com o valor de até 15% preconizado pela ANVISA para métodos

bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003). Dessa forma, considerando-se que cada determinação foi realizada em dias diferentes, preparando-se diferentes soluções de extrato de açaí, tem-se que o método de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase apresentou precisão adequada.

Tabela 3. Porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas pela solução de extrato de açaí a 0,6 µg/mL do meio reacional e porcentagem de inibição esperada para solução de extrato de mesma concentração, de acordo com a IC₅₀.

Concentração de E no meio reacional (µg/mL)	Inibição obtida (%) n = 3	Média	DP	CV (%)	Inibição esperada (%)	Exatidão (%)
0,60	49,559	47,484	3,445	7,256	47,619	99,716
	51,338					
	48,547					
	45,165					
	42,813					

Comparando-se a média da porcentagem de inibição da quimioluminescência de 47,484%, obtida para as soluções de extrato de açaí a 0,6 µg/mL do meio reacional, com a porcentagem de inibição da quimioluminescência de 47,619%, esperada para uma solução de extrato nessa mesma concentração, calculada de acordo com a IC₅₀ do extrato de açaí, fazendo-se uma relação direta, observou-se uma exatidão de 99,716%.

Deste modo, esses resultados mostraram que o método de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase, escolhido para a avaliação da atividade antioxidante das formulações elaboradas e para os estudos de penetração/retenção com células de difusão vertical, foi preciso e exato.

4.3.3. Utilização da quimioluminescência para avaliar a penetração/retenção *in vitro*

Estudos de penetração/retenção cutânea *in vitro* são considerados importantes 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 vertical tem sido muito utilizada. Essa metodologia apresenta como vantagem o fato de ser simples e facilmente controlada em condições experimentais (LEONARDI, 2008).

Para realização desses estudos, faz-se necessário o uso de modelos de membranas adequados. O melhor deles é sem dúvida a própria pele humana, entretanto, a dificuldade de obtenção restringe 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 à densidade de folículos pilosos, espessura do estrato córneo e propriedades bioquímicas (BRONAUGH; COLLIER, 1993; MOSER et al., 2001; ZATZ, 1993). Dessa forma, sua utilização em estudos de penetração tem apresentado resultados comparáveis ao tecido humano, enquanto peles de camundongos, ratos e cobaias apresentam maior taxa de penetração (MOSER et al., 2001).

A avaliação da penetração/retenção cutânea dos compostos antioxidantes do extrato é um passo fundamental para sugerir o uso do açaí em formulações tópicas. Porém, a confiabilidade de tais análises depende do emprego de métodos eficazes e sensíveis para a determinação dessa atividade antioxidante. Dessa forma, o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase foi o escolhido depois de verificada sua eficiência e sensibilidade nessa quantificação.

4.3.3.1. Escolha do solvente para extração dos componentes antioxidantes do extrato de açaí retidos na pele

O solvente utilizado para a extração é muito importante e deve ser cuidadosamente escolhido, objetivando a retirada do extrato de *Euterpe oleracea* adicionado na pele, sem que se extraiam os componentes da pele que possuem atividade antioxidante, a fim de que a pele não interfira no método de quantificação.

Essa escolha foi realizada adicionando-se uma quantidade conhecida de extrato à pele de orelha porco sem estrato córneo. Retirou-se o estrato córneo, pois nos ensaios de penetração/retenção cutânea a pele sofre *tape stripping*. O processo de extração foi realizado conforme descrito no item 3.4.3.2 utilizando os seguintes

solventes: água, metanol, etanol:água (50:50) e metanol:água (80:20). Além da amostra foram preparados um controle negativo, um controle positivo e uma solução de extrato na mesma concentração da amostra, para cada solvente extrator testado.

Os controles negativos constituíram da extração de uma área de pele, igual a da amostra (1,77 cm²), com cada um dos solventes testados. Essas soluções foram preparadas com o objetivo de avaliar se os constituintes da pele, extraídos com cada um dos solventes extratores, poderiam interferir no processo de avaliação da atividade antioxidante do extrato retido na pele.

Os controles positivos constituíram da adição de extrato de açaí, na mesma concentração da amostra, em solução de pele extraída (área de 1,77 cm²) com cada um dos solventes extratores. Esses controles foram feitos com a finalidade de corrigir possíveis interferências dos componentes antioxidantes extraídos da pele na determinação da inibição da quimioluminescência gerada pelo extrato de açaí.

As porcentagens de inibição da quimioluminescência encontradas para as amostras foram comparadas com as dos controles negativos, dos controles positivos e das soluções de extrato preparadas nas mesmas concentrações das amostras (Figura 8).

Figura 8: Porcentagens de inibição da quimioluminescência das soluções obtidas empregando diferentes solventes extratores, em que Amostra = pele adicionada de extrato de açaí; Controle negativo = somente a pele extraída; Controle positivo = pele extraída adicionada de extrato na mesma concentração da amostra (IC_{50}) e Extrato = solução de extrato preparada na mesma concentração da amostra (IC_{50}). Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. Valores representados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes e valores representados por (*) foram estatisticamente diferentes comparados aos demais resultados do grupo, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni's, com $p < 0,05$.

Ao analisar os resultados obtidos utilizando a água como solvente extrator (grupo 1 da Figura 8), obteve-se uma porcentagem de inibição de 77,12% para a amostra, indicando extração do extrato da pele. Porém, os componentes da pele que apresentam atividade antioxidante também foram bastante extraídos, já que a porcentagem de inibição obtida para o controle negativo foi de 69,03%. O controle positivo apresentou porcentagem de inibição de 72,45%, sendo essa diferença não significativa comparada à amostra e ao controle negativo. Já o extrato, que possui concentração igual à amostra, exibiu inibição de 51,78%, apresentando diferença significativa comparada às demais soluções do grupo. Esses resultados sugerem que os componentes inerentes da pele com atividade antioxidante podem estar sendo extraídos também, e esses interferem na quantificação dos componentes antioxidantes do extrato. O valor de inibição apresentado pelo controle negativo somado do valor obtido pelo extrato, não resulta no valor de inibição obtido pela amostra, ou seja, os valores de inibição não foram somatórios. Isso indica que a água não foi capaz de extrair a totalidade dos componentes antioxidantes do extrato.

Ainda, o valor de inibição do controle negativo somado do valor obtido pelo extrato, não resulta no valor de inibição do controle positivo, indicando uma possível interferência dos componentes da pele na medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência. Diante dos resultados apresentados, a água mostrou-se inadequada como líquido extrator.

Ao utilizar o metanol como solvente extrator (grupo 2 da Figura 8), não foi possível extrair os componentes do extrato com atividade antioxidante da pele, como pôde ser verificado pelo valor de inibição de -9,69% apresentado pela amostra. Os componentes da pele que possuem atividade antioxidante também não foram extraídos, visto pela porcentagem de inibição de -28,51% obtida pelo controle negativo. O controle positivo apresentou uma inibição de 48,78%, menor que o valor de 62,65% obtido para o extrato, sendo essa diferença significativa. Isso pode indicar que o metanol pode ter sido capaz de extrair componentes da pele com caráter lipofílico, que podem ter interferido na medida da inibição da quimioluminescência. De acordo com os resultados obtidos, o metanol também não pôde ser escolhido.

Os resultados obtidos para o solvente etanol:água (50:50) (grupo 3 da Figura 8) foram muito parecidos com os obtidos para a água, provavelmente devido a grande quantidade dessa na composição do solvente. A amostra apresentou valor de inibição de 76,64%. O controle negativo também apresentou alto valor de inibição, sendo esse de 70,99%. O controle positivo mostrou porcentagem de inibição de 71,61%, sendo essa diferença não significativa comparada à amostra e ao controle negativo. O extrato, que possui concentração igual à amostra, exibiu inibição de 35,13%, apresentando diferença significativa comparada às demais soluções do grupo. Novamente, sugere-se que os componentes inerentes da pele com atividade antioxidante podem estar sendo extraídos também, e esses interferem na quantificação dos componentes antioxidantes do extrato. O valor de inibição do controle negativo e o valor do extrato não foram somatórios, indicando que o solvente etanol:água (50:50) não foi capaz de extrair a totalidade dos componentes antioxidantes do extrato. Adicionalmente, o valor de inibição do controle negativo somado do valor obtido pelo extrato, não resulta no valor de inibição do controle positivo, indicando uma possível interferência dos componentes da pele na medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência. A solução de etanol:água (50:50) também não foi escolhida como solvente extrator.

Analisando-se os resultados obtidos com o solvente extrator metanol:água (80:20) (grupo 4 da Figura 8), viu-se que esse foi capaz de extrair componentes que possuem atividade antioxidante do extrato, pois obteve-se inibição de 29,17% para a amostra. O controle negativo apresentou porcentagem de inibição de 5,73%, indicando uma baixa extração dos componentes antioxidantes inerentes da pele. O controle positivo apresentou porcentagem de inibição de 28,54%, sendo esse valor significativamente não diferente comparado à amostra. Esse resultado sugere que o solvente metanol:água foi capaz de extrair os componentes antioxidantes do extrato da pele. Comparando-se o controle positivo com o extrato, que apresentou porcentagem de inibição de 41,88%, observou-se que esse último apresentou um valor de inibição maior, sendo essa diferença significativa. Isso pode indicar que o solvente metanol:água (80:20) pode ter sido capaz de extrair componentes da pele com caráter lipofílico devido possivelmente à grande concentração de metanol nesse solvente. Esses componentes extraídos da pele podem ter interferido na medida da inibição da quimioluminescência. Diante dos resultados apresentados, o solvente metanol:água (80:20) mostrou-se o mais adequado para extrair os componentes antioxidantes do extrato da pele, pois apesar da interferência provocada pela pele, essa não impediu a medida da inibição da quimioluminescência gerada pelo extrato.

Comparando-se os valores de inibição da quimioluminescência obtido pelas soluções de extrato preparadas com os diferentes solventes, observa-se uma diferença significativa entre eles. O extrato preparado com etanol:água (50:50) foi o que apresentou menor porcentagem de inibição da quimioluminescência, sendo essa de 35,13%. O extrato preparado com metanol:água (80:20) mostrou porcentagem de inibição de 41,88%, o preparado com água apresentou inibição de 51,78% e o extrato preparado com metanol foi o que mostrou maior valor, sendo esse de 62,65%. Sabe-se que o extrato utilizado nesse trabalho foi obtido realizando-se uma extração aquosa do fruto açaí e por esse motivo ele é altamente solúvel em água. Para a realização desse experimento, ao preparar a solução com metanol, viu-se que o extrato não foi solúvel nesse solvente, sendo necessária a utilização de ultrassom para a solubilização. A ultrassonicação pode ter facilitado a solubilização do extrato, refletindo na maior porcentagem de inibição obtida para o extrato nesse solvente. Para a preparação das soluções com os demais solventes, não foi necessário a utilização de ultrassom para a solubilização do extrato, visto que essa ocorreu espontaneamente. Assim, sugere-se que a inibição de 51,78%

apresentada ao se utilizar água como solvente, maior que a obtida para os outros solventes que também não utilizaram o ultrassom, deve-se a melhor solubilização do extrato em água. O valor de inibição apresentado pelo extrato preparado em metanol:água (80:20) foi maior que o obtido com o solvente etanol:água (50:50). Apesar da maior proporção de água nesse último solvente, sugere-se que o metanol pode ter sido capaz de solubilizar componentes antioxidantes do extrato com caráter mais apolar, que não são solubilizados com o etanol, resultando nessa maior porcentagem de inibição obtida para o extrato em metanol:água (80:20).

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, que são hidrossolúveis. Marquele e colaboradores (2007), também utilizaram o método de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase para a avaliação da penetração/retenção em células de difusão vertical, porém não tiveram problemas de interferência da pele ao realizar a extração dos componentes antioxidantes do extrato com metanol. Esses autores puderam empregar o metanol como líquido extrator, pois os componentes antioxidantes da própolis foram solúveis nesse solvente e os antioxidantes endógenos da pele não, sendo possível a extração.

Portanto, para se conseguir uma adequada extração do extrato de *Euterpe oleracea* da pele, sem que haja grande interferência dos componentes dessa na medida da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase, utilizou-se o solvente metanol com a adição de 20% de água (metanol:água (80:20)) como solvente extrator.

Além disso, utilizando-se metanol:água (80:20) como solvente extrator, viu-se que o valor obtido para a amostra foi igual ao obtido para o controle positivo e menor que o obtido para o extrato. Por conseguinte, para a realização da avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato adicionados na pele, foi necessário comparar a amostra com o controle positivo, a fim de descontar a interferência da pele na avaliação da quimioluminescência.

4.3.3.2. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados na epiderme viável e derme

A recuperação é definida como a 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 e isso pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI et al., 2004).

Após escolhido o solvente extrator adequado, essa recuperação foi realizada adicionando-se três diferentes quantidades de extrato de *Euterpe oleracea* (10, 2,5 e 1% do total de extrato presente em 200 mg de formulação) na pele de orelha de porco. Nos estudos realizados para a escolha do solvente extrator, foi verificado que utilizando metanol:água (80:20) como solvente extrator, a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a amostra foi igual à obtida para o controle positivo (pele extraída adicionada de extrato na mesma concentração da amostra), mas foi menor que a obtida para o extrato (Figura 8).

Desta forma, para esses estudos de recuperação, as porcentagens de inibição da quimioluminescência encontradas para as amostras em cada nível de concentração do extrato adicionado na pele ($1,77 \text{ cm}^2$) foram comparadas com as porcentagens de inibição geradas pelos controles positivos adicionados de iguais quantidades de extrato.

A recuperação das porcentagens de inibição da quimioluminescência do extrato adicionado na pele para cada concentração foi calculada de acordo com a fórmula apresentada em 3.4.3.3. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Recuperações das porcentagens de inibição da quimioluminescência do extrato adicionado na pele em diferentes quantidades

Extrato adicionado na pele (µg)	Concentração meio reacional (µg/mL)	Inibição da Quimioluminescência (%)		Recuperação (%)
		Amostras	Controle Positivo	
200	1,49	63,805 ± 5,47	62,230 ± 6,33	102,53%
50	0,37	44,173 ± 6,23	46,333 ± 13,00	95,34%
20	0,15	39,679 ± 16,10	34,919 ± 18,32	113,63%

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

Como observado, o método de extração apresentou recuperações de 102,53, 95,34 e 113,63% para as massas de 200, 50 e 20 µg de extrato aplicadas na pele, respectivamente. O valor da recuperação encontrado para a massa de 20 µg foi bem maior que 100%. Isso pode ser devido à baixa quantidade de extrato adicionada, a qual pode sofrer maior interferência dos componentes da pele na determinação da atividade antioxidante. Estes resultados estão de acordo com Bronaugh e colaboradores (1999) que indicam que a recuperação normalmente deve ser acima de 80%, assumindo que o procedimento de extração mostrou-se adequado aos estudos de penetração/retenção cutânea.

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/xantina oxidase. Fonseca (2009) apresentou uma recuperação de 81,41% para a rutina e de 83,35% para a narcissina presentes no extrato de calêndula, enquanto Vicentini (2009) obteve recuperação de 90, 87 e 84,9% para a quercetina em amostras de pele, ambas empregando o método de CLAE para a quantificação. Sendo assim, a recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de *Euterpe oleracea* obtida foi similar à obtida por Oliveira (2007) quando essa mesma metodologia de inibição da quimioluminescência foi empregada para a avaliação. Além disso, tais resultados foram melhores que os obtidos por Fonseca (2009) e Vicentini (2009), que utilizaram o método de CLAE para a quantificação.

4.3.3.3. Avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí adicionados no estrato córneo

Essa recuperação foi realizada enriquecendo-se a amostra de 1,77 cm² de pele de orelha de porco com 160 µg de extrato de *Euterpe oleracea*, visando-se obter solução que proporcionasse inibição da quimioluminescência de 50% (IC₅₀).

Além da amostra foram preparados um controle negativo e uma solução de extrato na mesma concentração da amostra (IC₅₀).

O controle negativo constituiu da realização do *tape stripping* de uma área de pele, igual a da amostra (1,77 cm²), seguida da extração. Essa solução foi preparada com o objetivo de avaliar se os constituintes da fita, ou os componentes extraídos da pele, poderiam interferir no processo de avaliação da atividade antioxidante do extrato adicionado no estrato córneo.

A solução de extrato na mesma concentração da amostra (IC₅₀) foi preparada para se comparar a porcentagem de inibição da quimioluminescência da amostra com a porcentagem de inibição dessa solução, sendo essa considerada como 100% de inibição.

Os resultados da inibição da quimioluminescência gerados pela amostra, pelo controle negativo e pela solução de extrato de *Euterpe oleracea* preparado na mesma concentração que a amostra (extrato), encontram-se na Figura 9.

A recuperação da porcentagem de inibição da quimioluminescência do extrato adicionado no estrato córneo foi calculada de acordo com a fórmula apresentada em 3.4.3.4.

Figura 9: Porcentagens de inibição da quimioluminescência das soluções obtidas na avaliação da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de açaí no estrato córneo. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. Valor representado por (*) foi estatisticamente diferente, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni's, com $p < 0,05$.

A média da porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para a amostra e para o controle foi de 52,99 e 51,71%, respectivamente. O controle negativo não inibiu a quimioluminescência, indicando que os componentes da fita e os componentes da pele que foram extraídos não apresentaram atividade antioxidante e, portanto, não interferiram no método. Assim, a recuperação da porcentagem de inibição da quimioluminescência do extrato de açaí adicionado no estrato córneo foi de 102,48%, indicando que tal procedimento de extração poderá ser utilizado nos estudos de penetração e retenção cutânea (BRONAUGH, et. al., 1999).

4.3.3.4. Avaliação do método de quimioluminescência e do procedimento de extração nos estudos de penetração/retenção *in vitro*

Depois de verificado que os métodos de extração propostos para a retirada dos componentes antioxidantes do extrato tanto do estrato córneo como da epiderme viável e derme foram adequados e utilizando-se o método de quimioluminescência para a quantificação, procedeu-se os estudos de penetração/retenção *in vitro*.

4.3.3.4.1. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de uma formulação adicionada de diferentes quantidades de extrato de açaí

Para a realização dessa quantificação, as formulações gel-creme adicionadas de extrato de açaí nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, juntamente com a formulação gel-creme placebo, foram submetidas ao estudo com células de difusão vertical. Como o sistema desse estudo é composto por seis células de difusão, preparou-se para cada experimento, três células de difusão adicionadas de formulação com extrato em uma dada concentração e três células adicionadas de formulação placebo. Após as 12 horas do estudo de penetração, procedeu-se conforme descrito no item 3.4.3.5. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada formulação.

Os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência das formulações gel-creme adicionadas de extrato de açaí nas diferentes concentrações (amostras) na epiderme viável e derme e das formulações placebo, obtidos após o estudo com células de difusão vertical estão representados na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagens de inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme após estudo de penetração de formulações gel-creme adicionadas de diferentes quantidades de extrato de açaí e de formulações gel-creme placebo

Quantidade de extrato na formulação	Inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme (%)					
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
0,5%	59,099	50,553	8,546			
	56,371	53,332	3,039	4,537	3,509	77,344
	50,936	48,911	2,025			
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
1,0%	68,996	57,937	11,059			
	54,785	48,990	5,795	8,275	2,645	31,968
	52,808	44,837	7,971			
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
2,0%	52,567	37,876	14,691			
	51,213	34,782	16,430	16,747	2,232	13,325
	47,052	27,931	19,120			

A análise dos resultados obtidos mostrou que a diferença entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a formulação gel-creme adicionada de 0,5% de extrato (F2E) e sua formulação placebo apresentou média de 4,537%. Quando 1% de extrato foi adicionado na formulação (F1E), a média da diferença da porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida foi de 8,275%. E ao se adicionar 2% de extrato nessa mesma formulação (F3E) a média da diferença da porcentagem de inibição da quimioluminescência foi de 16,747%.

Observou-se que os coeficientes de variação (CV) das diferenças entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência das amostras e dos placebos foram altos. O CV calculado para a formulação adicionada de 0,5% de extrato de açaí foi de 77,344%, o medido para a formulação com 1% de extrato foi de 31,968% e o calculado para a formulação adicionada de 2% de extrato de açaí foi de 13,325%. Assim, somente esse último ficou de acordo com o valor de no máximo 15%, recomendado pela ANVISA para métodos bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003).

Esse resultado não impede a realização de estudos de penetração/retenção de formulações adicionadas de concentrações menores que 2% de extrato de açaí. Porém, nesses casos, as amostras obtidas da extração da pele com metanol:água (80:20) devem ser concentradas antes das suas quantificações. Essas amostras, extraídas com 2 mL de solvente extrator, podem ser secas e depois ressuspensas em um volume adequado para se obter porcentagem de inibição da quimioluminescência situada no meio da faixa linear (Figura 6). Nesse trabalho, esse processamento das amostras não foi realizado, com a finalidade de se obter um estudo comparativo entre os coeficientes de variação do método de quantificação para as três formulações, no qual é necessário que as amostras estejam nas mesmas condições. Dessa forma, os 10 µL de amostra extraída com 2 mL de solvente, foram adicionados diretamente no meio reacional.

Verificou-se que quanto menor foi a quantidade de extrato de açaí adicionado na formulação, maior foi o coeficiente de variação obtido. Foi visto no item 4.3.3.1, que o solvente metanol:água (80:20), escolhido como solvente extrator, pode ser capaz de extrair componentes antioxidantes da pele, o que provoca uma interferência na medida da atividade antioxidante dos componentes do extrato que penetraram na epiderme viável e derme. Sabe-se que quanto menor for a quantidade de extrato presente na formulação, menor seria a quantidade de componentes antioxidantes do extrato que conseguiriam penetrar na pele. Assim, a diferença entre a inibição da quimioluminescência provocada por formulação adicionada de baixa quantidade de extrato na epiderme viável e derme e a inibição da quimioluminescência provocada por formulação placebo é pequena, podendo resultar em erros de análise maiores.

Ao contrário, quando se adiciona grande quantidade de extrato de açaí na formulação, espera-se que uma maior quantidade de componentes antioxidantes presentes no extrato penetre na pele. Assim, a inibição da quimioluminescência provocada por formulação adicionada de alta quantidade de extrato na epiderme viável e derme seria bem maior que a inibição provocada por formulação placebo, o que conduziria a erros de análise menores.

Além da interferência inerente da pele na avaliação da penetração/retenção dos componentes antioxidantes do extrato de açaí, tem-se que o estudo de penetração/retenção utilizando células de difusão vertical é um método *in vitro*, que possui várias fontes de erro. Dentre esses pode-se citar variações no aparato

utilizado, como agitação do meio receptor das células, variações na espessura das secções de pele utilizadas, variações no tamanho das peles após picotá-las, perdas de solução extraída no fundo do tubo, entre várias outras.

Adicionalmente, o método de determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase possui elevado erro intrínseco, visto que é baseado em duas reações químicas, sendo elas a reação da xantina com a enzima xantina oxidase, produzindo o radical superóxido, que por sua vez oxida o luminol e a reação de sequestro do radical formado pelo extrato de açaí. Ainda, viu-se que esse método requer habilidade do analista, além do treinamento desse antes da realização da análise a fim de minimizar erros na execução do método.

Diante do exposto, as variações nas porcentagens de inibição da quimioluminescência observadas para as triplicatas das amostras e dos placebos, foram consideradas aceitáveis. Ainda, os desvios padrão das diferenças entre as porcentagens de inibição das amostras e dos placebos, para as três formulações avaliadas, foram menores que 5%, indicando uma coerência dos resultados obtidos.

Conforme visto anteriormente, no item 4.2.3 (Figura 6), tem-se uma relação linear entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência e a concentração de extrato de açaí até o valor de 60% de inibição. Os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidos nesse estudo mostraram valores abaixo ou próximos de 60%. Assim, foi possível determinar a quantidade de extrato que penetrou/reteve na epiderme viável e derme.

Para a realização dessa quantificação, os resultados das diferenças entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para as formulações adicionadas de diferentes quantidades de extrato na epiderme viável e derme e as formulações placebo foram comparados com o IC_{50} do extrato de açaí, fazendo-se uma relação direta. Dessa forma, a Figura 10 mostra a relação entre a quantidade de extrato adicionado na formulação gel-creme e a quantidade de extrato retido na epiderme viável e derme.

Figura 10: Quantidade de extrato de *Euterpe oleracea* retida na epiderme viável e derme, proporcionada por formulação gel-creme adicionada de diferentes quantidades de extrato nos estudos de penetração/retenção, em que E = extrato de *Euterpe oleracea*. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM.

A figura da quantidade de extrato adicionado nas formulações pela quantidade de extrato de açaí retido na epiderme viável e derme apresentou valor de $r = 0,9996$, estando acima do valor de 0,98 preconizado pela ANVISA para ensaios bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003). Observou-se que apesar de todos os erros inerentes, tanto do ensaio de penetração/retenção utilizando célula de difusão vertical, quanto do método de determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, esses resultados sugerem uma relação linear entre a quantidade de extrato presente na formulação e a quantidade de extrato que foi capaz de penetrar/reter na epiderme viável e derme. Isso indica que o método de extração dos componentes antioxidantes do extrato foi eficiente na retirada desses da pele e ainda, que o método de quimioluminescência escolhido para a quantificação mostrou-se eficaz na quantificação do extrato de açaí nos estudos com célula de difusão vertical.

Ainda, apesar de visto que a formulação gel-creme adicionada de 2% de extrato de açaí gerou maior diferença entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência da formulação adicionada de extrato e sua formulação placebo, podendo resultar em menores erros de análise (CV), as formulações avaliadas nesse estudo foram adicionadas de 1% de extrato. Isso foi feito por razões

cosméticas, já que ao se adicionar 2% de extrato de açaí nas formulações, essas ficaram muito escuras, devido à cor roxa desse extrato. Assim, a aplicação dessa formulação topicamente manchou a pele, permanecendo a coloração arroxeada mesmo após a remoção da formulação. Esse fato inviabilizou a utilização de formulações adicionadas de quantidades de extrato maiores que 1%.

4.3.3.4.2. Quantificação por quimioluminescência da penetração/retenção de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí

A penetração/retenção de ativos na pele é influenciada pelo veículo utilizado nas formulações tópicas, que pode ser responsável pela diminuição ou aumento da penetração desses ativos. Sendo assim, diferentes formulações preparadas com 1% de extrato foram avaliadas quanto à capacidade de proporcionar a penetração/retenção dos componentes antioxidantes do extrato na epiderme viável e derme, utilizando a inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase.

Assim como realizado no item 4.3.3.4.1, para avaliar essa penetração/retenção, as diferentes formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí (F1E, F4E, F6E, F8E e F9E) foram submetidas ao estudo com células de difusão vertical, juntamente com suas respectivas formulações placebo. Da mesma forma, preparou-se para cada experimento, três células de difusão adicionadas de determinada formulação com extrato e três células adicionadas de sua formulação placebo. Após as 12 horas do estudo de penetração, procedeu-se conforme descrito no item 3.4.3.5. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada formulação.

Os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidos para as diferentes formulações adicionadas de 1% extrato de açaí (amostras) na epiderme viável e derme e para as formulações placebo, após o estudo com células de difusão vertical estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagens de inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme após estudo de penetração de formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí e de suas formulações placebo

Formulação	Inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme (%)					
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
F1E (gel-creme)	48,805	39,995	8,810			
	46,246	37,864	8,382	8,230	0,669	8,123
	48,841	41,342	7,499			
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
F4E (gel)	34,556	31,036	3,520			
	37,782	32,905	4,877	4,379	0,747	17,056
	36,342	31,603	4,739			
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
F6E (creme lanette)	46,882	33,751	13,131			
	51,542	35,063	16,479	15,189	1,801	11,859
	45,700	29,743	15,957			
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
F8E (gel-creme com 5% de ácido oleico)	38,118	37,778	0,340			
	37,027	35,916	1,111	0,719	0,386	53,639
	41,005	40,299	0,706			
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
F9E (gel-creme com 1% de ácido oleico)	20,721	23,502	-2,781			
	23,097	29,437	-6,340	-4,809	1,831	38,071
	20,890	26,197	-5,307			

Analisando-se os resultados obtidos tem-se que a diferença entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a formulação gel-creme F1E e sua formulação placebo apresentou média de 8,230%. Para a formulação gel F4E, essa diferença teve média de 4,379%. A formulação creme F6E, elaborada com lanette, apresentou média da diferença de 15,189%. Já a formulação gel-creme F8E, adicionada de 5% de ácido oleico, mostrou média da

diferença de 0,719%, enquanto que a formulação gel-creme F9E, elaborada com 1% de ácido oleico, apresentou média da diferença de -4,809%.

Verificou-se que os coeficientes de variação (CV) das diferenças entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência das amostras e dos placebos foram altos, sendo que somente os CV calculados para as formulações F1E, de 8,123% e F6E, de 11,859% ficaram em acordo com o valor de no máximo 15%, recomendado pela ANVISA para métodos bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003).

No geral, observou-se que quanto menor foi a média da diferença entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a formulação adicionada de 1% de extrato de açaí e sua formulação placebo, maior foi o valor do CV calculado. Isso pode ser devido à interferência da pele na media da atividade antioxidante dos componentes do extrato que penetraram na epiderme viável e derme. Desse modo, sugere-se que quanto menor for a capacidade da formulação elaborada em promover a penetração/retenção dos componentes antioxidantes do extrato de açaí na epiderme viável e derme, menor será a diferença entre a inibição da quimioluminescência provocada por essa formulação e sua formulação placebo, podendo resultar em erros de análise maiores.

Conforme visto no item 4.3.3.4.1, são várias as fontes de erro inerentes tanto do estudo *in vitro* de penetração/retenção utilizando células de difusão vertical, quanto do método de determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, além da interferência intrínseca da pele na avaliação da penetração/retenção dos componentes antioxidantes do extrato de açaí.

Diante disso, as variações nas diferenças entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência das amostras e dos respectivos placebos, foram consideradas esperadas. Apesar desse alto valor de CV encontrado, os valores das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidos para as triplicatas das amostras foram próximos, sendo o mesmo observado para as triplicatas dos placebos, em todas as formulações avaliadas. Ainda, os desvios padrão das diferenças entre as porcentagens de inibição das amostras e dos placebos foram menores que 5% para todas as formulações analisadas, indicando uma coerência dos resultados obtidos.

Como todos os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidos mostraram valores abaixo de 60% de inibição, estando

dentro da faixa linear do método de quimioluminescência (Figura 6), foi possível determinar a quantidade de extrato de açaí que penetrou/reteve na epiderme viável e derme.

Essa quantificação foi realizada comparando-se as diferenças obtidas entre as porcentagens de inibição da quimioluminescência das formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí na epiderme viável e derme e suas respectivas formulações placebo com o valor de IC_{50} do extrato de açaí, fazendo-se uma relação direta. Na Figura 11 encontram-se os resultados das formulações avaliadas *versus* quantidade de extrato retido na epiderme viável e derme.

Figura 11: Quantidade de extrato de *Euterpe oleracea* retida na epiderme viável e derme, proporcionada por diferentes formulações adicionadas de 1% de extrato nos estudos de penetração/retenção, em que E = extrato de *Euterpe oleracea*. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. Valores representados por (*) foram estatisticamente diferentes, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni's, com $p < 0,05$.

Os resultados mostraram que as formulações avaliadas proporcionaram diferenças significativas na penetração/retenção do extrato de açaí na epiderme viável e derme.

A primeira formulação testada foi a F1E, uma formulação gel-creme elaborada com Hostacerin. Essa foi escolhida por ser de fácil preparo e fácil solubilização do extrato. O resultado da penetração/retenção mostrou uma quantidade de extrato de 7,851 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele.

A segunda formulação avaliada foi uma formulação gel, elaborada com Aristoflex. Essa também é uma formulação de fácil preparo e fácil solubilização do extrato. Testou-se essa formulação a fim de verificar se proporcionaria uma menor penetração/retenção do extrato do que a obtida com a formulação gel-creme, visto que o extrato de açaí, por ser bastante solúvel em água, tenderia a ficar preso no gel. Os resultados encontrados confirmaram essa hipótese, já que essa formulação permitiu a penetração/retenção de 4,177 μg de extrato por cm^2 de pele.

A próxima formulação testada foi uma formulação creme (F6E), que teoricamente proporcionaria uma maior penetração/retenção do extrato, que tenderiam a sair da formulação e ir para a pele. O resultado obtido para essa formulação mostrou uma quantidade de extrato de 14,489 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele, devido possivelmente à composição graxa dessa formulação.

A quarta formulação testada foi uma formulação gel-creme, elaborada com Hostacerin adicionada de 5% de ácido oleico, ácido graxo conhecidamente utilizado como um promotor de absorção. Esse ácido graxo monoinsaturado age penetrando na bicamada lipídica da pele e afastando os fosfolipídios das membranas devido à sua estrutura molecular (SILVA, 2012). Nesse sentido, a adição desse componente na formulação gel-creme, aumentaria a capacidade dessa de promover a penetração do extrato na epiderme viável e derme. Ao analisar os resultados obtidos, viu-se que essa formulação permitiu a penetração/retenção de 0,686 μg de extrato por cm^2 de pele, ou seja, cerca de 11 vezes menos que a obtida com a mesma formulação sem ácido oleico (F1E). Viu-se que ao aplicar a formulação F8E na pele de orelha de porco, essa não aderiu muito bem, devido possivelmente a grande quantidade de óleo adicionada na formulação.

Avaliou-se, posteriormente, a formulação F9E, elaborada adicionando-se uma menor quantidade de ácido oleico (1%), a fim de analisar se o efeito de promoção da absorção pertencente a esse composto iria favorecer a penetração do extrato de açaí na epiderme viável e derme. Os resultados mostraram ausência de penetração/retenção, constatada pela não diferença de atividade inibitória da quimioluminescência entre a amostra e o placebo. No momento da aplicação dessa formulação na pele de orelha de porco viu-se que essa aderiu mais facilmente à pele do que a formulação F8E, elaborada com 5% de ácido oleico, porém essa adesão foi menor que a obtida quando as formulações F1E, F4E e F6E foram aplicadas na

pele. Sugere-se então, que o extrato não é favorecido pelo mecanismo de promoção da absorção de ácidos graxos monoinsaturados.

Diante de todos os resultados obtidos, viu-se que a formulação que proporcionou uma maior penetração/retenção do extrato de açaí na epiderme viável e derme foi a F6E, elaborada com creme Lanette.

Além disso, os resultados obtidos para as diferentes formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí mostraram diferenças na quantidade de extrato penetrado/retido na epiderme viável e derme. Isso indica que, apesar de todos os erros inerentes, tanto do ensaio de penetração/retenção utilizando célula de difusão vertical, quanto do método de determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase, o método de extração dos componentes antioxidantes do extrato foi eficiente na retirada desses da pele e ainda, que o método de quimioluminescência escolhido para a quantificação mostrou-se eficaz na quantificação do extrato de açaí nos estudos com célula de difusão vertical.

Comparando-se o resultado obtido para formulação gel-creme F1E nesse estudo com o obtido para a mesma formulação no item 4.3.3.4.1, tem-se que as médias encontradas para as diferenças entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a amostra e sua formulação placebo foram muito próximas. Esses dados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Porcentagens de inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme após estudo de penetração de formulação gel-creme adicionada de 1% de extrato de açaí e de formulação gel-creme placebo

F1E (gel-creme)	Inibição da quimioluminescência na epiderme viável e derme (%)					
	Amostra	Placebo	Diferença (A-P)	Média	DP	CV (%)
Estudo Anterior	68,996	57,937	11,059			
	54,785	48,990	5,795	8,275	2,645	31,968
	52,808	44,837	7,971			
Estudo Posterior	48,805	39,995	8,810			
	46,246	37,864	8,382	8,230	0,669	8,123
	48,841	41,342	7,499			

Observou-se que as porcentagens de inibição da quimioluminescência encontradas tanto para a formulação F1E, quanto para sua formulação placebo, foram maiores no estudo anterior. Além disso, o coeficiente de variação calculado para o ensaio anterior foi cerca de 4 vezes maior que o calculado para esse ensaio. Isso pode ser devido às diferenças nas peles de orelha de porco utilizadas para os diferentes experimentos. Verificou-se que diferenças de irrigação sanguínea nas peles de orelha de porco utilizadas, bem como o tempo de armazenamento dessas, geram diferenças na interferência da pele na medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência do extrato de açaí na epiderme viável e derme. Nesse sentido, peles recentemente armazenadas possuem maiores quantidades de antioxidantes inerentes ativos, como o GSH e a vitamina C, que são extraídos com o solvente extrator metanol:água (80:20). Da mesma forma, peles bastante irrigadas também promovem maior interferência pelo mesmo motivo. Assim, sugere-se utilizar peles de orelha de porco menos irrigadas e após o período de armazenamento de uma semana, a fim de minimizar a interferência dos componentes antioxidantes inerentes da pele na medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase.

Embora se tenha utilizado peles de orelha de porco diferentes para os dois estudos, sendo o experimento anterior realizado empregando pele mais recente, as médias das diferenças entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência da formulação gel-creme F1E e sua formulação placebo obtidas para ambos os ensaios não foram estatisticamente diferentes (teste *t student*). Isso indica, mais uma vez, que o método de extração dos componentes antioxidantes do extrato de açaí foi eficiente na retirada desses da pele e ainda, que o método de quimioluminescência escolhido para a quantificação mostrou-se eficaz na quantificação do extrato de açaí nos estudos com célula de difusão vertical.

4.3.3.4.3. Quantificação por quimioluminescência de componentes antioxidantes de diferentes formulações adicionadas de extrato de açaí retidos no estrato córneo

Em experimentos de penetração *in vitro*, o estrato córneo é a camada limitante da penetração (ZATZ, 1993). Desta forma, após as 12 horas do estudo de penetração, foi realizado o procedimento de retirada do estrato córneo pelo processo de *tape stripping*, conforme item 3.4.3.4.

De acordo com o item 4.3.3.3, os componentes da fita e os componentes da pele que foram extraídos nesse estudo, não apresentaram atividade antioxidante e, portanto, não interferiram no método. Assim, somente os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidos para as diferentes formulações adicionadas de 1% extrato de açaí (amostras) foram analisadas no estrato córneo. Esses resultados estão representados na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagens de inibição da quimioluminescência no estrato córneo após estudo de penetração de formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí

Formulação	Inibição da quimioluminescência no estrato córneo (%)			
	Amostra	Média	DP	CV (%)
F1E (gel-creme)	26,774			
	23,825	25,382	1,481	5,836
	25,546			
F4E (gel)	22,057			
	23,781	24,575	2,996	12,189
	27,888			
F6E (creme lanette)	4,121			
	5,096	4,838	0,629	13,008
	5,298			
F8E (gel-creme com 5% de ácido oleico)	20,072			
	17,011	17,822	1,973	11,072
	16,384			
F9E (gel-creme com 1% de ácido oleico)	17,998			
	14,296	17,485	2,966	16,963
	20,161			

A análise dos resultados obtidos mostra que a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a formulação gel-creme F1E apresentou média de 25,382%. Para a formulação gel F4E, a porcentagem de inibição teve média de 24,575%. A formulação creme F6E, elaborada com lanette, apresentou média de inibição de 4,838%. Já a formulação gel-creme F8E, adicionada de 5% de ácido oleico, mostrou média de inibição de 18,089%, enquanto que a formulação gel-creme F9E, elaborada com 1% de ácido oleico, apresentou média de 17,485%.

Observou-se que os coeficientes de variação (CV) das porcentagens de inibição da quimioluminescência calculados para as amostras foram relativamente baixos, sendo que somente o CV medido para a formulação F9E, de 16,963%, ficou em desacordo com o valor de no máximo 15%, recomendado pela ANVISA para métodos bioanalíticos (BRASIL – ANVISA, 2003). Esses menores valores de CV obtidos na avaliação da inibição da quimioluminescência do extrato retido no estrato córneo, quando comparados com os valores de CV obtidos na avaliação da inibição do extrato retido na epiderme viável e derme (Tabela 6), podem ser devido a não influência da pele nessa medição.

Foi visto no item 4.3.3.4.1, que o método de determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase possui variadas fontes de erro. Apesar disso, as variações das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidas para as triplicatas das amostras foram baixas, indicando que esse método foi adequado para avaliar a inibição provocada pelo extrato de açaí retido no estrato córneo.

Como todos os resultados das porcentagens de inibição da quimioluminescência obtidos mostraram valores abaixo de 60% de inibição, estando dentro da faixa linear do método de quimioluminescência (Figura 6), foi possível determinar a quantidade de extrato de açaí que reteve no estrato córneo.

Essa quantificação foi realizada comparando-se as porcentagens de inibição da quimioluminescência das formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí no estrato córneo com o valor de IC_{50} do extrato de açaí, fazendo-se uma relação direta. A Figura 12 a seguir mostra os resultados das formulações avaliadas *versus* quantidade de extrato de açaí retido no estrato córneo.

Figura 12: Quantidade de extrato de *Euterpe oleracea* retida no estrato córneo proporcionada por diferentes formulações adicionadas de 1% de extrato de açaí, em que E = extrato de *Euterpe oleracea*. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. Valor representado por (*) foi estatisticamente diferente e valores representados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni's, com $p < 0,05$.

Todas as formulações estudadas promoveram a retenção do extrato de açaí no estrato córneo, verificado pelos valores das quantidades de extrato positivas apresentadas na Figura 12, demonstrando a função barreira dessa camada mais externa da epiderme.

As formulações gel-creme F1E e gel F4E apresentaram as maiores quantidades de extrato retido no estrato córneo, sendo essas de 24,211 e 23,442 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele, respectivamente. Esses valores obtidos não apresentaram diferença significativa.

As formulações gel-creme adicionadas de ácido oléico F8E e F9E, que não apresentaram diferença significativa na quantidade de extrato retido no estrato córneo, mostraram valores de 17,001 e 16,679 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele, respectivamente.

Já a formulação creme elaborada com Lanette (F6E) foi a que menos permitiu a retenção do extrato de açaí no estrato córneo, sendo que a quantidade apresentada por essa formulação foi de 4,615 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele.

Ao correlacionar esses resultados com os obtidos para a penetração/retenção (item 4.3.3.4.2), verifica-se que todas as formulações foram capazes de liberar o extrato de *Euterpe oleracea* após 12 horas de experimento. Essa liberação, porém,

pode ter ocorrido em velocidades diferentes, podendo ter afetado a penetração/retenção cutânea.

Além disso, a formulação F6E, que promoveu menor retenção do extrato de açaí no estrato córneo, apresentou maior penetração/retenção, possivelmente devido à quantidade de material graxo presente nessa formulação, que pode ter auxiliado na penetração de componentes do extrato de açaí para a epiderme viável e derme. Já as formulações F1E, F4E, F8E e F9E, apresentaram maior retenção do extrato de açaí no estrato córneo que na epiderme viável e derme, indicando que essas formulações foram menos eficazes em proporcionar a penetração/retenção do extrato na pele, sendo esse retido no estrato córneo.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que o extrato de açaí mostrou alta capacidade de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase, sendo essa inibição não influenciada pelos componentes das diferentes formulações estudadas.

Adicionalmente, a medida da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase pôde ser empregada como método de quantificação da penetração dos componentes do extrato de açaí na pele, uma vez que foi observada relação linear entre porcentagem de inibição da quimioluminescência e concentração de extrato de açaí até o valor de 60% de inibição. Ainda, esse método mostrou-se preciso e exato na determinação da porcentagem de inibição da quimioluminescência do extrato de açaí na concentração próxima a IC_{50} .

No entanto, o uso da quimioluminescência como um método de quantificação da penetração de componentes antioxidantes de extratos hidrossolúveis torna o processo de extração um fator importante, no qual a escolha do solvente extrator é um ponto crítico. Essa escolha deve ser baseada na capacidade desse solvente de extrair os componentes do extrato, mas não os compostos antioxidantes da pele, os quais interferem na quantificação. Assim, para a extração dos componentes do extrato de açaí que penetraram nas diferentes camadas da pele, o solvente metanol 80% deve ser utilizado, visto que esse solvente foi capaz de extrair os componentes antioxidantes do extrato de açaí sem retirar grande quantidade dos compostos com atividade antioxidante inerentes da pele. Ainda, a fim de minimizar a interferência da pele na determinação da inibição da quimioluminescência de extratos hidrossolúveis, deve-se utilizar pele de orelha de porco com baixa irrigação sanguínea e armazenada após o período de uma semana.

Outro ponto determinante no uso da quimioluminescência para a quantificação da penetração de extratos na pele é o próprio processo de extração. Nesse sentido, esse procedimento deve ser bem elaborado e executado, a fim de se ter recuperação e precisão adequadas. Desse modo, a fragmentação da pele, o tempo de extração, a agitação dos fragmentos de pele com o solvente escolhido, bem como a centrifugação, são fatores determinantes para a extração apropriada do extrato de açaí.

Finalmente, a determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase mostrou-se um método importante na medida da atividade antioxidante de extratos na pele. Ainda, esse método foi eficaz na quantificação do extrato de açaí nos estudos de penetração/retenção com célula de difusão vertical, apesar de todos os erros inerentes desse método.

Referências

6. REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas, Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª Ed. São Paulo, Editorial Premier, p. 397-400, 1999.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 571, p. 153-173, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2ª edição, Artmed Editora, 2005.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: M. Dekker, 1983.

BERTOLINI, W., L., H. M. **A influência do D-limoneno como promotor de absorção do ácido 5-aminolevulínico para terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas**. 2009. 118f. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. **Nature**, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potencial protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.145, p.87-94, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 27 de fevereiro de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 13 de junho de 2013.

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.

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.

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

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

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.

CHIEN, Y.W. Transdermal drug delivery and delivery systems. In: _____. **Novel drug delivery systems: Drug and the pharmaceutical sciences**. New York: Marcel Dekker, 1992. v.50, cap.7, p.301-380.

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.

CRODA. Disponível em <<http://www.croda.com.br>>. Acesso em 24 de outubro de 2011.

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

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminal em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1003-1011, 2002.

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.

FONSECA, Y. M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de calêndula** 2009. 152f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

FORTE, A. L. A. S. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. 2012. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

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.

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

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

HEINRICH, M.; DHANJI T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, 2010.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. **Euterpe, prestoca, and neonicholsonia** (Palmae: Euterpeinae). New York: New York Botanical Garden, 1996. 90p. (Flora Neotropica, 72).

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.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, v. 305, p. 75-80, 2001.

JARDIM, M. A. G.; ANDERSON, A. B. Manejo de populações nativas de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) no estuário amazônico: resultados preliminares. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n. 15, 1987.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, p. 149-157, 2000.

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

LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, São Carlos, v. 27, n.2, p. 337-341, 2004.

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

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.

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.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. A indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1745-1750, 2000.

MELONI, M.; NICOLAY, J.F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 609-613, 2003.

MORAIS, I. P. A.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. An overview on flow methods for the chemiluminescence determination of phosphorus. **Talanta**, v. 66, p. 341-347, 2005.

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.

NOGUEIRA, O. N.; MULLER, A. A.; HOMMA, A. K. O. Possibilidades de produção de frutos de açaizeiros em área de terra firme no Estado do Pará. **Contribuição ao desenvolvimento da fruticultura na Amazônia**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 91-97, 2006.

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.

OLIVEIRA, F. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo**. 2007. 155f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

OLIVEIRA, M. S. P. **Biologia floral do açaizeiro em Belém, PA**. Belém. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 26p., 2002.

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.

PHARMASPECIAL, ESPECIALIDADES QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS LTDA.: Disponível em: <<http://www.pharmaspecial.com.br>>. Acesso em 24 de outubro de 2011.

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

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.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 2000. 313p.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F. Quimioluminescência e bioluminescência. **Química Nova**, v. 16(3), p. 200-209, 1992.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 8604-8610, 2006a.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 8598-8603, 2006b.

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**, v. 485, p. 169-176, 2001.

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. 119f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

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, 2007.

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.

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, 2007.

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.

VILELA, F. M. P. **Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

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.

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.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Amsterdam, v. 56, n.5, p. 603 -618, 2004.

WOISKY, R.G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

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.