UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade
antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor

Tatiana Santana Balogh

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^ª. Assoc^a. Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade
antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor

Tatiana Santana Balogh

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^ª. Assoc^a. Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Balogh, Tatiana Santana
B195u Uso cosmético de extratos glicólicos : avaliação da atividade
antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor /
Tatiana Santana Balogh. -- São Paulo, 2011.
244p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

1. Produtos naturais : Cosméticos 2. Fator de de proteção
solar : Cosméticos 3. Fitoquímica I. T. II. Velasco, Maria Valéria
Robles, orientador.

668.55 CDD

Tatiana Santana Balogh

Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Assoc^a. Maria Valéria Robles Velasco
orientadora/presidente

Prof^a. Dr^a. Gislaine Ricci Leonardi
1^a. examinadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes
2^a. examinadora

São Paulo, 20 de junho de 2011.

DEDICATÓRIA

A **Deus**

Aos meus pais **Oswaldo Balogh e Rosane Ferraz Santana Balogh**

Aos meus avós maternos **José Lourenço Santana** (*in memoriam*) e **Essy Ferraz Santana**

Aos meus avós paternos **Adalberto Balogh e Terezia Wiborny Balogh** (*in memoriam*)

Aos meus irmãos **Rodrigo Wiborny Balogh, Vanessa Wiborny Balogh Basseto, Priscila Santana Balogh e Denise Balogh**

Aos meus sobrinhos **Lucas Wiborny Balogh Basseto, Mateus Wiborny Balogh Basseto, Giovanna Azevedo Pedreira e Márcio Azevedo Pedreira**

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente” (autor desconhecido)

A **Deus** por estar ao meu lado em todos os momentos e por me ajudar nos mais difíceis (*“E eis que estou contigo, e te guardarei por onde quer que fores”* Gn 28:15)

À minha querida família, pais, avós, irmãos, sobrinhos, tios, primos e cunhados por todo o apoio, suporte, incentivo e carinho.

À minha orientadora Prof^a. Assoc^a. **Maria Valéria Robles Velasco** pela orientação ao longo de quatro anos desde a iniciação científica, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos meus amigos da Pós-Graduação **Carla Aparecida Pedriali Moraes, Paula Souza Prestes, Robson Miranda da Gama e Roxana Lili Roque Flores** pelas contribuições acadêmicas, pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. **Antônio Salatino**, Prof^a. Dr^a. **Maria Luiza Faria Salatino**, Prof^a. Titular **Elfriede Marianne Bacchi, Mourisa Maria de Souza Ferreira, Alberto Vetore Neto e Roberto de Jesus Honório** pelas contribuições nos ensaios de determinação do teor de polifenóis e flavonoides totais e nos ensaios de cromatografia em camada delgada.

À Prof^a. Assoc^a. **Maricê Nogueira de Oliveira**, Prof. Titular **Luiz Antonio Gioielli e Alexandre Mariami Rodrigues** pelo uso do espectrofotômetro durante os dois anos de mestrado e pelo uso do viscosímetro de Ostwald.

À Prof^a. Dr^a. **Inar Alves de Castro** e Dr. **Daniel Granato** pela realização do ensaio de ORAC e pelo uso do espectrofotômetro.

Ao Prof. Dr. **André Rolim Baby** pelo incentivo à realização desse trabalho, pelo uso do equipamento Labsphere® UV-2000 S e por suas contribuições acadêmicas.

Ao Prof. Dr. **Marlus Chorilli** e Prof^a. Dr^a. **Edna Tomiko Myiake Kato** por terem participado da banca de qualificação desse trabalho e por suas contribuições.

À Prof^a. Dr^a. **Gislaine Ricci Leonardi** e Prof^a. Dr^a. **Patrícia Santos Lopes** por terem participado da banca de defesa desse trabalho e por suas contribuições.

Às estagiárias **Natália Mencacci Esteves Pedro, Katyucia Sulamy de Souza Raia e Elaine Cabral Serrão** pela ajuda na execução desse trabalho e pela amizade.

Às estagiárias **Fernanda Akemi Konishi** e **Erica Junko Waki Kagiya** por me permitirem aprender através da orientação de seus trabalhos e pela amizade.

À estagiária **Mayara Munhóz de Assis Ramos** pela ajuda nos ensaios de atividade antioxidante, pela revisão do *abstract* desse trabalho e pela amizade.

À **Doralice Rita de Jesus Santos** pelos cafezinhos diários, pelo carinho e por suas orações.

À **Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto** e **Edgar Júnior** pelo apoio na execução desse trabalho e pela amizade.

Às amigas farmacêuticas **Ana Luisa Salvador Alvarez**, **Danielly de Mello Tavares**, **Maria Cristina Ferreira da Cunha**, **Priscila Caldeira de Oliveira Andrade**, e **Vivian Cristina Borges Zanholo** pelos encontros semestrais, incentivo, apoio e amizade.

A todos os alunos de Pós-Graduação do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia da FCF-USP pela convivência e pelas contribuições acadêmicas.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da FCF-USP pela prontidão em me ajudar quando precisei.

Aos funcionários do xérox do Bloco 19 pelos momentos de descontração envolvendo assuntos futebolísticos.

A todos os funcionários da limpeza da FCF-USP que mantiveram o laboratório sempre em condições adequadas para a execução desse trabalho e a todos os seguranças da FCF-USP por garantirem a tranquilidade e pelo auxílio na abertura dos laboratórios aos finais de semana.

Ao Dr. **Luiz Gustavo Martins Matheus** pela gentileza de me mostrar o processo de obtenção de extratos glicólicos em sua empresa (Mapric[®]) e **Hamilton dos Santos** pelas placas de PMMA.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por me proporcionarem ensino de qualidade ao longo de quase dez anos e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que contribuíram com a minha formação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a execução desse trabalho!

Senhor, tu me sondas e me conheces.

Tu conheces o meu sentar e o meu levantar; de longe entendes o meu pensamento.

Esquadrinhas o meu andar, e o meu deitar, e conheces todos os meus caminhos.

Sem que haja uma palavra na minha língua, eis que, ó Senhor, tudo conheces.

Tu me cercaste em volta, e puseste sobre mim a tua mão.

Tal conhecimento é maravilhoso demais para mim; elevado é, não o posso atingir.

Para onde me irei do teu Espírito, ou para onde fugirei da tua presença?

Se subir ao céu, tu aí estás, se fizer no Seol a minha cama, eis que tu ali estás também.

Se tomar as asas da alva, se habitar nas extremidades do mar, ainda ali a tua mão me guiará e a tua destra me susterá.

Se eu disser: Ocultem-me as trevas; torne-se em noite a luz que me circunda;

Nem ainda as trevas são escuras para ti, mas a noite resplandece como o dia; as trevas e a luz são para ti a mesma coisa.

Pois tu formaste os meus rins; entreteceste-me no ventre de minha mãe.

Eu te louvarei, porque de um modo tão admirável e maravilhoso fui formado; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem.

Os meus ossos não te foram encobertos, quando no oculto fui formado, e esmeradamente tecido nas profundezas da terra.

Os teus olhos viram a minha substância ainda informe, e no teu livro foram escritos os dias, sim, todos os dias que foram ordenados para mim, quando ainda não havia nenhum deles.

E quão precioso me são, ó Deus, os teus pensamentos! Quão grande é a soma deles!

Sonda-me, ó Deus, e conhece o meu coração; prova-me, e conhece os meus pensamentos; Vê se há em mim algum caminho perverso, e guia-me pelo caminho eterno.

Conta as bênçãos

*Se da vida as vagas procelosas são,
Se com desalento julgas tudo vão
Conta as muitas bênçãos, dize-as duma vez,
Hás de ver surpreso quanto Deus já fez.*

*Conta as bênçãos, conta quantas são.
Recebidas da divina mão.
Uma a uma, dize-as de uma vez,
Hás de ver surpreso quanto Deus já fez.*

*Tens acaso mágoas, triste é teu lidar?
É a cruz pesada que tens de levar ?
Conta as muitas bênçãos, não duvidarás,
E em canção alegre os dias passarás.*

*Conta as bênçãos, conta quantas são.
Recebidas da divina mão.
Uma a uma, dize-as de uma vez,
Hás de ver surpreso quanto Deus já fez.*

*Quando vires outros com seu ouro e bens,
Lembra que tesouros prometidos tens
Nunca os bens da terra poderão comprar,
A mansão celeste em que tu vais morar.*

*Conta as bênçãos, conta quantas são.
Recebidas da divina mão.
Uma a uma, dize-as de uma vez,
Hás de ver surpreso quanto Deus já fez.*

*Seja teu conflito fraco ou forte cá,
Não te desanimes, Deus por cima está
Seu divino auxílio, minorando o mal,
Te dará consolo e paz celestial.*

*Conta as bênçãos, conta quantas são.
Recebidas da divina mão.
Uma a uma, dize-as de uma vez,
Hás de ver surpreso quanto Deus já fez.*

*“Ao rei dos séculos, imortal, invisível, ao único Deus seja honra e glória para todo o sempre. Amém.”
(I Timóteo 1:17)*

“Eu sou a videira, vós, as varas; quem está em mim, e eu nele, este dá muito fruto, porque sem mim nada podereis fazer.” (João 15:5)

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.” (Salmos 37:5)

“Guia-me sempre, meu Senhor; Guia meus passos, Salvador; Tu me compraste sobre a cruz; Rege-me em tudo, meu Jesus.” (Harpa Cristã 141)

RESUMO

BALOGH, T.S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor.** São Paulo. 2011. 244f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Extratos vegetais glicólicos são amplamente utilizados em formulações cosméticas devido às várias atividades clínicas atribuídas aos mesmos. O presente trabalho teve por objetivo selecionar os seis extratos comerciais glicólicos não padronizados com maiores teores de polifenóis e flavonoides totais e com maior atividade antioxidante dentre doze extratos [açai (*Euterpe oleracea*), acerola (*Malpighia glabra* L.), castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), chá verde (*Camellia sinensis*), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), framboesa (*Rubus idaeus* L.), ginko (*Ginkgo biloba* L.), menta (*Mentha piperita* L.), morango (*Fragaria vesca* L.), própolis, romã (*Punica granatum* L.) e uva (*Vitis vinifera* L.)] para realização de Estudo da Estabilidade e avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos mesmos. A dissertação foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo, os doze extratos glicólicos foram avaliados quanto à presença e teor de flavonoides e polifenóis totais, bem como, quanto à atividade antioxidante determinada por DPPH e ORAC. Os extratos de romã, erva-mate, menta, própolis, ginko e chá verde apresentaram os maiores teores de polifenóis e flavonoides totais. Assim, os mesmos foram selecionados para as etapas seguintes do estudo. O capítulo 2 apresentou o estudo da estabilidade, ao longo de 90 dias, dos seis extratos selecionados. Avaliaram-se as características organolépticas, o valor do pH, da viscosidade dinâmica e da densidade absoluta, o teor de polifenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante nas condições geladeira, estufa e temperatura ambiente com proteção da incidência de luz solar e exposta à luz solar indireta. Variações superiores ao intervalo de $\pm 10,0$ % foram observadas em todos os extratos, em pelo menos um parâmetro estudado. O extrato de chá verde apresentou variações no valor de pH, no teor de polifenóis e flavonoides totais e na atividade antioxidante. O extrato de ginko apresentou variações nos mesmos parâmetros que o extrato de chá verde, exceto no valor de pH. Teor de polifenóis totais e atividade antioxidante foram os parâmetros alterados no extrato de menta. Esses três extratos devem ser armazenados em geladeira (5 °C), ao abrigo da luz solar. Teor de flavonoides totais e valor da atividade antioxidante foram os parâmetros alterados no extrato de erva-mate. O extrato de própolis apresentou variações no teor de polifenóis e flavonoides totais. Observou-se que esses dois extratos podem ser armazenados à temperatura ambiente ou em geladeira. O extrato de romã demonstrou alterações no valor da atividade antioxidante e sua estabilidade não foi afetada em temperatura elevada (45 °C). No capítulo 3, avaliou-se a eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS estimado), por espectrofotometria de reflectância difusa e análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur), desses seis extratos, incorporados em formulações contendo ou não o filtro solar químico de amplo espectro bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina (Escalol[®] S). Observou-se que o valor de FPS foi proporcional à quantidade de filtro utilizado nos resultados do método de Mansur. Formulações com ou sem adição dos extratos glicólicos e com 2,5% p/p do filtro solar apresentaram FPS variando no intervalo de 3,57 a 4,07; enquanto que, aquelas que continham 5,0% p/p do filtro aditivadas ou não de extrato glicólico apresentaram valores de FPS variando na faixa de 6,13 a 7,57. Os resultados gerados pelo espectrofotômetro de reflectância difusa indicaram FPS variando no intervalo de 6,0 a 7,0 para as formulações com 5,0% p/p de filtro aditivadas ou não de extrato glicólico e 3,0 a 4,5 para aquelas que continham 2,5% p/p do filtro solar com ou sem adição dos extratos. As duas metodologias empregadas revelaram ausência de sinergismo entre os extratos glicólicos e o filtro solar nas proporções utilizadas.

Palavras-chave: extrato vegetal, própolis, atividade antioxidante, estabilidade, Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* e método de Mansur

ABSTRACT

BALOGH, T.S. **Cosmetic use of glycolic extracts: antioxidant activity evaluation, stability study and photoprotection potential.** São Paulo. 2011. 244f. Dissertation (Master's Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

Glycolic botanical extracts have been widely used in cosmetic formulas due to their clinical activities. The objective of this study was to select six glycolic commercial extracts with higher polyphenol and flavonoid content and antioxidant activity in a group with twelve extracts [açai (*Euterpe oleracea*), acerola (*Malpighia glabra* L.), horse chesnut (*Aesculus hippocastanum* L.), green tea (*Camellia sinensis*), mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), raspberry (*Rubus idaeus* L.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), mint (*Mentha piperita* L.), strawberry (*Fragaria vesca* L.), propolis, pomegranate (*Punica granatum* L.) and grape (*Vitis vinifera* L.)] to do their stability study and their *in vitro* evaluation of photoprotection efficacy. The dissertation was divided in three chapters. In the first chapter, it was developed the polyphenolic and flavonoid content assays and the DPPH and ORAC antioxidant activity assays involving all the twelve extracts. The higher values of polyphenolic and flavonoid content were obtained in the extracts of pomegranate, mate tea, mint, propolis, ginkgo and green tea. Thus, they were selected to undergo the other studies. In chapter 2, it was presented the stability study of this six extracts during 90 days. Organoleptic characteristics, pH value, dynamic viscosity and absolute density values, polyphenolic and flavonoid content and the antioxidant activity in the conditions refrigerator, stove and room temperature with and without sun light exposition were evaluated. Variations higher than a range of 10,0 % were observed in all extracts in at least one studied parameter. The green tea extract presented significant variations in the pH value, polyphenolic and flavonoid content and in the antioxidant activity. The ginkgo extract presented variations in the same parameters, except for the pH value. Polyphenolic content and antioxidant activity were altered parameters in the mint extract. The extracts of ginkgo, green tea and mint must be stored in refrigerator (5 °C), protected from the sun light. The flavonoid content and antioxidant activity values were altered parameters in the mate tea extract. The propolis extract presented variations in the polyphenolic and flavonoids content. It was observed that this two extracts can be stored at room temperature or in the refrigerator. The pomegranate extract demonstrated alteration in the antioxidant activity, however the high temperature (45 °C) did not affect its stability. In chapter 3, it was evaluated the *in vitro* photoprotection efficacy (SPF estimated), by diffuse reflectance spectrophotometry and spectrophotometric analyses of diluted solutions (Mansur methods), of these six extracts, incorporated in formulas containing or not the broad spectrum filter bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Escalol® S). It was observed that the SPF value was proportional to the amount of filter used in the Mansur method. Formulas with and without the glycolic extracts and with 2,5% w/w of the sun filter presented SPF ranging from 3,57 to 4,07; the formulas with 5,0% w/w of sun filter containing or not extracts presented SPF values in the interval between 6,13 and 7,57. The results of diffuse reflectance spectrophotometry indicated SPF values in the interval of 6,0 to 7,0 for formulas with 5,0% w/w of sun filter with or without extracts and values in the interval of 3,0 to 4,5 for formulas with 2,5 w/w of sun filter containing or not extracts. Both methodologies used indicated lack of synergism between the glycolic extracts and sun filter in the proportions used.

Keyword: botanical extract, antioxidant activity, stability, *in vitro* Sun Protection Factor (SPF) and Mansur method

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 – Caracterização fitoquímica de extratos glicólicos

Figura 1	Conchas encontradas em sítio arqueológico de Múrcia (Espanha) com resíduo de pigmento ampliado (imagem à direita) (ZILHÃO et al., 2010)	4
Figura 2	Recipientes utilizados para o armazenamento de perfumes romanos (imagem à esquerda) e egípcios (imagem à direita) (MUSEU DEL PERFUM, 2010)	8
Figura 3	Representação do processo de percolação de material vegetal	10
Figura 4	Diagrama de obtenção de extratos vegetais (SALVADOR; CHISVERT, 2007)	12
Figura 5	Estruturas de um fenol simples e um ácido fenólico empregados em cosméticos (CUNHA, 2009; EVANS, 2009)	16
Figura 6	Núcleo fundamental dos flavonoides com a respectiva numeração (SIMÕES et al., 2007)	18
Figura 7	Estruturas de taninos hidrolisáveis e dos ácidos gálico e hexaidroxidifênico (QUEIROZ et al., 2002)	24
Figura 8	Estrutura de tanino condensado – Procianidina (QUEIROZ et al., 2002)	24
Figura 9	<i>Euterpe oleracea</i> - Detalhe de ramo frutificado (AÇAÍ - ARCHIVE FOR CATEGORY, 2010)	25
Figura 10	<i>Malpighia glabra</i> L. - Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Malpighia glabra</i> L., 2010)	26
Figura 11	<i>Aesculus hippocastanum</i> L. – Detalhe de frutos e sementes (MARRONNIER COMMUN, 2010)	27
Figura 12	<i>Camellia sinensis</i> - Detalhe de folhas frescas (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Camellia sinensis</i> , 2010)	29
Figura 13	<i>Ilex paraguariensis</i> - Detalhe de folhas frescas (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Ilex paraguariensis</i> , 2010)	30
Figura 14	<i>Rubus idaeus</i> L.- Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Rubus idaeus</i> L., 2010)	31
Figura 15	<i>Ginkgo biloba</i> L. – Detalhe de ramo vegetativo (A) e árvore (B) (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Ginkgo biloba</i> L., 2010)	32
Figura 16	<i>Mentha piperita</i> L. - Detalhe de folhas frescas (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Mentha piperita</i> L., 2010)	33
Figura 17	<i>Fragaria vesca</i> L. – Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Fragaria vesca</i> L., 2010)	34
Figura 18	Própolis marrom (A); amarela (B); verde (C) e vermelha (D). (MISCELLANEOUS BEE EQUIPMENT; NATUCENTRO PRÓPOLIS, 2010)	35
Figura 19	<i>Punica granatum</i> L. – Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Punica granatum</i> L., 2010)	36
Figura 20	<i>Vitis vinifera</i> L. – Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - <i>Vitis vinifera</i> L., 2010)	37
Figura 21	Reação entre o radical livre DPPH e um antioxidante (WANG et al., 2008).	45
Figura 22	Placa cromatográfica dos extratos glicólicos para o sistema com padrão de flavonoide rutina	50
Figura 23	Placa cromatográfica dos extratos glicólicos para o sistema com padrão de flavonoide quercetina	50

Figura 24	Curva analítica média do ácido gálico padrão de referência secundário (n=6)	51
Figura 25	Teor de polifenóis (mgEAG/mL) totais dos extratos glicólicos	55
Figura 26	Curva analítica do flavonoide quercetina padrão de referência secundário (n=6)	60
Figura 27	Teor de flavonoides (mgEQ/mL) totais dos extratos glicólicos	64
Figura 28	Curva analítica do Trolox [®] padrão de referência secundário (n=6)	67
Figura 29	Atividade antioxidante (μmolTE/mL) dos extratos glicólicos por DPPH	71
Figura 30	Curva analítica do Trolox [®] padrão de referência secundário 97% (n=6)	73
Figura 31	Atividade antioxidante (μmolTE/mL) dos extratos glicólicos por ORAC	75
Figura 32	Análise comparativa da atividade antioxidante (μmolTE/mL) dos extratos glicólicos por DPPH e ORAC	78

Capítulo 2 – Estudo da estabilidade de extratos glicólicos

Figura 1	Símbolo exigido para cosméticos com durabilidade maior que 30 meses (COSMETIC PRODUCTS (SAFETY) REGULATIONS, 2008)	96
Figura 2	Especificação de liberação e checagem como determinantes da vida de prateleira (BUTLER, 2000)	97
Figura 3	Viscosímetro de Ostwald modificado (Cannon-Fenske n° 300) utilizado no ensaio	112
Figura 4	Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal	123
Figura 5	Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal	123
Figura 6	Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal	123
Figura 7	Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal	124
Figura 8	Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal	124
Figura 9	Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox [®] equivalente, do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal	124
Figura 10	Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal	133
Figura 11	Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal	133
Figura 12	Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal	133
Figura 13	Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal	134
Figura 14	Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal	134
Figura 15	Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em	

	Trolox [®] equivalente, do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal	134
Figura 16	Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal	141
Figura 17	Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal	141
Figura 18	Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal	141
Figura 19	Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal	142
Figura 20	Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal	142
Figura 21	Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox [®] equivalente, do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal	142
Figura 22	Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal	150
Figura 23	Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal	150
Figura 24	Comportamento estatístico da viscosidade do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal	150
Figura 25	Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal	151
Figura 26	Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal	151
Figura 27	Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox [®] equivalente, do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal	151
Figura 28	Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal	158
Figura 29	Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal	158
Figura 30	Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal	158
Figura 31	Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal	159
Figura 32	Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal	159
Figura 33	Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox [®] equivalente, do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal	159
Figura 34	Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal	167
Figura 35	Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de	

	romã durante o Estudo de Estabilidade Normal	167
Figura 36	Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal	167
Figura 37	Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal	168
Figura 38	Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal	168
Figura 39	Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox [®] equivalente, do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal	168

Capítulo 3 – Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora de extratos glicólicos

Figura 1	Imagem total 3D do sol (NASA, 2009)	177
Figura 2	Imagem parcial 3D do sol (NASA, 2009)	177
Figura 3	Espectro de radiação eletromagnética (CED/UFSC, 2010)	179
Figura 4	Formação de CPDs e 6-4PPs entre pirimidinas adjacentes (ICHIHASHI et al., 2003)	181
Figura 5	Lesões ao DNA provocadas por danos oxidativos (ICHIHASHI et al., 2003)	183
Figura 6	Ação da radiação UVA e UVB no fotoenvelhecimento cutâneo (BERNEBURG; KRUTMANN, 2000)	185
Figura 7	Dispersão da luz incidente em amostra de fotoprotetor translúcido (SPRINGSTEEN et al., 1999)	193
Figura 8	Esfera de integração com suas paredes revestidas por material branco com alto índice de reflexão (LABSPHERE, 2010)	194
Figura 9	Trajeto da luz incidente registrado por esfera de integração – Geometria normal/hemisférica ou difusa ($0^\circ/d$) (SPRINGSTEEN et al., 1999).	194
Figura 10	Configuração iluminação/detecção ($d/0^\circ$) empregada no Labsphere UV-2000S (SPRINGSTEEN et al., 1999)	195
Figura 11	Espectro de absorção do filtro <i>p</i> -metoxicinamato de 2 etilhexila em etanol (FLOR et al., 2007)	198
Figura 12	Espectro de absorção do filtro 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano -1,2-diona, em etanol (FLOR et al., 2007)	199
Figura 13	Etapas envolvidas no preparo das placas de PMMA e análise das mesmas em espectrofotômetro de reflectância difusa (LABSPHERE, 2010)	217
Figura 14	Fórmula estrutural bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina (CIBA, 2002)	219
Figura 15	Comportamento do bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina na região ultravioleta do espectro (CIBA, 2002)	219
Figura 16	Análise comparativa do Fator de Proteção Solar (FPS) das formulações desenvolvidas (emulsões) analisadas pelo método de Mansur	230
Figura 17	Análise comparativa do Fator de Proteção Solar (FPS) das formulações (emulsões) analisadas por espectrofotometria de refletância difusa	232

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1 – Caracterização fitoquímica de extratos glicólicos

Quadro 1	Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico (SIMÕES et al., 2007)	15
Quadro 2	Principais classes de flavonoides com suas características (SIMÕES et al. 2007)	19

Capítulo 2 – Estudo da estabilidade de extratos glicólicos

Quadro 1	Temperaturas extremas adotadas em Estudo de Estabilidade Preliminar (BRASIL, 2004)	103
Quadro 2	Condições adotadas em estudo de Estabilidade Normal (BRASIL, 2004).	104

Capítulo 3 – Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora de extratos glicólicos

Quadro 1	Lista de filtros solares aprovados pela FDA (BARON et al., 2008)	191
Quadro 2	Matérias-primas empregadas no desenvolvimento das emulsões (CIBA 2002; CRODA, 2010)	211
Quadro 3	Estudo crítico das matérias-primas empregadas no desenvolvimento das emulsões (CIBA, 2002; CRODA, 2010)	212
Quadro 4	Composição quali e quantitativa (% p/p) das emulsões desenvolvidas	213
Quadro 5	Ponderação adotada no cálculo do FPS por espectrofotometria (SAYRE et al., 1979).	215

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Caracterização fitoquímica de extratos glicólicos

Tabela 1	Identificação cromática de flavonoides por meio do teste de Shinoda	48
Tabela 2	Dados para a construção da curva analítica do ácido gálico padrão de referência secundário, obtidos por espectrofotometria a 750 nm	53
Tabela 3	Dados para o cálculo do teor de polifenóis totais (mgEAG/mL) dos extratos glicólicos	54
Tabela 4	Dados para a construção da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário, obtidos por espectrofotometria a 425 nm	62
Tabela 5	Dados para o cálculo do teor de flavonoides totais (mgEQ/mL) dos extratos glicólicos	63
Tabela 6	Dados para a construção da curva analítica do Trolox [®] padrão de referência secundário, obtidos por espectrofotometria a 517 nm	69
Tabela 7	Dados para o cálculo da atividade antioxidante em Trolox [®] equivalente ($\mu\text{molTE/mL}$) dos extratos glicólicos	70
Tabela 8	Atividades antioxidantes determinadas por ORAC dos extratos glicólicos tratadas estatisticamente	74
Tabela 9	Resultado do teste t de Student pareado comparando ORAC e DPPH	77

Capítulo 2 – Estudo da estabilidade de extratos glicólicos

Tabela 1	Protocolo do Estudo de Estabilidade Normal dos extratos glicólicos de uso cosmético	109
Tabela 2	Critérios para avaliação dos extratos glicólicos em relação aos parâmetros organolépticos	110
Tabela 3	Estabilidade física do extrato glicólico de chá verde (<i>C. sinensis</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	119
Tabela 4	Análise visual da cor do extrato glicólico de chá verde (<i>C. sinensis</i>), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal	120
Tabela 5	Estabilidade físico-química do extrato glicólico de chá verde (<i>C. sinensis</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	121
Tabela 6	Estabilidade química do extrato glicólico de chá verde (<i>C. sinensis</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	122
Tabela 7	Estabilidade física do extrato glicólico de erva-mate (<i>I. paraguariensis</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	129
Tabela 8	Análise visual do extrato glicólico de erva-mate (<i>I. paraguariensis</i>), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal	130
Tabela 9	Estabilidade físico-química do extrato glicólico de erva-mate (<i>I. paraguariensis</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	131
Tabela 10	Estabilidade química do extrato glicólico de erva-mate (<i>I. paraguariensis</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	132
Tabela 11	Estabilidade física do extrato glicólico de ginkgo (<i>G. biloba</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	137
Tabela 12	Análise visual comparativa do extrato glicólico de ginkgo (<i>G. biloba</i>), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal	138
Tabela 13	Estabilidade físico-química do extrato glicólico de ginkgo (<i>G. biloba</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	139

Tabela 14	Estabilidade química do extrato glicólico de ginkgo (<i>G. biloba</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	140
Tabela 15	Estabilidade física do extrato glicólico de menta (<i>M. piperita</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	146
Tabela 16	Análise visual do extrato glicólico de menta (<i>M. piperita</i>), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal	147
Tabela 17	Estabilidade físico-química do extrato glicólico de menta (<i>M. piperita</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	148
Tabela 18	Estabilidade química do extrato glicólico de menta (<i>M. piperita</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	149
Tabela 19	Estabilidade física do extrato glicólico de própolis submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	154
Tabela 20	Análise visual do extrato glicólico de própolis, após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal	155
Tabela 21	Estabilidade físico-química do extrato glicólico de própolis submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	159
Tabela 22	Estabilidade química do extrato glicólico de própolis submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	157
Tabela 23	Estabilidade física do extrato glicólico de romã (<i>P. granatum</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	163
Tabela 24	Análise visual do extrato glicólico de romã (<i>P. granatum</i>), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal	164
Tabela 25	Estabilidade físico-química do extrato glicólico de romã (<i>P. granatum</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	165
Tabela 26	Estabilidade química do extrato glicólico de romã (<i>P. granatum</i>) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal	166

Capítulo 3 – Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora de extratos glicólicos

Tabela 1	Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de chá verde	221
Tabela 2	Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de erva-mate	222
Tabela 3	Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de glicólico de ginkgo	223
Tabela 4	Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de menta	224
Tabela 5	Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de própolis	225
Tabela 6	Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de romã	226
Tabela 7	Fator de Proteção Solar (FPS) estimado das formulações desenvolvidas determinado por análise espectrofotométrica de soluções diluídas	229
Tabela 8	Fator de Proteção Solar (FPS) estimado das formulações (emulsões) desenvolvidas determinado por análise espectrofotometria de refletância difusa	231
Tabela 9	Análise comparativa dos valores de FPS determinados por Mansur e por Labsphere® UV-2000S	235

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-ácido sulfônico)
APPH	2,2 – azobis (2-amidinopropano)diidrocloreto
AUC	Área sob a curva de decréscimo
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutanos
CCD	Cromatografia em camada delgada
DEM	Dose eritematogênica mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EQ	Equivalentes de quercetina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de Proteção Solar
FRAP	Potencial antioxidante de redução do ferro
IFSCC	<i>International Federation of Societies of Cosmetic Chemists</i>
MMP	Metaloproteinases
nm	Nanômetro
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio
O₃	Ozônio
pH	Potencial hidrogeniônico
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
6-4PPs	fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona
RI	Radiação infravermelha
SOD	Superóxido dismutase
TE	Trolox [®] equivalente
TEAC	Atividade antioxidante em Trolox [®] equivalente
Trolox[®]	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UV	Ultravioleta
λ_c	Comprimento de onda crítico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

Página

Capítulo 1: Caracterização fitoquímica de extratos glicólicos	1
Resumo	2
1. Introdução	3
2. Revisão da Literatura	4
2.1 Histórico	4
2.2 Plantas e extratos vegetais	6
2.3 Extratos	8
2.3.1 Métodos de preparo de extratos cosméticos	8
2.3.2 Classificação de extratos	12
2.4 Fenólicos	14
2.4.1 Fenóis simples e ácidos fenólicos	16
2.4.2 Flavonoides	17
2.4.2.1 Atividade antioxidante e antirradicais livres	20
2.4.2.2 Atividade anti-inflamatória	21
2.4.2.3 Resistência capilar	21
2.4.3 Taninos	22
2.5 Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	25
2.6 Acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.)	26
2.7 Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.)	27
2.8 Chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	28
2.9 Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil)	29
2.10 Framboesa (<i>Rubus idaeus</i> L.)	30
2.11 Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i> L.)	31
2.12 Menta (<i>Mentha piperita</i> L.)	32
2.13 Morango (<i>Fragaria vesca</i> L.)	33
2.14 Própolis	34
2.15 Romã (<i>Punica granatum</i> L.)	35
2.16 Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	36
3. Objetivos	37
4. Material e Métodos	37
4.1 Material	37
4.1.1 Equipamentos/Acessórios	37
4.1.2 Reagentes e solventes	38
4.1.3 Substâncias químicas de referência	39
4.1.4 Matérias-primas	39
4.2 Métodos	40
4.2.1 Avaliação da presença de flavonoides por ensaios cromáticos e cromatográficos	40
4.2.2 Teor de polifenóis totais	41
4.2.2.1 Linearidade e curva analítica	42
4.2.3 Teor de flavonoides totais	43
4.2.3.1 Linearidade e curva analítica	43
4.2.4 Atividade antioxidante pela ação sequestradora do radical DPPH	44
4.2.4.1 Linearidade e curva analítica	45
4.2.5 Atividade antioxidante por ORAC	46
4.2.6 Análise estatística dos ensaios realizados	47

5. Resultados e Discussão	47
5.1 Avaliação da presença de flavonoides por ensaios cromáticos e cromatográficos	47
5.2 Teor de polifenóis totais	51
5.3 Teor de flavonoides totais	60
5.4 Atividade antioxidante pela ação sequestradora do radical DPPH	67
5.5 Atividade antioxidante por ORAC	73
6. Conclusões	80
7. Referências	80
 Capítulo 2: Estudo da estabilidade de extratos glicólicos	 92
Resumo	93
1. Introdução	94
2. Revisão da Literatura	94
2.1 Estabilidade de produtos cosméticos	94
2.1.1 Vida de prateleira (<i>Shelf-life</i>)	95
2.1.2 Fatores que influenciam a estabilidade	98
2.1.3 Testes de estabilidade	99
2.1.4 Estudos de estabilidade	102
2.1.4.1 Estabilidade Acelerada	102
2.1.4.2 Estabilidade Normal	103
2.1.4.3 Estabilidade de Longa Duração ou Teste de Prateleira	105
3. Objetivos	105
4. Material e Métodos	106
4.1 Material	106
4.1.1 Equipamentos/Acessórios	106
4.1.2 Reagentes e solventes	106
4.1.3 Substâncias químicas de referência	107
4.1.4 Matérias-primas	107
4.2 Métodos	107
4.2.1 Estudo da estabilidade dos extratos glicólicos	107
4.2.2 Avaliação das características organolépticas	108
4.2.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	111
4.2.4 Determinação da viscosidade dinâmica	111
4.2.5 Determinação da densidade absoluta	113
4.2.6 Determinação do teor de flavonoides totais	113
4.2.7 Determinação do teor de polifenóis totais	114
4.2.8 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	115
4.2.9 Análise estatística dos ensaios realizados	115
5. Resultados e Discussão	116
5.1 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de chá verde	116
5.2 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de erva-mate	125
5.3 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de ginkgo	135
5.4 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de menta	143
5.5 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de própolis	152
5.6 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de romã	160
6. Conclusões	169
7. Referências	170

Capítulo 3: Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoprotetora de extratos glicólicos.....	174
Resumo	175
1. Introdução	176
2. Revisão da Literatura.....	177
2.1 Sol.....	177
2.2 Radiação Ultravioleta	179
2.2.1 Danos diretos ao DNA.....	181
2.2.2 Danos ao DNA por meio de espécies reativas de oxigênio.....	182
2.2.3 Imunossupressão.....	183
2.2.4 Fotoenvelhecimento cutâneo.....	184
2.3 Luz visível e Infravermelho	186
2.4 Fotoproteção	186
2.4.1. Fotoproteção ambiental.....	187
2.4.2 Fotoproteção por vestimentas e acessórios.....	188
2.4.3 Fotoprotetores	190
2.4.3.1 Eficácia.....	192
2.4.3.2 Filtros inorgânicos.....	197
2.4.3.3 Filtros orgânicos.....	198
2.4.4 Antioxidantes	202
2.4.5 Controvérsias sobre os fotoprotetores	203
2.4.5.1 Reações adversas cutâneas	203
2.4.5.2 Absorção sistêmica.....	204
2.4.5.3 Síntese de vitamina D (calciferol)	204
2.4.5.4 Nanopartículas	205
2.4.6 Fotoproteção sistêmica	206
3. Objetivos.....	207
4. Material e Métodos	207
4.1 Material.....	207
4.1.1 Equipamentos/Acessórios.....	207
4.1.2 Reagentes e solventes	208
4.1.3 Matérias-primas	208
4.2 Métodos	209
4.2.1 Desenvolvimento das formulações.....	209
4.2.2 Análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur)	214
4.2.3 Análise por espectrofotometria de refletância difusa	215
4.2.4 Análise estatística dos ensaios realizados	216
5. Resultados e Discussão	218
5.1 Desenvolvimento das formulações.....	218
5.2 Análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur)	227
5.3 Análise por espectrofotometria de refletância difusa	231
6. Conclusões	238
7. Referências	238

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS GLICÓLICOS

RESUMO

Atualmente, os produtos formulados com componentes naturais ganham cada vez mais espaço no mercado de cosméticos. O conceito de produto natural é amplamente valorizado pelo mercado externo e as grandes companhias. Assim, cada vez mais, incorporam-se extratos vegetais, insumos, matérias-primas e ativos naturais em diversas formulações cosméticas. A adição de extratos vegetais ocorre devido às atividades clínicas atribuídas aos mesmos como atividades antioxidante, anti-inflamatória e antienvelhecimento; ação despigmentante cutânea, estimulante do crescimento capilar e coadjuvante na fotoproteção, entretanto, é necessária a comprovação científica desses efeitos para cada extrato vegetal, em função das composições diversificadas que possuem, tanto quali como quantitativamente. O presente trabalho quantificou os polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, e os flavonoides totais, equivalentes em quercetina, de doze extratos glicólicos [açai (*Euterpe oleracea*), acerola (*Malpighia glabra* L.), castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), chá verde (*Camellia sinensis*), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), framboesa (*Rubus idaeus* L.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), menta (*Mentha piperita* L.), morango (*Fragaria vesca* L.), própolis, romã (*Punica granatum* L.) e uva (*Vitis vinifera* L.)] de uso cosmético, não padronizados e disponíveis no mercado brasileiro, empregando métodos espectrofotométricos e determinou a atividade antioxidante dos mesmos por duas metodologias distintas: atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio). O teor de polifenóis totais dos extratos analisados variou no intervalo de 0,16 a 16,2 mgEAG/mL enquanto que o teor de flavonoides totais variou na faixa de 0,004 a 0,492 mgEQ/mL. Os extratos de romã, erva-mate, menta, própolis, ginkgo e chá verde apresentaram os maiores teores de polifenóis e flavonoides, expressos, respectivamente, em equivalentes de ácido gálico e quercetina, sendo selecionados para os ensaios seguintes de estabilidade e eficácia fotoprotetora *in vitro*. As duas metodologias empregadas para determinação da atividade antioxidante indicaram os extratos de romã, erva-mate e menta como os de maior potencial antioxidante.

Palavras-chave: própolis, extrato vegetal, polifenóis, flavonoides, atividade antioxidante, DPPH, ORAC

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, observa-se crescente procura por produtos cosméticos contendo ingredientes naturais e/ou orgânicos. Extratos de plantas e componentes isolados das mesmas são cada vez mais usados em xampus, sabonetes, fotoprotetores, tinturas capilares, desodorantes, produtos para higiene oral e para o cuidado da pele e cabelos, entre outros. Recentemente, a venda desses produtos apresentou crescimento significativo na América do Norte e na Europa ocidental. Em 2009, dados da *Organic Monitor* (empresa especializada em consultoria e pesquisa para a indústria global de produtos orgânicos e similares) mostraram que a Europa obteve uma taxa de crescimento anual de 20% na venda de produtos destinados ao cuidado pessoal contendo ingredientes naturais e/ou orgânicos. Nesse mesmo ano, a venda global desses produtos movimentou aproximadamente US\$ 7 bilhões (ANTIGNAC et al., 2011; REUTER et al., 2010; REUTER; MERFORT; SCHEMPP, 2010).

O Brasil apresenta importante papel nesse cenário com o desenvolvimento, consumo e exportação de produtos cosméticos contendo matérias-primas oriundas da sua biodiversidade. Nos últimos cinco anos, o país apresentou um crescimento acumulado de 165% em exportações chegando a atingir US\$ 587,5 milhões no ano de 2009. Muitos desses produtos exportados continham ingredientes da biodiversidade brasileira (ABIHPEC, 2011).

A adição de extratos, tinturas, ceras e óleos vegetais em produtos cosméticos agrega benefícios aos mesmos. Esses componentes naturais apresentam diversas atividades clínicas devido à presença de metabólitos secundários como os fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros. Dentre as atividades clínicas atribuídas a esses componentes, pode-se citar ação antioxidante, anti-inflamatória, antienvelhecimento e fotoprotetora. Tais ações justificam o uso dos mesmos pela indústria cosmética, entretanto, existe a necessidade de estudos científicos que comprovem os efeitos benéficos desses componentes quando adicionados em diferentes formulações cosméticas, visando garantir a eficácia das mesmas. Testes de segurança *in vitro* e *in vivo* são igualmente importantes no desenvolvimento de cosméticos contendo ingredientes naturais (ABURJAI; NATSHEH, 2003; ANTIGNAC et al., 2011; DAL'BELO, 2008; MARTINI; SEILLER, 1999; REUTER; MERFORT; SCHEMPP, 2010; SIMÕES et al., 2007).

Diante do exposto, essa pesquisa propôs estudar extratos cosméticos comerciais avaliando, comparativamente, os polifenóis e os flavonoides totais e a atividade antioxidante dos mesmos. Estudos de Estabilidade e avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos extratos com melhor performance frente aos parâmetros avaliados também foram realizados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – HISTÓRICO

Nos últimos anos, a preocupação do ser humano com a estética e a aparência física tem aumentado, os corpos feminino e masculino idealizados são exaltados como padrão de beleza, saúde e bem-estar. Essa preocupação não se originou na sociedade contemporânea, porém, é neste momento histórico que a busca pela beleza e a vaidade tornam-se praticamente requisitos de aceitação social (FONTES, 2006; MATA, 1998).

Culturas antigas também apresentavam preocupações em relação à estética e à higiene pessoal. Esse fato foi evidenciado na prática, originada na Pré-História, de tingir o corpo e nas casas de banho da Roma Antiga. No Egito Antigo, a pintura não exercia apenas função estética, era comum realizá-la na região dos olhos para proteger a visão da claridade (ABIHPEC, 2010; BLANCO-DÁVILA, 2000).

Recentemente, uma pesquisa realizada na Espanha demonstrou o uso de bijuterias e o hábito de pintura de corpos pelo homem de Neandertal (*Homo neanderthalensis*) ibérico há 50.000 anos. Os pesquisadores encontraram conchas marinhas perfuradas que serviam tanto para a mistura e armazenamento de corantes como para ornamentar o corpo. Resíduos preservados de tinturas vermelhas e amarelas (**Figura 1**) foram encontrados no interior de algumas conchas. Esses resíduos eram compostos de lepidocrocita misturada com hematita e pirita e serviam para adornar o corpo (ZILHÃO et al., 2010).

Figura 1 – Conchas encontradas em sítio arqueológico de Múrcia (Espanha) com resíduo de pigmento ampliado (imagem à direita) (ZILHÃO et al., 2010).

Relatos de práticas de higiene foram encontrados no Papiro de Ebers e na Bíblia Sagrada. O primeiro compêndio apresenta um capítulo exclusivo sobre o cuidado dos cabelos e o último descreve, em livros do Velho Testamento, o hábito de banhos em situações

específicas. Tais relatos encontram-se no livro de Levítico (17: 15-16) e no livro de Números (19: 6-7). O livro de Provérbios (7: 17) relata o uso de mirra, aloés e canela como perfumes para leitos. A preocupação com a aparência física, principalmente por parte das mulheres, também é descrita na Bíblia Sagrada, como se observa no seguinte trecho do livro de 1 Pedro (3: 3): “O enfeite delas não seja o exterior, no frisado dos cabelos, no uso de jóias de ouro, na compostura de vestes” (BÍBLIA SAGRADA, 1995; BLANCO-DÁVILA, 2000).

Essas preocupações estéticas foram comuns em diferentes períodos históricos e em diversas regiões do mundo. Na Índia, por volta dos séculos IV e V, utilizava-se a henna, corante obtido da planta *Lawsonia inermis* L., para tingir os cabelos e para a pintura de mãos e pés, principalmente, antes de cerimônias matrimoniais hindus. Algumas culturas da África do Norte também faziam uso da henna. No Japão, utilizavam-se pétalas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) moídas para pintura de sobancelhas e do contorno dos olhos e lábios e pó de arroz para colorir a face (CHAUDHRI; JAIN, 2009).

Na Idade Média, as classes altas européias mantinham a pele clara com o uso de pós brancos. A aparência pálida diferenciava a nobreza e o clero dos trabalhadores das classes baixas que apresentavam a pele bronzeada por exposição ao sol em atividades agrícolas. Ignorando os efeitos tóxicos, utilizavam chumbo branco que, algumas vezes, também, continha arsênico para obter a aparência desejada. Da mesma forma, os povos nativos da América apresentavam costumes próprios relacionados com a aparência. Os Maias tatuavam o rosto inteiro e os órgãos sexuais externos com finalidade estética e os Astecas cuidavam da pele com preparações que continham óleos e sementes e tingiam os cabelos com pigmentos (BLANCO-DÁVILA, 2000; CHAUDHRI; JAIN, 2009).

No século XVII era comum o uso de perucas cacheadas e perfumes em Paris. Neste período, surgiram as primeiras lojas parisienses de preparo de perfumes e a venda de pomadas, azeites, águas aromáticas, sabonetes e depilatórios tornou-se frequente (BLANCO-DÁVILA, 2000; CRF, 2010).

Embora a utilização de substâncias ou misturas de substâncias com finalidade higiênica e cosmética remonte, pelo menos, há 30.000 anos, foi somente no final do século XIX e início do século XX que se iniciou o mercado de cosméticos e produtos de higiene com o surgimento das primeiras indústrias de cosméticos. Em 1888, foi criado o desodorante nos Estados Unidos e, em 1907, Eugène Schueller, fundador do grupo L'Oréal, desenvolveu a primeira tintura capilar sintética. Em 1915, surgiram embalagens metálicas cilíndricas para batons e, em 1932, uma ampla variedade de esmaltes para unhas tornou-se disponível aos consumidores com a fundação da Revlon por Charles e Joseph Revson e Charles Lackman. Em 1941, o aerossol foi

patenteado e, em 1952, foi lançado o desodorante *roll-on*, o desodorante em aerossol surgiu em 1965 (CHAUDHRI; JAIN, 2009; CRF, 2010).

No Brasil, as primeiras indústrias de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos começaram a despontar no final do século XIX. Em 1870, foi fundada a Botica Granado, empresa que se perpetua até os dias de hoje. Atualmente, existem 1775 empresas atuando no mercado de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. O Brasil é o terceiro maior mercado mundial de cosméticos, em receita gerada por vendas ao consumidor. Em 2008, o setor apresentou um crescimento de 27,4% em relação a 2007 movimentando US\$ 28,7 bilhões e com participação de 8,6% no mercado mundial. Somente os EUA e o Japão apresentaram participações maiores, com 15,6% e 10,1%, respectivamente. Nesse mesmo ano, o Brasil foi líder mundial no consumo de desodorantes e vice-líder nas seguintes categorias: cabelos, infantil, masculino, higiene oral, proteção solar, perfumaria e banho (ABIHPEC, 2010).

2.2 – PLANTAS E EXTRATOS VEGETAIS

Observa-se que os produtos formulados com componentes naturais ganham cada vez mais espaço no mercado de cosméticos. A utilização de ingredientes provenientes da biodiversidade brasileira é uma tendência. Aproximadamente, 20% da biodiversidade de todo o mundo encontra-se no Brasil, país que apresenta a maior diversidade genética vegetal do mundo, apresentando 55.000 espécies catalogadas de um total estimado de 350.000 a 550.000. Estima-se que existam mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos no país. O conceito de produto natural é amplamente valorizado pelo mercado externo e as grandes companhias, assim, cada vez mais, incorporam-se extratos vegetais, insumos, matérias-primas e princípios ativos naturais em diversas formulações cosméticas (ABIHPEC, 2010; SIMÕES et al., 2007).

O uso de plantas, ervas e componentes botânicos tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. Registros arqueológicos e documentos revelam que o uso medicinal de plantas é tão antigo quanto à própria humanidade. Os primeiros registros, que presumidamente fazem referência a esse fato, datam de 60.000 a.C. Pólenes de diferentes espécies de plantas, supostamente utilizadas com fim medicinal, foram descobertos na cova de Shanidar IV, um homem de neandertal (*Homo neanderthalensis*), em um sítio arqueológico no Iraque. Acredita-se que flores inteiras foram depositadas no sepulcro de Shanidar IV antes da deposição do corpo. Algumas das espécies encontradas apresentavam propriedades medicinais (ABURJAI; NATSHEH, 2003; HEINRICH et al., 2004; LEROI-GOURHAN, 1975).

As informações escritas mais antigas das tradições árabe-européias relacionadas ao uso medicinal de plantas são provenientes dos povos sumérios e acádios da região da Mesopotâmia. Os relatos egípcios foram descritos no Papiro de Ebers, documento que, também, revelou o uso cosmético de componentes botânicos. Alguns procedimentos de beleza utilizados na época envolviam o uso de plantas. Os egípcios costumavam preparar uma espécie de pomada constituída por cera, incenso, óleo de oliva fresco e cascas de cipreste trituradas que era esfregada na face para amenizar as rugas (BLANCO-DÁVILA, 2000; HEINRICH et al., 2004).

Antes da descoberta de métodos de síntese de substâncias com propriedades similares às encontradas nas plantas, as principais fontes de todos os cosméticos eram as próprias plantas. Mirra, tomilho, manjerona, camomila, lavanda, lírio, hortelã, alecrim, cedro, óleo de oliva, óleo de gergelim e óleo de amêndoa eram constituintes básicos de perfumes egípcios. Os romanos também utilizavam constituintes botânicos com fim cosmético (**Figura 2**). Infusão de vinho, açafrão, pimenta e laserpício (*laserpicium*) era utilizada no combate à calvície. Catão, Varão, Plínio “O velho”, Escribônio Largo, Dióscoride e Galeno foram grandes estudiosos romanos da botânica médica. Na obra História Natural de Plínio “O velho” encontra-se a composição de algumas pomadas para beleza e maciez do rosto. A mais elaborada delas continha farinha de cevada e ervilha, ovos, vinho, pó de chifre de veado, bulbo de narciso e mel. Essa mistura era aplicada na face e permanecia sobre a mesma durante a noite inteira. Provavelmente, agia por meio de uma leve esfoliação da pele (ABURJAI; NATSHEH, 2003; BLANCO-DÁVILA, 2000; CHAUDHRI; JAIN, 2009; VIEIRA, 2009).

Atualmente, a indústria de cosméticos faz uso de óleos e de extratos vegetais em diferentes formulações, tais como: xampus, pomadas, emulsões, loções, géis, entre outras. O início desse uso ocorreu com o desenvolvimento de técnicas de extração capazes de gerar tais derivados que não comprometiam a qualidade final dos produtos nos quais eram adicionados. O aumento verificado nos últimos anos de formulações contendo matérias-primas e insumos de origem vegetal deve-se, em parte, ao apelo de marketing natural que atrai os consumidores e, em parte, à necessidade de substituição de derivados animais que as substâncias sintéticas não conseguiram mimetizar plenamente em produtos cosméticos (ABURJAI; NATSHEH, 2003; DAL'BELO, 2008).

Figura 2 – Recipientes utilizados para o armazenamento de perfumes romanos (imagem à esquerda) e egípcios (imagem à direita) (MUSEU DEL PERFUM, 2010).

2.3 EXTRATOS

Segundo definição da Farmacopeia Brasileira, extratos são preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtidas a partir de material vegetal ou animal. Esse material pode sofrer tratamento preliminar, como inativação de enzimas, moagem ou desengorduramento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a).

Os extratos podem ser padronizados ou não. Nos extratos padronizados o teor de um ou mais constituintes é ajustado a valores previamente definidos e assim, perfis de eficácia clínica e efeitos farmacológicos podem ser desenhados. Em oposição, os não padronizados são carentes de informações sobre a qualidade dos mesmos, tornando sua eficácia clínica e seus efeitos farmacológicos questionáveis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a; HEINRICH et al., 2004).

2.3.1 MÉTODO DE PREPARO DE EXTRATOS COSMÉTICOS

A extração de ingredientes ativos de material botânico é um dos mais antigos procedimentos usados na área cosmética. As moléculas ativas biologicamente são separadas de componentes inertes ou inativos por solventes e processos adequados. Segundo a Farmacopeia Brasileira, os extratos podem ser preparados por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando etanol, água ou outro solvente apropriado. Materiais indesejáveis podem ser eliminados após o procedimento de extração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

Antes do início dos processos de extração, deve-se reduzir o material que será extraído em partículas de tamanhos adequados. A maceração é um processo realizado a frio que consiste na mistura do material a ser extraído com o solvente especificado em recipiente

fechado. Esse sistema deve permanecer em repouso por um tempo de maceração que é definido em função da parte da planta a ser utilizada, do tamanho de seus fragmentos e do estado apresentado (material fresco ou seco). Segundo Martini e Seiller, a título de exemplo comparativo, são necessárias 8 horas de maceração para extrações realizadas em folhas, 16 horas para caules e 36 horas para raízes e frutos. Ao final do processo, o resíduo é separado do extrato e prensado, e o líquido resultante da prensagem é adicionado ao extrato (FARMACOPEIA BRASILEIRA 2010 a, MARTINI; SEILLER, 1999).

O processo de percolação, também conhecido por lixiviação, é realizado em percoladores. O material a ser extraído deve permanecer em contato com o solvente preconizado, em repouso, por no mínimo 1 hora. No percolador, o solvente é escoado através do material previamente umedecido de maneira lenta e regular. É importante que o material no percolador esteja sempre coberto por solvente e, dessa forma, a reposição contínua de solvente se faz necessária. O tempo de percolação e a quantidade de solvente utilizada no processo dependem da parte da planta a ser utilizada, do tamanho de seus fragmentos e do estado apresentado (material fresco ou seco). A velocidade e temperatura de percolação devem ser determinadas, previamente, para cada tipo de material vegetal e o solvente deve ser escolhido em função dos princípios ativos da planta objetivando a extração máxima dos mesmos. Ao término do processo, o resíduo de extração pode ser prensado e o líquido resultante da prensagem adicionado ao percolador (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a; MARTINI; SEILLER, 1999; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

A qualidade do extrato obtido depende do grau de redução do material a ser extraído, da taxa de difusão das substâncias ativas do material para o solvente e da velocidade de escoamento do solvente. A **Figura 3** representa o processo industrial de extração por percolação utilizando uma mistura de água, álcool e propilenoglicol como solvente de um material vegetal. No esquema, o material vegetal pesado é previamente umedecido com o solvente e transferido para o percolador. A percolação utilizando quantidade de solvente pré-definida ocorre por no mínimo 8 horas com gotejamento do extrator (5 gotas por minuto). A proporção de material vegetal e solvente utilizada é de 1:5. Ao final da percolação, o extrato é filtrado de 3 a 4 vezes e os conservantes são adicionados, em seguida, o extrato é transferido para tanques de espera aguardando o envase que deve ser realizado com controle de umidade e temperatura (informação pessoal¹; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

¹Informação fornecida por MATHEUS, L.G.M em visita à Mapric[®] Produtos Farmacoscéticos Ltda, em 2009.

Percoladores

Material umedecido

Percolação

Extrato obtido

Tanques de espera

Figura 3 – Representação do processo de percolação de material vegetal (Arquivo pessoal¹).

¹Imagens fornecidas por MATHEUS, L.G.M em visita à Mapric® Produtos Farmacoscéticos Ltda, em 2009.

Apesar de não estarem descritos na Farmacopeia Brasileira, os métodos de extração como digestão, decocção e destilação também são utilizados. O mesmo procedimento adotado na maceração é empregado na digestão, porém o processo é realizado à quente com temperatura definida em função da sensibilidade dos princípios ativos, sendo inferior ao valor da temperatura de ebulição do solvente utilizado. Após o resfriamento do sistema, pode ocorrer precipitação, esse método é, principalmente, empregado para obtenção de extratos oleosos. Ao contrário do processo de digestão, a decocção ocorre na temperatura de ebulição do solvente que é mantida constante durante todo o processo. Esse procedimento é indicado para materiais de estrutura mais rígida como caules e raízes, trata-se de uma técnica de emprego restrito devido ao fato de muitas substâncias ativas serem alteradas após aquecimento prolongado. A destilação é adotada na fabricação de águas florais, plantas aromáticas são submetidas ao processo que utiliza, geralmente, água purificada na temperatura de ebulição. O vapor gerado libera e arrasta os óleos essenciais da planta gerando, após resfriamento, as águas florais (MARTINI; SEILLER, 1999; SALVADOR; CHISVERT, 2007, SIMÕES et al., 2007).

A qualidade dos extratos vegetais obtidos por diferentes métodos de extração depende de diversos fatores que devem ser cuidadosamente controlados durante a produção dos mesmos, tais como: temperatura empregada, volume de solvente em relação à quantidade de material vegetal, porcentagem de resíduos secos na solução de extração e tempo de contato do solvente com o material vegetal. Após a extração, os procedimentos adicionais como concentração, redução de solvente e secagem podem ser realizados visando obter diferentes tipos de extratos vegetais. O diagrama apresentado na **Figura 4** sintetiza a obtenção de distintos extratos vegetais (MARTINI; SEILLER, 1999; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

Figura 4 - Diagrama de obtenção de extratos vegetais (SALVADOR; CHISVERT, 2007).

2.3.2 CLASSIFICAÇÃO DE EXTRATOS

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, “extratos fluidos são preparações líquidas nas quais, exceto quando especificado diferentemente, uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca, utilizada na sua preparação”. Seu preparo é realizado por maceração, percolação ou dissolução de extratos secos ou moles utilizando como solvente etanol, água ou misturas etanol/água de proporção adequada, sendo que conservantes inibidores do crescimento microbiano podem ser adicionados. Apresentam composição e características comparáveis independente do processo de obtenção adotado e podem ser padronizados em termos de concentração do solvente, teor de constituintes ou resíduo seco. Os extratos moles são definidos como “preparações de consistência pastosa obtidos por evaporação parcial do solvente usado no seu preparo”. Assim, como os extratos fluidos, são obtidos utilizando como solvente etanol, água ou misturas etanol/água de proporção adequada, apresentam no mínimo 70% de resíduo seco (p/p), podendo ser acrescidos de conservantes. “Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado no processo, apresentam, no mínimo, 95% de resíduo seco” e podem ser adicionados de materiais inertes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a).

Na área cosmética, além dos extratos definidos anteriormente, é comum o uso de extratos aquosos, alcoólicos, hidroalcoólicos, glicólicos, hidroglicólicos e oleosos que, de

acordo com a **Figura 4**, podem ser classificados como extratos líquidos. Segundo Martini e Seiller, 1999, os extratos aquosos apresentam excelente compatibilidade com diversas formas cosméticas, porém são susceptíveis à contaminação microbiana sendo necessário o uso de conservantes apropriados. Os extratos alcoólicos e hidroalcoólicos apresentam quantidade de água e/ou álcool variável de acordo com a natureza dos princípios ativos a serem extraídos. A incorporação dos mesmos em preparações cosméticas é limitada, uma vez que, determinadas emulsões apresentam incompatibilidade com álcool (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a; MARTINI; SEILLER, 1999).

Os extratos glicólicos e hidroglicólicos são preparados com glicóis. Propilenoglicol (propano-1,2-diol), líquido viscoso, límpido, incolor, praticamente inodoro, higroscópico e com fraco sabor característico adocicado, é um dos solventes mais utilizados na obtenção desses extratos. É miscível com água, etanol 96%, acetona, clorofórmio e éter. Os extratos obtidos apresentam compatibilidade com diversas bases cosméticas e, frequentemente, modificam as características reológicas das formulações. Os extratos oleosos são amplamente utilizados em cosméticos, principalmente em emulsões, e como são preparados com solventes graxos necessitam da adição de antioxidantes no final do processo. A incorporação de qualquer tipo de extrato vegetal em formulações cosméticas deve ocorrer em temperaturas baixas, normalmente inferiores a 45 °C, para evitar alterações nos mesmos. Os extratos aquosos e hidroglicólicos são os mais susceptíveis a alterações em temperaturas elevadas com possível reação dos componentes ativos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 a; MARTINI; SEILLER, 1999).

Variáveis atividades clínicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antienvelhecimento, despigmentante cutânea, estimulante do crescimento capilar e coadjuvante na fotoproteção, têm sido atribuídas aos extratos vegetais de uso cosmético justificando a incorporação dos mesmos nas formulações. A comprovação científica desses efeitos se faz necessária para cada extrato, em função de suas composições diversificadas, quali e quantitativamente. Adicionalmente, deve-se comprovar a segurança *in vitro* e *in vivo* desses extratos incorporados às formulações (ABURJAI; NATSHEH, 2003; DAL'BELO, 2008; MARTINI; SEILLER, 1999).

Além da comprovação científica das atividades clínicas associadas aos extratos vegetais, a manutenção de um padrão de qualidade entre os lotes produzidos é fundamental para assegurar a ação de tais efeitos e a segurança dos extratos. Assim, tornam-se necessários cuidados elementares em todo o processo de obtenção do extrato vegetal e análises de rotina após o preparo dos mesmos. Os testes organolépticos que avaliam o aspecto, a cor e o odor são

alguns dos itens utilizados para garantir a qualidade e a regularidade das matérias-primas. O controle físico do extrato obtido é exercido por meio da avaliação do pH, da densidade, do índice de refração e da viscosidade. A identificação e quantificação de componentes vegetais específicos são realizadas por técnicas analíticas como a espectrofotometria e a cromatografia (HEINRICH et al, 2004; MARTINI; SEILLER, 1999).

2.4 FENÓLICOS

As plantas apresentam diversos constituintes químicos, alguns são específicos e, normalmente, estão presentes em pequenas quantidades como os resultantes do metabolismo secundário, e outros são comuns em todas as plantas. A constituição química dos produtos oriundos das plantas pode variar de acordo com o período vegetativo das mesmas e sob a influência do clima, da composição do solo e de outros fatores (CUNHA, 2009).

O metabolismo vegetal, conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente em cada célula, gera metabólitos, ou seja, compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados. As reações químicas podem ser direcionadas por enzimas específicas estabelecendo-se as rotas metabólicas que geram as principais classes de substâncias vegetais. Tradicionalmente, o metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário. O primeiro engloba os processos essenciais à vida que são comuns aos seres vivos e o segundo envolve a produção, a transformação e o acúmulo de outras substâncias não, necessariamente, relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor, porém com vantagens para a sobrevivência e a perpetuação da espécie em seu ecossistema (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários apresentam atividades biológicas interessantes com importância comercial na área alimentar, farmacêutica, cosmética, agrônômica e da perfumaria. Existe um interesse contínuo e crescente nesses compostos devido à possibilidade dos mesmos atuarem como novas drogas ou auxiliarem a síntese de novas estruturas relacionadas com propriedades curativas. Diversas funções são atribuídas aos metabólitos secundários, como: defesa da planta contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra a radiação ultravioleta e atração de polinizadores. Alguns desses compostos são responsáveis pelos odores, pungências e colorações características das plantas e, outros, proporcionam ações medicinais, culinárias e venenosas das mesmas. A biossíntese dos metabólitos secundários ocorre em tecidos e células especiais devido ao grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Possuem duas formas de apresentação: livre (agliconas) e

ligada a uma ou mais unidades de açúcar (heterosídeos) (EVANS, 2009; HARBORNE 2000; SIMÕES et al., 2007).

Os compostos fenólicos constituem o maior grupo de metabólitos secundários das plantas e seus representantes apresentam diferentes estruturas, desde as mais simples com apenas um anel aromático até as mais complexas, como ligninas e taninos. São importantes constituintes de algumas plantas medicinais e são usados como corantes, flavorizantes, aromatizantes e antioxidantes pela indústria de alimentos. Fenóis simples, taninos, cumarinas, naftoquinonas, flavonoides e ligninas são algumas das classes representantes dos compostos fenólicos. De maneira geral, todas as estruturas que possuem pelo menos um anel aromático sendo pelo menos um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila, podendo se apresentar livre ou fazendo parte de ésteres, éteres ou heterosídeos são consideradas compostos fenólicos (CUNHA, 2009; EVANS, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Esta categoria está amplamente distribuída no reino vegetal e nos micro-organismos e participa do metabolismo animal. Seus constituintes possuem reatividade elevada devido à presença do grupamento hidroxila sendo capazes de formar novas moléculas por meio da união oxidativa entre radicais fenoxi e pela oxidação do núcleo aromático. Podem ser classificados de acordo com o tipo do esqueleto principal ou de acordo com a ocorrência dos mesmos no reino vegetal. O **Quadro 1** representa a classificação de acordo com o esqueleto principal (CUNHA, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Quadro 1 – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico (SIMÕES et al., 2007).

Esqueleto Básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignanais
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Legenda: **C6** = anel benzênico e **CX** = cadeia substituinte com X átomos de carbono

Dois grupos são utilizados para classificar os compostos fenólicos em relação à ocorrência dos mesmos no reino vegetal: os amplamente distribuídos e os de distribuição restrita. Derivados de ácidos benzoicos e cinâmicos, cumarinas, flavonoides e derivados de polimerização (taninos e ligninas) pertencem ao primeiro grupo e as demais classes de substâncias pertencem ao segundo grupo (SIMÕES et al., 2007).

2.4.1 FENÓIS SIMPLES E ÁCIDOS FENÓLICOS

Fenóis simples e ácidos fenólicos apresentam propriedades químicas e analíticas semelhantes e, também, algumas ações biológicas em comum. A primeira classe possui número relativamente pequeno e, normalmente, encontra-se sob a forma de heterosídeos, sendo a hidroquinona um exemplo dessa classe. Os ácidos fenólicos, geralmente, são agrupados em derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico. A **Figura 5** ilustra dois representantes de fenóis simples e ácidos fenólicos (CUNHA, 2009; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Figura 5 – Estruturas de um fenol simples e um ácido fenólico empregados em cosméticos (CUNHA, 2009; EVANS, 2009).

Os ácidos fenólicos hidroxilados, derivados do ácido benzoico são muito abundantes na natureza, sendo obtidos, muitas vezes, por hidrólise ácida e podem se apresentar como constituintes de taninos hidrolisáveis. É o caso do ácido gálico e do seu dímero de condensação, o ácido elágico, que são obtidos após liberação dos taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida. Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico mais amplamente distribuídos no reino vegetal envolvem os ácidos: *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Praticamente, todos os tecidos vegetais possuem pelo menos um desses quatro ácidos (CUNHA, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Alguns derivados de ácidos fenólicos apresentam atividade antioxidante, como os ácidos clorogênico e caféico e seus ésteres com esteróis e triterpenos e o ácido ferúlico

também com seus ésteres. Existem relatos do efeito antioxidante do extrato de *Ilex paraguariensis* sobre a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e da ação antioxidante e pró-oxidante de *Camellia. sinensis*. Além da atividade antioxidante, dados da literatura científica revelam a atividade antibacteriana e antiviral de ésteres do ácido caféico (SIMÕES et al., 2007).

Diferentes fenóis simples e ácidos fenólicos são usados na área cosmética, como a arbutina, a vanilina e a saligenina (álcool salicílico) que são frequentemente encontrados em produtos cosméticos. A arbutina (hidroquinona- β -D-glucopiranosídeo) gera hidroquinona, após passar por processo de degradação pela ação da enzima β -glucosidase, que atua inibindo a enzima tirosinase envolvida na síntese bioquímica da melanina. Atualmente, seu uso vem diminuindo devido aos efeitos irritantes que a mesma provoca na pele humana. Extratos obtidos das folhas e das cascas de diferentes espécies de *Salix* sp. são utilizados em cosméticos devido à presença de derivados salicílicos, ácidos fenólicos (salicílico, vanílico, sirínico, caféico) e flavonoides que conferem propriedade hidratante e queratolítica às formulações. Também, podem ser utilizados como agentes anti-inflamatórios, analgésicos e adstringentes (SALVADOR; CHISVERT, 2007).

2.4.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides constituem uma importante e diversificada classe de polifenóis, esses componentes apresentam funções essenciais no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Estão relacionados com a atração de vetores animais para a polinização e dispersão de sementes, com a promoção do crescimento do tubo polínico e com a reabsorção de nutrientes minerais de folhas envelhecidas. Os flavonoides podem ser encontrados na forma livre (aglicona, sem açúcares) ou como heterosídeo (conjugado com açúcares). Na última forma, podem apresentar-se como *O*-heterosídeos quando a ligação dá-se por intermédio de uma hidroxila e de *C*-heterosídeos quando a mesma ocorre com um átomo de carbono. Localizam-se em diferentes partes do vegetal, como nos frutos, folhas, flores e cascas da árvore. Sabe-se que os mesmos podem estar presentes em vacúolos, nas ceras das folhas, no exsudatos e ligados à parede celular nos tecidos das gimnospermas. Existem relatos da presença de flavonoides também no pólen. Trata-se de moléculas de baixo peso molecular que, normalmente, são responsáveis pela coloração das estruturas vegetais nas quais estão localizados (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CUNHA, 2009; EVANS, 2009; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Apresentam diferentes propriedades benéficas como ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e fotoprotetora. Mais de 5000 flavonoides foram identificados, 500 deles encontrados na forma livre. Esses compostos podem apresentar diversas formas estruturais, entretanto, a maioria deles possui uma estrutura química comum, o esqueleto de benzopirona. O núcleo fundamental dos flavonoides é constituído por 15 átomos de carbonos com duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as três unidades citadas anteriormente recebem o nome de núcleo **A**, **B** e **C** como indicado na **Figura 6**. Os átomos de carbono dos núcleos **A** e **C** recebem numeração com números ordinários, o mesmo ocorre com os átomos de carbono do núcleo **B**, porém com o acréscimo de uma linha (') (EVANS, 2009; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Figura 6 – Núcleo fundamental dos flavonoides com a respectiva numeração (SIMÕES et al., 2007).

Os flavonoides são subdivididos em classes que divergem em pequenas partes da sua estrutura básica. As estruturas químicas dos variados flavonoides determinam as atividades farmacológicas exercidas por eles. O **Quadro 2** resume as principais classes com suas respectivas características (CUNHA, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Esses compostos apresentam diversas atividades, como a absorção da radiação ultravioleta, a neutralização de espécies reativas de oxigênio, a inibição de reações radicalares e a inibição de enzimas. Também apresentam atividade anti-inflamatória, exercida por vários mecanismos de ação, impacto no sistema cardiovascular, influência nos sistemas regulatórios e na transmissão de sinais teciduais e afinidade por receptores estrogênicos. O uso de flavonoides na área cosmética e dermatológica é, frequentemente, realizado com a adição de extratos vegetais ricos em tais compostos nas formulações. Apesar da descoberta dos mecanismos de ação dos flavonoides ser um evento relativamente recente, a adição dos mesmos em cosméticos é uma prática antiga. Atualmente, verifica-se o intenso emprego de isoflavonas da soja, catequinas do chá verde, resveratrol e silimarina (mistura de três

flavonoides principais: silibina, silidianina e silicristina da planta *Silybum marianum* L.) na área cosmética (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; DAL'BELO, 2008).

Quadro 2 – Principais classes de flavonoides com suas características (SIMÕES et al., 2007).

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	Co-pigmentação em flores e protetores contra raios UV nas folhas
<i>C</i> -heterosídeos	303	
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes, frequentemente, em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonoides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonoides	70	
Biflavonoides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

A importância cosmética e dermatológica dos flavonoides baseia-se nas propriedades biológicas de ação antioxidante e antirradicais livres, inibição enzimática, resistência capilar, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antialérgica. Neste campo, tornam-se importantes os estudos de permeação cutânea desses compostos, que no caso dos flavonoides são poucos, alguns estudos realizados indicaram que tais compostos permeiam através do estrato córneo podendo alcançar as camadas viáveis da epiderme e da derme. A taxa de permeação é dependente da estrutura química do flavonoide e da composição da formulação na qual o mesmo está inserido. Um estudo *in vitro* realizado por Baby e colaboradores, 2008, em mudas de pele de *Crotalus durissus*, avaliou a penetração e retenção cutânea de uma emulsão contendo o flavonoide rutina. Os autores verificaram que não houve penetração cutânea da rutina através da pele de muda de *C. durissus* no período de seis horas, porém, notaram a retenção cutânea da mesma no modelo de biomembrana utilizado. Esses resultados coincidem com trabalhos realizados em pele humana e de porco, porém, diferem dos resultados obtidos por Valenta e colaboradores, 1999, que indicaram a penetração da rutina

através da pele de rato (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; BABY et al., 2008; SALVADOR; CHISVERT, 2007; VALENTA et al., 1999).

2.4.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIRRADICAIS LIVRES

O consumo natural de oxigênio pelos seres vivos aeróbicos gera processos oxidativos. Em condições normais, o organismo humano é capaz de neutralizar, por sistemas antioxidantes, as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas de maneira fisiológica, porém, em situações patológicas ou sob os efeitos do consumo excessivo de tabaco e álcool, da radiação ionizante e da exposição excessiva e crônica à radiação ultravioleta, estabelece-se um desequilíbrio entre a produção de ERO e os sistemas antioxidantes. Assim, gera-se um estresse oxidativo capaz de produzir danos celulares na pele, tais como: peroxidação lipídica, desnaturação protéica e alterações no DNA. Os danos gerados podem resultar em imunossupressão, envelhecimento precoce da pele e desenvolvimento de câncer de pele (GALVEZ, 2010; NICHOLS; KATIIYAR, 2010).

“Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas às de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato”. Eles podem agir evitando a formação de radicais livres, reparando os danos gerados por eles ou sequestrando os mesmos. As propriedades antioxidantes dos flavonoides são conhecidas desde a metade do século passado. Tais compostos atuam capturando e neutralizando espécies oxidantes como o ânion superóxido, radical hidroxila ou radical peróxido, também podem atuar por sinergismo com outros antioxidantes como a vitamina C e E. Alguns flavonoides são capazes de agir diretamente na formação de radicais livres ligando-se a íons metálicos e assim, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Além disso, inibem enzimas envolvidas na geração de EROs como as cicloxigenases, lipoxigenases, NADPH-oxidases e xantina-oxidases (CUNHA, 2009; GALVEZ, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; NICHOLS; KATIIYAR, 2010; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

A atividade antioxidante de um flavonoide depende da sua estrutura química e das propriedades físico-químicas. Sabe-se que as isoflavonas são bem mais ativas que as flavonas, devido ao efeito estabilizante da carbonila em C-4 e hidroxila em C-5. As 3,4-diidroxi-chalconas, também, são mais ativas que as flavonas análogas, devido a maior deslocalização eletrônica. Os extratos vegetais, por serem constituídos de uma mistura de diversos flavonoides na forma livre e na forma de heterosídeos, podem apresentar vantagens em relação a um flavonoide isolado porque proporcionam um amplo espectro de ação

antirradicalar, atuando em diferentes espécies reativas de oxigênio (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

2.4.2.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Alguns estudos demonstraram que os flavonoides apresentam propriedade anti-inflamatória. A adição de extratos vegetais ricos em flavonoides em formulações cosméticas, frequentemente, tem por objetivo diminuir ou amenizar o potencial irritante de diferentes matérias-primas usadas nas preparações. Observa-se o uso da camomila em formulações destinadas para peles sensíveis e em produtos com apelo calmante e anti-irritante. Sua ação anti-inflamatória é decorrente do seu teor elevado de flavonoides (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

A atuação dos flavonoides no processo de inflamação resulta de uma interação complexa entre os mesmos com os fatores pró-inflamatórios e com as enzimas que participam direta ou indiretamente na geração ou propagação das etapas do processo. Os flavonoides inibem o processo de oxidação dos lipídios das membranas que libera o ácido araquidônico. Alguns flavonoides como a apigenina, presente na camomila, inativam as enzimas 5-lipoxigenase e cicloxigenase (COX) e impedem a transformação do ácido araquidônico em leucotrienos pró-inflamatórios (LTs) e prostaglandinas. Os flavonoides fisetina, hipolaetina, miricetina e quercetina inibem seletivamente a 5-lipoxigenase; a hesperidina e a diosmina inibem a síntese de prostaglandinas PGE2 e PGE2a; e a vagonina inibe diretamente a isoenzima COX-2 e, indiretamente, a produção de óxido nítrico e a síntese de COX-2. O óxido nítrico é responsável pela regulação de muitas funções fisiológicas, incluindo a iniciação e propagação da inflamação (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; SIMÕES et al., 2007).

Outros mecanismos, também, estão envolvidos na ação antiinflamatória dos flavonoides. As antocianidinas inibem a liberação e a síntese de substâncias endógenas promotoras da inflamação, como a histamina, a protease e os leucotrienos, sendo empregadas na prevenção do edema pós-operatório da face (*post-lifting*) (SIMÕES et al., 2007).

2.4.2.3 RESISTÊNCIA CAPILAR

Os flavonoides são capazes de reduzir a permeabilidade capilar e aumentar sua resistência, oferecendo proteção à telangiectasias e petéquias causadas por ruptura de vasos sanguíneos. A rutina e seus derivados exercem efeito protetor nas paredes dos vasos sanguíneos melhorando a microcirculação e o transporte de micronutrientes. Tal fato proporciona melhora na textura e na aparência da pele. Além da rutina, a hesperidina,

também, apresenta propriedade protetora capilar ou ação tônico-venosa e o efeito benéfico desta substância foi observado no tratamento da púrpura hemorrágica e da fragilidade capilar, atuando sobre a enzima hialuronidase, capaz de aumentar a permeabilidade capilar. Em caso de deficiência de hesperidina, a fragilidade capilar aumenta significativamente, entretanto, ocorre regressão nesse processo após suplementação com flavonoides (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

2.4.3 TANINOS

O termo “tanino” foi, inicialmente, empregado por Seguin, em 1796, para identificar as substâncias presentes em extratos vegetais capazes de se combinar com proteínas da pele de animais, impedindo a putrefação das mesmas e convertendo-as em couro. Por vários milênios, o curtimento de peles foi realizado exclusivamente com o uso de plantas taníferas. Atualmente, também se obtém o couro por processos industriais que envolvem compostos minerais. Posteriormente, os taninos foram definidos por Bate-Smith e Swain, em 1962, como “substâncias fenólicas solúveis em água com massa molar entre 500 e 3000 daltons, que apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas” (CUNHA, 2009; EVANS, 2009; HASLAM, 1996; SIMÕES et al., 2007).

Tanto a adstringência característica dessas substâncias quanto a sua capacidade de formar complexos com as fibras de colágeno da pele são explicadas pelas interações hidrofóbicas e pelas ligações de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e algumas macromoléculas. “A estabilidade dos complexos formados com a pele é assegurada por ligações covalentes resultantes da oxidação dos fenóis a quinonas” (CUNHA, 2009; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

Os taninos são classificados em dois grupos segundo sua estrutura: hidrolisáveis e condensados. O primeiro grupo é subdividido em dois grupos, os galotaninos e os elagitaninos. Ambos são metabólitos de um poliol alifático central, geralmente a β -D- glicose, esterificado por moléculas de um ácido fenólico. Se esse ácido fenólico for o ácido gálico, o tanino é denominado galotanino e se for o ácido hexahidroxidifênico (HHDF) denomina-se elagitaninos. O ácido gálico, o ácido hexahidroxidifênico (HHDF) e exemplos de galotaninos e elagitaninos estão representados na **Figura 7** (CUNHA, 2009; QUEIROZ et al., 2002; SIMÕES et al., 2007).

“Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol (catequina) e flavan-3,4-diol (leucoantocianina)”. Também, são denominados proantocianidinas porque esses compostos originam pigmentos

avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral diluído a quente (SIMÕES et al., 2007). A **Figura 8** representa a estrutura de um tanino condensado, a procianidina (QUEIROZ et al., 2002).

Com a introdução de novos métodos de análises e isolamento de componentes, as pesquisas envolvendo os taninos puderam relacionar a estrutura química dos mesmos com suas atividades biológicas e farmacológicas. Os taninos apresentam diversas atividades biológicas, tais como: ação bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e inibidora da peroxidação de lipídeos. Seu uso na Medicina ocorre há séculos sendo indispensável, atualmente, na Dermatologia. Esses compostos são utilizados nos tratamentos de doenças cutâneas inflamatórias. Eles são capazes de impermeabilizar as camadas mais externas da pele e das mucosas por meio da complexação tanino-proteína e/ou polissacarídeo. Assim, limitam a perda de fluidos e impedem as agressões externas favorecendo a regeneração tecidular, o que colabora com o processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações. Observa-se, também, que os taninos apresentam potencial para uso em indivíduos com perda parcial ou total dos cabelos, já que avaliações *in vitro* e *in vivo* da atividade das procianidinas B-1, B-2, B-3 e C-1 e de flavan-3-óis indicaram que algumas destas substâncias, isoladamente, são capazes de induzir a fase de crescimento dos pelos (fase anágena) (CUNHA, 2009; FÖLSTER- HOLST; LATUSSEK, 2007; HASLAM, 1996; SIMÕES et al., 2007).

Trabalhos atuais demonstraram que diversos taninos atuam como sequestradores de radicais livres colaborando com o bloqueio da peroxidação de lipídeos em mitocôndrias hepáticas, com o bloqueio da lipoxigenase, em leucócitos, e da xantinoxidase. Também, demonstraram a ação desses compostos na repressão da formação de radicais ânion superóxido e dos radicais DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Esse conjunto de ações atribuídas aos taninos despertou o interesse científico tanto para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e cosméticos à base de extratos vegetais contendo, principalmente, proantocianidinas quanto para a verificação da eficácia dos mesmos (CUNHA, 2009; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Figura 7 – Estruturas de taninos hidrolisáveis e dos ácidos gálico e hexaidroxidifênico (QUEIROZ et al., 2002).

Figura 8 – Estrutura de tanino condensado – Procianidina (QUEIROZ et al., 2002).

2.5 Açaí (*Euterpe oleracea*)

O açaizero, *Euterpe oleracea*, é uma palmeira tropical cultivada em diversos estados brasileiros como Pará, Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia (**Figura 9**). Antocianinas, proantocianidinas e flavonoides destacam-se entre as classes de metabólitos secundários detectados na mesma. As raízes dessa palmeira são utilizadas, na medicina popular, para o tratamento de verminoses, diarreia, anemia, entre outros. Seu principal produto é o seu fruto, o açaí, utilizado no preparo de sucos e consumido *in natura*, sua polpa, rica em antocianinas e com elevado valor nutritivo, é comercializada à temperatura ambiente ou congelada. O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador desse fruto (MENEZES et al., 2008; SOUZA, 2009).

Testes *in vitro* demonstraram significativa atividade antioxidante nas polpas e sementes do açaí devido à presença de compostos fenólicos (ácidos ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, gálico, protocatecúico, elágico, vanílico e *p*-cumárico, epicatequina e catequina) e antocianinas (cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo). Na área cosmética, observa-se o uso de extratos e óleos de açaí em xampus, condicionadores, cremes para pentear e hidratantes corporais com o apelo de hidratação e promoção da reestruturação e condicionamento dos cabelos. O alto teor de antocianinas nos frutos do açaizero pode ser útil na prevenção e tratamento de desordens cutâneas (ARAÚJO et al., 2010; BOTTARO; GONÇALVES, 2009; SCHULTZ, 2008; SOUZA, 2009).

Figura 9 – *Euterpe oleracea* - Detalhe de ramo frutificado (AÇAÍ - ARCHIVE FOR CATEGORY, 2010)

2.6 Acerola (*Malpighia glabra* L.)

A aceroleira, *Malpighia glabra* L., é uma das principais culturas de exportação da fruticultura brasileira, sendo a região Norte e Nordeste do país as principais produtoras da mesma. Originária da região das Antilhas, norte da América do Sul e América Central, essa planta produz frutos avermelhados ricos em vitamina C consumidos, de forma crescente, por japoneses, europeus e norte-americanos. Além desta substância, a acerola apresenta vitamina A, ferro, cálcio, tiamina, riboflavina, niacina, pectina e antocianinas. Sua polpa concentrada e congelada apresenta potencial de exportação, principalmente, para o Japão, França, Inglaterra, Holanda e Estados Unidos (CAMPELO et al., 1998; CORRÊA et al., 2002; GONÇALVES et al., 2006).

As antocianinas da acerola são responsáveis pela coloração avermelhada das mesmas e a concentração desses compostos polifenólicos pode apresentar uma relação diretamente proporcional com a intensidade da cor vermelha dos frutos. O teor de vitamina C da polpa da acerola varia de 1000 a 4000 mg/100 g de polpa. Essa vitamina, conhecida como vitamina antiescorbuto, desempenha diversas funções no metabolismo. Ela favorece o aumento da resistência orgânica e a formação de colágeno, interfere no metabolismo do ferro e da glicose e na saúde dos dentes e gengivas. A acerola atua na prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento, como hipertensão e câncer, além de apresentar propriedades antifúngica e antioxidante sendo a última importante para a indústria farmacêutica e cosmética. A **Figura 10** mostra parte de uma aceroleira e seu fruto (ASSIS et al., 2008; LIMA et al., 2003; LOPES et al., 1997).

Figura 10 – *Malpighia glabra* L. - Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Malpighia glabra* L., 2010).

2.7 Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.)

A castanha da Índia é nativa das montanhas da Grécia, Bulgária, Cáucaso, norte do Irã e Himalaia, entretanto, é cultivada em diversos locais, principalmente no norte da Europa incluindo a Dinamarca e a Rússia. É comum o cultivo da mesma em parques, avenidas e ruas de grandes centros urbanos. Suas folhas e sementes secas e o óleo extraído de suas sementes são considerados partes medicinais dessa planta. Extratos secos e glicólicos da mesma são produzidos a partir das suas sementes que contêm de 3 a 5% de saponinas triterpênicas, flavonoides, cumarinas, oligossacarídeos, polissacarídeos e taninos condensados, os últimos presentes somente na casca das sementes (FONT QUER, 1995; GRUENWALD, 2000; KÜÇÜKKURT et al., 2010).

O principal componente do extrato da semente de castanha da Índia, a escina, é uma mistura natural de saponinas triterpênicas que apresenta propriedades antiedema, anti-inflamatória e venotônica. Verifica-se o uso de extratos padronizados, em escina, no tratamento de hemorróidas, de insuficiência venosa crônica e em edema pós-operatório. Um estudo *in vivo* realizado por Küçükkurt e colaboradores, 2010, demonstrou que a escina, obtida do extrato alcoólico da semente de castanha da Índia, melhorou o sistema de defesa antioxidante do corpo quando administrada oralmente, em experimentos realizados com camundongos (GRUENWALD, 2000; KÜÇÜKKURT et al., 2010; MELO et al., 2007).

Na área cosmética, o extrato de castanha da Índia é usado em xampus, cremes, loções e pastas de dentes. Estudos demonstraram que o mesmo apresenta ação sequestradora de oxigênio ativo e efeito protetor celular relacionado com propriedades antienvhecimento dos antioxidantes. Frutos e sementes da castanha da Índia estão representados na **Figura 11** (KAPUSTA et al., 2007).

Figura 11 – *Aesculus hippocastanum* L. – Detalhe de frutos e sementes (MARRONNIER COMMUN, 2010).

2.8 Chá verde (*Camellia sinensis*)

A *Camellia sinensis* é uma planta nativa da China e da Índia, cujas folhas secas eram utilizadas no preparo de uma bebida que apresentava efeito estimulante devido à presença de cafeína e em razão dessa característica, foi utilizada por quase 3000 anos com esse propósito. Pode originar diferentes tipos de chá incluindo o branco, o verde, o oolong e o preto. O primeiro é produzido a partir da secagem de folhas jovens e de botões com coloração branca; o segundo é proveniente de folhas frescas tratadas com vapor e submetidas, posteriormente, a um processo de enrolamento, no qual as folhas são comprimidas e enroladas por máquinas contendo rolos compressores (DAL'BELO, 2008; DUKE, 2002; GRUENWALD, 2000).

As folhas de *Camellia sinensis*, se não forem rapidamente secas após serem colhidas, oxidam-se com facilidade, o chá oolong e o chá preto passam por diferentes graus de oxidação em seus preparos, o primeiro sofre processo parcial e o segundo apresenta alto grau de oxidação. Esta reação é interrompida pela tostagem, processo responsável pela secagem do chá. Durante a oxidação, compostos polifenólicos terapêuticos são convertidos em substâncias de menor atividade por enzimas específicas presentes no chá. Esse processo não ocorre no chá verde, devido ao procedimento de preparo que envolve a participação do vapor que inativa tais enzimas (DAL'BELO, 2008; GRUENWALD, 2000).

Metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), saponinas triterpênicas, catequinas (epicatequina (E), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina-3-galato (EGCG)), flavonoides (quercetina, canferol, miricetina), derivados do ácido cafêico (ácido clorogênico), íons inorgânicos (potássio, alumínio) e óleos voláteis são os principais constituintes das folhas dessa planta. A porcentagem desses compostos pode variar de acordo com o envelhecimento da folha e com o processo a qual a mesma é submetida, a cafeína, por exemplo, é reduzida com o envelhecimento da folha e as catequinas são mais abundantes (10-25%) no chá-verde do que no chá preto, pois o mesmo não passa pelo processo de oxidação (DAL'BELO, 2008; GRUENWALD, 2000).

Diversas propriedades são atribuídas ao chá-verde, dentre elas podem-se citar a atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, hepatoprotetora, anti-bacteriana, antialérgica e na prevenção de câncer. Na área cosmética, o extrato de chá verde é, principalmente, utilizado na prevenção e reparo de danos cutâneos provocados pela radiação ultravioleta, devido aos seus efeitos antioxidantes, imunomoduladores e protetores do DNA. A aplicação tópica do extrato de chá verde antes da exposição solar promove a redução da peroxidação lipídica e do eritema. Sabe-se que seus compostos ativos atuam inibindo a enzima lipoxigenase e neutralizando as espécies reativas de oxigênio. Outra ação importante

para a área cosmética é a atividade inibidora da enzima collagenase, essa propriedade justifica o uso do extrato em formulações antienvelhecimento. Folhas frescas de *Camellia sinensis* estão representadas na **Figura 12** (CHUARIENTHONG et al., 2010; DAL'BELO, 2008; GRUENWALD, 2000; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

Figura 12 – *Camellia sinensis* - Detalhe de folhas frescas (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Camellia sinensis*, 2010)

2.9 Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil)

A erva-mate (**Figura 13**) é amplamente utilizada nos países da América do Sul. A bebida preparada com suas folhas é uma das mais consumidas no Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil. O preparo da bebida consiste em triturar suas folhas e mergulhá-las em água quente, a mesma pode ser adoçada e servida a quente ou a frio. Apresenta paladar adstringente e amargo e odor característico e aromático (COZZOLINO et al., 2010; DUKE, 2002; GRUENWALD, 2000).

As folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil possuem alcalóides purínicos, principalmente cafeína (0,3 – 1,7%) e teobromina (0,1 – 0,2%), derivados do ácido caféico (ácido clorogênico, ácido neoclorogênico e ácido criptoclorogênico), flavonoides (rutina, isoquercetina e canferol), saponinas triterpênicas, taninos, ácido ascórbico e óleos voláteis. A erva-mate tem sido utilizada como estimulante em casos de desgaste físico e mental, também é usada na medicina popular em casos de úlceras, reumatismo, anemia, depressão e para prevenção de infecções. Propriedades farmacológicas como ação anti-inflamatória, diurética, antienvelhecimento, hepatoprotetora, entre outras, são atribuídas aos compostos polifenólicos presentes nessa planta (DUKE, 2002; GRUENWALD, 2000; HARRIS et al., 2010).

Na área cosmética, o extrato de erva-mate, preparado com as folhas da planta, é utilizado, principalmente, em produtos para pele devido ao seu potencial antioxidante capaz de prevenir os efeitos danosos da radiação ultravioleta reduzindo os danos oxidativos e a produção de metaloproteínas. De maneira geral, os compostos polifenólicos presentes na

erva-mate e em outras plantas são explorados em formulações antienvhecimento e fotoprotetoras devido às suas propriedades características (SILVA et al., 2010).

Figura 13 – *Ilex paraguariensis* - Detalhe de folhas frescas (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Ilex paraguariensis*, 2010)

2.10 Framboesa (*Rubus idaeus* L.)

A framboesa (**Figura 14**) é originária do centro e norte da Europa (zonas montanhosas do Mediterrâneo) e de parte da Ásia. A cultura de framboesa é desenvolvida em algumas regiões dos Estados Unidos, Chile, Nova Zelândia, Áustria e Rússia. No Brasil, ela é, principalmente, produzida nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais. É consumida, normalmente, *in natura* ou sob a forma de sucos, geléia, doces e vinhos. Apresenta constituintes polifenólicos como os pigmentos antocianinas, responsáveis por sua coloração característica, ácidos fenólicos como o ácido caféico, ferrulíco e elágico, taninos, além de açúcares (7%), vitaminas, pectina e baixas concentrações de ácido salicílico encontrado na forma de salicilato de metila (DUARTE et al., 2010; FONT QUER, 1995; RASEIRA et al., 2004).

A framboesa apresenta atividade antioxidante significativa devido à presença de seus constituintes fitoquímicos e pode atuar na proteção contra o estresse oxidativo biológico em células de mamíferos. Suas folhas são utilizadas, na medicina popular, como agentes antiespasmódicos e adstringentes, o extrato das mesmas é usado no tratamento de diabetes e hipertensão. O uso de suas folhas tem sido recomendado por séculos e acredita-se que as mesmas são capazes de favorecer a produção de contrações uterinas coordenadas, facilitando o trabalho de parto de mulheres grávidas. Os compostos fenólicos de seus frutos apresentam atividade antiviral *in vitro* e o extrato obtido dos mesmos apresenta propriedades hipotensivas (DUARTE et al., 2010; PATEL et al., 2004).

O óleo de suas sementes apresenta atividade anti-inflamatória e pode ser utilizado em diversos produtos cosméticos tais como: pasta dental, creme pós-barba, óleos de banho, xampus, batons, entre outros. Seus constituintes aumentam a efetividade em produtos faciais e corporais, protetores solares e produtos para tratamento de cabelos danificados por meio de benefícios como penetração, hidratação e retenção da umidade na pele (MARUNO, 2009).

Figura 14 – *Rubus idaeus* L.- Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Rubus idaeus* L, 2010)

2.11 Ginco (*Ginkgo biloba* L.)

Ginkgo biloba L. (**Figura 15**) é uma árvore alta que pode alcançar 30 metros de altura, robusta e extremamente duradoura, nativa do Japão, China e Coréia. É a única planta vivente da família Ginkgoaceae sendo considerada um “fóssil vivo” devido à idade aproximada de 250 milhões de anos de alguns de seus fósseis. Ela foi capaz de sobreviver aos bombardeios americanos em Hiroshima, sendo a primeira árvore a brotar depois da bomba atômica detonada em 1945, sem qualquer deformação principal. Seu nome, de origem chinesa, significa damasco prateado (gin = prata, kyo = damasco), a palavra biloba vem do formato bilobado das folhas dessa planta e significa dois leques (bi = dobrar, loba = folha) (BANOV, 2002; DAL'BELO, 2008; GRUENWALD, 2000).

Essa planta apresenta flavonoides (quercetina, canferol), biflavonoides, proantocianidinas, lactonas diterpênicas e sesquiterpênicas, ácidos carboxílicos e catequinas. Propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, vasculares e promotoras das funções cognitivas são associadas a mesma. Seu uso terapêutico iniciou-se na medicina chinesa há, aproximadamente, 5.000 anos. Por volta de 1950, iniciaram-se estudos ocidentais sobre o uso medicinal dessa planta resultando na introdução do extrato de *Ginkgo* na medicina tradicional. Atualmente, o mesmo é utilizado para prevenção e tratamento de arteriosclerose, problemas

de memória, demência, doença de Alzheimer, vertigens e cefaléia (BANOV, 2002; DAL'BELO, 2008; GRUENWALD, 2000).

Na área cosmética, observa-se o uso do extrato de *Ginkgo biloba* L. em formulações antienvelhecimento e fotoprotetoras devido à alta concentração de flavonoides presente no mesmo. Estudos demonstraram que esse extrato é capaz de estimular a síntese de colágeno e que a atividade antioxidante do mesmo pode ser empregada na tentativa de proteção da pele frente aos danos causados pela radiação ultravioleta (DAL'BELO, 2008).

Figura 15 – *Ginkgo biloba* L. – Detalhe de ramo vegetativo (A) e árvore (B) (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Ginkgo biloba* L., 2010)

2.12 Menta (*Mentha piperita* L.)

Mentha piperita L (Figura 16) é uma planta herbácea conhecida como menta, hortelã pimenta e hortelã-apimentada. É uma espécie de grande interesse econômico empregada como condimento e dotada de diversas indicações terapêuticas. É usada contra náuseas, bronquites, anorexia, flatulência, problemas de fígado e como vermífugo brando. É capaz de aliviar cólicas uterinas e facilitar a expectoração, além disso, apresenta atividade carminativa, anti-inflamatória, antiespasmódica, antiemética, analgésica e estimulante (GOLYNSKI, 2003; B. JÚNIOR, 2009).

Os constituintes químicos da *Mentha piperita* L. são flavonoides, ácido fenólico, taninos, ácidos acético, clorogênico, *p*-cumárico, ferrúlico, fórmico, isovalérico e rosmarínico, resinas, limoneno, mentona, mentol, entre outros. Seu óleo essencial constituído, principalmente, por mentol e mentona apresenta ação antimicrobiana e espasmolítica. É empregado na indústria farmacêutica e cosmética e como aditivo em alimentos. Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Hungria, Rússia e EUA são os principais produtores desse óleo que pode apresentar variação em sua constituição de acordo com a idade e circunstâncias de cultivo da planta (temperatura, luz, chuvas, época de colheita, altitude, etc) (FONT QUER, 1995; GOLYNSKI, 2003; B. JÚNIOR, 2009).

Em produtos cosméticos, o óleo de menta é utilizado como componente de fragrâncias, agente de condicionamento da pele e denaturante. É encontrado em diversas formulações, tais como: dentifrícios, condicionadores capilares, produtos para o cuidado da pele e do corpo, batons, entre outros. O extrato de folhas de *Mentha piperita* L também é utilizado como fragrância e agente de condicionamento da pele sendo incorporado em xampus e condicionadores, produtos para o cuidado da pele e do corpo, sabonetes, entre outros (ANDERSEN, 2001).

Figura 16 – *Mentha piperita* L. - Detalhe de folhas frescas (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Mentha piperita* L., 2010)

2.13 Morango (*Fragaria vesca* L.)

A *Fragaria vesca* L. (**Figura 17**) é uma planta encontrada em quase todas as zonas temperadas da Europa e da Ásia. Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo são os maiores produtores brasileiros da mesma. Seus frutos são utilizados como alimento há milênios, entretanto, os estudos das propriedades medicinais dessa planta iniciaram-se, somente, a partir do século XVI. Suas folhas são usadas, popularmente, em casos de diarreia, icterícia, doenças do fígado, tensão nervosa, inflamação de garganta e boca e como diurético. Externamente, são utilizadas como compressas para erupções cutâneas (FONT QUER, 1995; GRUENWALD, 2000; NASCIMENTO; SILVA, 2010).

Essa planta apresenta derivados do ácido caféico como o ácido clorogênico, flavonoides (rutina e quercetina), taninos (proantocianidinas oligoméricas e ácido elágico) e é rica em vitamina C. Seus frutos são considerados fonte de vitaminas, minerais e antioxidantes naturais. Verifica-se o uso do extrato de morango em formulações anticelulíticas devido à presença de seus flavonoides. Esse e outros extratos com ação semelhante possuem a propriedade de estimular a circulação sanguínea periférica e a linfática (BAREL, 2009; FONT QUER, 1995; GRUENWALD, 2000; NASCIMENTO; SILVA, 2010).

Figura 17 – *Fragaria vesca* L. – Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Fragaria vesca* L, 2010)

2.14 Própolis

A própolis, conhecida também como cola de abelha e própolis de abelha, é uma substância resinosa, adesiva, de odor característico e de coloração amarronzada, coletada pelas abelhas a partir de fissuras de cascas de árvores, botões foliares e em exudatos. As abelhas a utilizam para selar suas colméias e mantê-las livres de micro-organismos, uma vez que a própolis possui propriedades antimicrobianas (GRUENWALD, 2000; PAGLIARONE, 2009).

A composição química da própolis é complexa e depende do local e da variedade de árvores usados na sua coleta. Constituintes exclusivos foram identificados na própolis procedente de Cuba e do Brasil. Em geral, a própolis possui 50% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos vegetais, 5% de pólen e 5% de impurezas. Apresenta flavonoides (quercetina, apigenina, galangina, canferol, luteolina, pinocembrina, pinostrobin e pinobansina), terpenos, ácidos fenólicos e ésteres, aminoácidos, hidrocarbonetos, vitaminas, minerais, entre outros. Diversas propriedades são atribuídas à ela, tais como: atividade antibacteriana, cicatrizante, antioxidante, antipirética, antifúngica, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antitrombótica e imunomoduladora (GRUENWALD, 2000; PAGLIARONE, 2009).

É possível preparar diferentes extratos com a própolis, sendo os alcoólicos os mais comumente utilizados. Os aquosos apresentam boa atividade antioxidante e estão associados com altas quantidades de compostos fenólicos. Diversos produtos cosméticos apresentam própolis ou extratos de própolis em suas composições e observa-se a presença dos mesmos em cremes, xampus, batons, pastas de dente, enxaguantes bucais, entre outros. A **Figura 18** representa as quatro colorações possíveis de própolis (amarela, vermelha, verde e marrom),

dependentes da origem vegetal e da composição química da mesma (BAUMANN, 2007; PAGLIARONE, 2009).

Figura 18 – Própolis marrom (A); amarela (B); verde (C) e vermelha (D). (MISCELLANEOUS BEE EQUIPMENT; NATUCENTRO PRÓPOLIS, 2010)

2.15 Romã (*Punica granatum* L.)

A romãzeira (*Punica granatum* L.) é nativa do Oriente Médio, da região que abrange desde o Irã até o Himalaia. Ela cresce em regiões áridas florescendo em junho e frutificando no período de setembro a fevereiro. Trata-se de um arbusto lenhoso, ramificado, de folhas pequenas, rijas e brilhantes. Seu fruto esférico abriga muitas sementes revestidas pela polpa e apresenta antocianinas (delfinina, cianidina, pelargonidina), flavonoides (rutina, quercetina), taninos hidrolisáveis e ácidos fenólicos (gálico e elágico). A planta, de maneira geral, apresenta taninos em concentração elevada (22% a 25% de ácido punicotânico), alcalóides (pelieterina, isopelieterina), entre outros componentes (CATÃO et al., 2006; FONT QUER, 1995; JARDINI, 2010; WERKMAN et al., 2008).

A casca do caule e o fruto da romãzeira são recomendados, pela medicina popular, para o tratamento de diversas doenças. A casca do caule é utilizada como vermífugo no combate às tênias; as cascas do fruto são usadas em casos de diarreia, infecções de pele e mucosas e as sementes frescas para afecções da boca e garganta. Diversas propriedades são atribuídas à *Punica granatum* L., podem-se citar a atividade antimicrobiana, antioxidante, estrogênica, antineoplásica e hipoglicêmica, entre outras (CATÃO et al., 2006; WERKMAN et al., 2008).

Diversos estudos têm sido realizados com essa planta e seus extratos. Na área cosmética, experimentos com extrato aquoso da casca do fruto demonstraram capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos da derme e a síntese de colágeno, além de inibir a enzima (MMP-1) responsável pela destruição do colágeno em peles envelhecidas. Outros estudos sugeriram que os extratos de romã, rico em polifenóis, podem melhorar a eficácia de

fotoprotetores tópicos e atuar como agentes de fotoquimioprevenção. A **Figura 19** apresenta uma romãzeira com seus frutos (ASLAM et al., 2006; BAUMANN, 2007).

Figura 19 – *Punica granatum* L. – Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Punica granatum* L., 2010).

2.16 Uva (*Vitis vinifera* L.)

A videira (**Figura 20**) é uma trepadeira da família das vitáceas, cujo fruto é a uva. Existem milhares de variedades de uva no mundo, sendo que a maioria delas pertence à espécie *Vitis vinifera* L., originária do sul europeu e do oeste asiático. Atualmente, o cultivo da mesma ocorre em todas as regiões temperadas do mundo. A uva apresenta considerável valor nutricional devido à sua riqueza de minerais, vitaminas e compostos fenólicos. Apresenta, também, glicose, frutose, vitamina C, elementos minerais (cálcio, sódio, zinco, iodo, cobre, fósforo, enxofre, etc.), aminoácidos, polipeptídeos e proteínas (FONT QUER, 1995; GRUENWALD, 2000; PINHEIRO, 2008).

A *Vitis vinifera* L. apresenta em sua constituição, flavonoides, taninos (proantocianidinas), resveratrol, ácidos málico, cítrico, oxálico e tartárico, entre outros compostos. Na medicina popular, é utilizada em doenças venosas e em casos de distúrbios da circulação sanguínea. Efeitos anticarcinogênico, antioxidante, cardioprotetor, hepatoprotetor e citoprotetor têm sido associados a ela (GRUENWALD, 2000).

Estudos com extratos obtidos das sementes de seus frutos demonstraram que as procianidinas presentes no mesmo são capazes de inibir a atividade de algumas enzimas proteolíticas (colagenase e elastase) envolvidas na degradação dos componentes da matriz extracelular melhorando a elasticidade, flexibilidade e aparência da pele. As proantocianidinas extraídas das sementes de uva apresentam papel importante no crescimento capilar, agindo na conversão da fase telógena do ciclo de crescimento capilar para a fase

anágena. Outros estudos demonstraram que esse extrato eleva o Fator de Proteção Solar (FPS) de formulações tópicas apresentando intensa atividade antioxidante. Pelas propriedades que possui, é incorporado, em diversas formulações de ação antienvhecimento (BAUMANN, 2007; GRUENWALD, 2000).

Figura 20 – *Vitis vinifera* L. – Detalhe de ramo frutificado (HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE - *Vitis vinifera* L, 2010)

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral selecionar os seis extratos comerciais glicólicos com maiores teores de polifenóis e flavonoides totais e com maior atividade antioxidante dentre doze extratos (açai, acerola, castanha da Índia, chá verde, erva-mate, framboesa, ginkgo, menta, morango, própolis, romã e uva) para realização de Estudo da Estabilidade e avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos mesmos.

Os objetivos específicos envolveram a quantificação dos polifenóis totais equivalentes em ácido gálico e dos flavonoides totais equivalentes em quercetina dos doze extratos glicólicos de uso cosmético, não padronizados e disponíveis no mercado brasileiro, empregando métodos espectrofotométricos; e a determinação da atividade antioxidante dos mesmos por duas metodologias distintas: atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos/Acessórios

- Balança analítica *Sartorius* (BL - 210S) – Sartorius;
- Balanças semi-analíticas *Mettler* (P - 120) – Mettler – e *Scientech* (SA210) – Quimis;
- Banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner*[®] - Unique – Modelo 1600^a;

- Capilares de vidro para aplicação de amostras;
- Cubas cromatográficas de vidro com fundo chato;
- Destilador de água (106) – Fabbe;
- Espalhador de sílica manual;
- Espectrofotômetro UV-1203 UV/Vis Shimadzu com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm - Beckman Coulter;
- Estufa de secagem com circulação de ar;
- Lâmpada ultravioleta de comprimento de onda longo ($\lambda = 365 \text{ nm}$);
- Leitor multi-modal de microplacas *Synergy HT* - Biotek e microplacas de 96 poços;
- Micropipeta 50 a 200 μL – Labsystems – e micropipeta 5 a 50 μL ;
- Papel de filtro qualitativo;
- Placas de vidro (20 x 20 cm) com 4 mm de espessura;
- Refrigerador (Ecoplus 370) Bosch;
- Secador de cabelos

4.1.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes possuíam grau de pureza analítico (PA):

- AAPH (2,2 – azobis (2-amidinopropano) diidrocloreto) - Aldrich Co;
- Acetato de etila (Synth) – LabSynth;
- Ácido acético glacial (Synth) – LabSynth;
- Ácido clorídrico concentrado – Casa Americana;
- Ácido fórmico (Synth) – LabSynth;
- Álcool etílico 95% (Synth) – LabSynth;
- Álcool metílico 95% PA-ACS (Synth) – LabSynth;
- Carbonato de sódio – Merck;
- Cloreto de alumínio – Vetec;
- Fluoresceína (3,6 – dihidroxiespiro (isobenzofuran-1 {3H}9{9H}-xanten-3-ona) 40 nM;
- Magnésio metálico em raspas PA – F Maia;
- Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) – Aldrich Co;
- Reagente de Folin-Ciocalteu – Merck;
- Revelador de flavonóides NP – difenilboriloxietilamina a 1% em metanol;
- Sílica Gel 60G[®] - Merk;
- Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 97% - Aldrich Co;
- Tampão fosfato 75 mM, pH = 7,1

4.1.3 Substâncias químicas de referência

- Rutina padrão de referência secundário, teor de pureza 96,1% (NF XI);
- Quercetina padrão de referência secundário, teor de pureza 96% (NF XI) Sigma Chemical CO;
- Ácido gálico padrão de referência secundário, teor de pureza 97% – Merck;
- Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) padrão de referência secundário, teor de pureza 97% - Aldrich Co;

4.1.4 Matérias-primas

- Extratos comerciais glicólicos não padronizados, fornecidos pela indústria brasileira A. Optou-se por não revelar o nome da empresa visando evitar *marketing* da mesma nesse estudo acadêmico:

- Açaí (*Euterpe oleracea*), INCI: *Euterpe oleracea fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto;

- Acerola (*Malpighia glabra* L.), INCI: *Malpighia glabra fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto;

- Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), INCI: *Aesculus hippocastanum seed extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Semente;

- Chá verde (*Camellia sinensis*), INCI: *Camellia sinensis leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;

- Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), INCI: *Ilex paraguariensis leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha

- Framboesa (*Rubus idaeus* L.), INCI: *Rubus idaeus fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto;

- Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), INCI: *Ginkgo biloba leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;

- Menta (*Mentha piperita* L.), INCI: *Mentha piperita leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;

- Morango (*Fragaria vesca* L.), INCI: *Fragaria vesca fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto;

- Própolis, INCI: *Propolis extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Substância resinosa;

- Romã (*Punica granatum* L.), INCI: *Punica granatum fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto;

- Uva (*Vitis vinifera* L.), INCI: *Vitis vinifera fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto.

4. 2 Métodos

4.2.1 Avaliação da presença de flavonoides por ensaios cromáticos e cromatográficos

Antes de se proceder à quantificação de polifenóis e flavonoides totais nas doze amostras comerciais dos extratos glicólicos, realizou-se a análise preliminar da presença de flavonoides nos mesmos. Utilizaram-se ensaios cromático e cromatográfico como ferramentas para verificação da presença desses compostos. A reação de Shinoda (ensaio cromático) foi realizada adicionando 2 ou 3 fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de ácido clorídrico concentrado em alíquota de 1 mL de cada uma das doze amostras de extratos glicólicos, em tubos de ensaio. Procedeu-se com a agitação manual dos tubos de ensaio e com a detecção visual da presença de flavonoides, confirmada com a coloração variando do róseo a vermelho.

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada de acordo com Wagner e Bladt, 1996. Dois padrões de referência (rutina e quercetina) foram escolhidos e preparados para o ensaio. Os padrões foram dissolvidos em metanol obtendo-se soluções metanólicas a 0,05% p/v. As placas de vidro (20 x 20 cm) de 4 mm de espessura, devidamente limpas e secas, foram preparadas utilizando sílica-gel como adsorvente. Procedeu-se com o preparo de uma suspensão da Sílica Gel 60 G[®] em água destilada na proporção de 32 g para 100 ml e aplicou-se a mesma com o auxílio de um espalhador manual, de maneira uniforme, sobre as placas de vidro com 1 mm de espessura. Após a deposição, as placas permaneceram em repouso em temperatura ambiente sendo, posteriormente, transferidas e mantidas em estufa com faixa de temperatura de 105 a 110 °C, por 1 hora. Os solventes constituintes da fase móvel foram selecionados após análises preliminares de polaridade e considerando a natureza química das substâncias empregadas. Sistemas direcionados para a detecção de flavonoides foram testados resultando na escolha de dois sistemas distintos. O sistema destinado à detecção de flavonoides utilizando o padrão de referência rutina consistia em acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água destilada (100:11:11:26), enquanto que o sistema envolvendo o padrão de referência quercetina era composto de acetato de etila, ácido acético glacial e água destilada (100:20:6) (WAGNER & BLADT, 1996).

As amostras dos extratos glicólicos foram aplicadas em 4 placas distintas, duas para o estudo de detecção do flavonoide rutina e as outras duas para a quercetina. A aplicação das amostras foi realizada a aproximadamente 1 cm da base inferior das placas com o auxílio de capilares de vidro. Foi necessário 1 mL de cada amostra para a formação dos halos nas placas,

o uso de um secador de cabelos convencional foi necessário para manter as dimensões adequadas dos halos gerados. Os padrões foram igualmente aplicados com capilares de vidro.

Cubas cromatográficas de vidro com fundo chato foram previamente preparadas tendo suas paredes laterais internas recobertas por papel de filtro de modo a facilitar a sua saturação com os vapores da fase móvel. Após a saturação total das cubas, as placas preparadas foram inseridas, cuidadosamente, nas mesmas para evitar distorções no percurso da fase móvel. A subida da fase móvel nas placas por capilaridade até restar aproximadamente 2 cm da extremidade superior ocorreu em torno de 2 horas. Após essa etapa, as placas foram secas à temperatura ambiente, reveladas com o revelador de flavonoides (difenilboriloexietilamina a 1% em metanol) e visualizadas sob luz ultravioleta utilizando comprimento de onda longo (365 nm).

4.2.2 Teor de polifenóis totais

Diversas técnicas são utilizadas na determinação do teor de fenólicos totais, entretanto, a metodologia envolvendo o reagente de Folin-Ciocalteu destaca-se como uma das mais extensivamente utilizadas. Por conseguinte, a mesma foi adotada com algumas modificações para a quantificação de polifenóis totais nas amostras de extratos vegetais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 b; SINGLETON et al., 1999).

O procedimento foi realizado transferindo-se exatamente 0,1 mL de cada amostra dos extratos glicólicos para balões de 10,0 mL, com adequação de diluição ou não. As amostras dos extratos glicólicos de ginkgo, erva-mate, chá verde, própolis, menta, romã e açaí foram diluídas em água destilada e em proporções adequadas (para leitura de absorbância na faixa de 0,1 a 1,0) após testes preliminares, sendo o valor da diluição considerado no cálculo final do teor de polifenóis totais. Da mesma maneira que os demais extratos não diluídos, exatamente 0,1 mL de cada diluição realizada foram transferidos para balões de 10,0 mL. Foram adicionados exatamente 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6,0 mL de água destilada aos balões e, após um minuto, acrescentaram-se exatamente 2,0 mL de solução 15% p/v de carbonato de sódio. O volume dos balões foi completado com água destilada. Após 2 horas de repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), procedeu-se às leituras espectrofotométricas a 750 nm. O branco utilizado no sistema foi preparado da mesma maneira e com os mesmos reagentes, porém sem adição das amostras. As análises foram realizadas em triplicata e, em cada ensaio, foram feitas 6 leituras espectrofotométricas. O teor de polifenóis totais foi obtido por meio da equação da reta da curva analítica do ácido gálico

padrão de referência secundário e expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) (SINGLETON et al., 1999).

4.2.2.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método foi estabelecida com a construção da curva analítica das diluições seriadas do ácido gálico padrão de referência secundário (pureza de 97%). Pesaram-se exatamente cerca de 200,0 mg do ácido gálico padrão de referência secundário em balão de 200,0 mL e completou-se o volume com água destilada, obtendo-se uma solução de concentração 1,0 mg/mL. Diluições seriadas foram realizadas utilizando alíquotas exatas da solução inicial de modo a obter as seguintes concentrações de ácido gálico padrão secundário: 150,0; 250,0; 350,0; 500,0; 600,0; 750,0 e 1000,0 µg/mL.

Alíquotas exatas de 0,1 mL de cada concentração do ácido gálico padrão secundário foram transferidas para balões de 10,0 mL. Em seguida, adicionaram-se exatamente 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6,0 mL de água destilada. Após um minuto, adicionaram-se exatamente 2,0 mL de solução 15% p/v de carbonato de sódio e completou-se o volume do balão com água destilada. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a presença da amostra. As soluções permaneceram em repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C) por um período de 2 horas e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 750 nm. O procedimento foi realizado em réplicas de seis e, a partir da média dos valores de absorbância obtidos, calculou-se a equação da reta da curva analítica (absorbância *versus* concentração) pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003; SINGLETON et al., 1999; USP, 2009).

O limite de detecção (LD), menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, e o limite de quantificação (LQ), menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas, foram determinados, respectivamente, por meio da **Equação 1** e da **Equação 2** (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003).

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Equação 1 – Limite de detecção estimado (LD). Onde: DP_a é o desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica e IC é a inclinação da curva analítica.

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Equação 2 – Limite de quantificação estimado (LQ). Onde: DP_a é o desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica e IC é a inclinação da curva analítica.

4.2.3 Teor de flavonoides totais

Escolheu-se um método Farmacopéico amplamente utilizado para a realização dos ensaios de quantificação do teor de flavonoides totais. Esse método é baseado na complexação dos flavonoides com o cloreto de alumínio (BANOV, 2002; BRASIL, 2003; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010 c; STAHL & SCHILD, 1981).

Os ensaios foram realizados utilizando exatamente 10,0 mL de cada amostra dos extratos glicólicos em balões de 25,0 mL, com adequação de diluição ou não. As amostras dos extratos glicólicos de ginkgo, castanha da Índia, erva-mate, chá verde, própolis, menta, romã e açaí foram diluídas em solução metanólica 5% v/v de ácido acético glacial e em proporções adequadas (para leitura de absorbância na faixa de 0,1 a 1,0) após testes preliminares, sendo o valor da diluição considerado no cálculo final do teor de flavonoides totais. Da mesma maneira que os demais extratos não diluídos, exatamente 10,0 mL de cada diluição realizada foram transferidos para balões de 25,0 mL e, em seguida, exatamente 2,0 mL de solução metanólica 2% p/v de cloreto de alumínio foram adicionados. Completou-se o volume dos balões com solução metanólica 5% v/v de ácido acético glacial. Após 30 minutos de repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), procedeu-se às leituras espectrofotométricas a 425 nm. O branco utilizado no sistema foi preparado da mesma maneira e com os mesmos reagentes, porém sem adição das amostras. As análises foram realizadas em triplicata e, em cada ensaio, foram feitas 6 leituras espectrofotométricas. O teor de flavonoides totais foi obtido por meio da equação da reta da curva analítica do flavonoide quercetina padrão de referência secundário e expresso em equivalentes de quercetina (EQ) (BANOV, 2002; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010 c; STAHL & SCHILD, 1981).

4.2.3.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método foi estabelecida com a construção da curva analítica das diluições seriadas do flavonoide quercetina padrão de referência secundário (pureza de 96%). Pesaram-se exatamente cerca de 50 mg do flavonoide quercetina padrão de referência secundário em balão de 100,0 mL e completou-se o volume com solução metanólica 5% v/v de ácido acético glacial. Em seguida, transferiram-se 5,0 mL dessa solução para um balão de 50 mL, completando o volume com a mesma solução metanólica, obtendo-se, assim, uma solução de concentração 50 µg/mL. Diluições seriadas foram realizadas utilizando alíquotas exatas da solução inicial de modo a obter as seguintes concentrações de quercetina padrão secundário: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 µg/mL.

Alíquotas exatas de 10,0 mL de cada concentração de quercetina padrão secundário foram transferidas para balões de 25,0 mL. Em seguida, adicionaram-se exatamente 2,0 mL de solução metanólica 2% p/v de cloreto de alumínio e completou-se o volume do balão com solução metanólica 5% v/v de ácido acético glacial. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a amostra. As soluções permaneceram em repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C) por um período de 30 minutos e a leitura espectrofotométrica das mesmas foi realizada a 425 nm. O procedimento foi realizado em réplicas de seis e, a partir da média dos valores de absorbância obtidos, calculou-se a equação da reta da curva analítica (absorbância *versus* concentração) pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando, respectivamente, as **Equações 1 e 2** (BANOV, 2002; BRASIL, 2003; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010 c; STAHL & SCHILD 1981; USP 2009).

4.2.4 Atividade antioxidante pela ação sequestradora do radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante dos extratos glicólicos foi realizada de acordo com as metodologias que avaliam a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), por ação de substâncias antioxidantes ou espécies radicalares com algumas modificações no procedimento (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SANCHEZ-MORENO et al., 1998; WANG et al., 2008).

O procedimento foi realizado utilizando exatamente 0,5 mL de cada amostra dos extratos glicólicos em tubos de ensaio. Cada amostra de extrato foi diluída em álcool etílico e em proporções específicas (para leitura de absorbância na faixa de 0,1 a 1,0) após testes preliminares, o valor da diluição foi considerado no cálculo final da determinação da atividade antioxidante. Após a adição de 0,5 mL das amostras em tubos de ensaio, adicionaram-se exatamente 2,5 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 100 µM. Da mesma forma, preparou-se um controle constituído de exatos 0,5 mL de álcool etílico e 2,5 mL de solução etanólica de DPPH 100 µM. Os tubos de ensaio foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2$ °C) e ao abrigo da luz por período de 30 minutos. Na sequência, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância, em espectrofotômetro, das soluções a 517 nm. Os antioxidantes presentes nas amostras dos extratos glicólicos reagiram com o DPPH doando um hidrogênio e, portanto, reduzindo-o. Essa redução resulta em decréscimo nos valores da absorbância, tal processo está exemplificado na **Figura 21**.

Figura 21 – Reação entre o radical livre DPPH e um antioxidante (WANG et al., 2008).

O branco utilizado no sistema foi álcool etílico P.A. As análises foram realizadas em triplicata e, em cada ensaio, foram feitas 6 leituras espectrofotométricas. A porcentagem de inibição do radical DPPH para cada amostra de extrato vegetal foi calculada de acordo com a **Equação 3**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{[(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra})]}{\text{Absorbância do controle}} * 100$$

Equação 3 – Cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH

Os resultados finais da atividade antioxidante foram calculados por meio da equação da reta da curva analítica de trolox[®] padrão de referência secundário (porcentagem de inibição *versus* concentração) e expressos em TEAC (atividade antioxidante em trolox[®] equivalente), mM de trolox[®] equivalente (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SANCHEZ-MORENO et al., 1998; WANG et al., 2008).

4.2.4.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método foi estabelecida com a construção da curva analítica de diluições seriadas do Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) padrão de referência secundário (pureza de 97%). Pesaram-se exatamente cerca de 20 mg de Trolox[®] padrão de referência secundário em balão de 100,0 mL e completou-se o volume com álcool etílico P.A, obtendo-se uma solução de concentração 800,0 µM. Diluições seriadas foram realizadas utilizando alíquotas da solução inicial de modo a obter as seguintes concentrações de Trolox[®] padrão secundário: 100,0; 140,0; 180,0; 220,0; 300,0 e 340,0 µM.

Alíquotas exatas de 0,5 mL de cada concentração de Trolox[®] padrão secundário foram transferidas para tubos de ensaio. Em seguida, adicionaram-se exatamente 2,5 mL de solução

etanólica de DPPH 100 μ M. Semelhantemente, preparou-se o controle com exatos 0,5 mL de álcool etílico substituindo a amostra. Após agitação dos tubos, os mesmos permaneceram em repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2$ °C) e ao abrigo da luz por período de 30 minutos. A redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura espectrofotométrica a 517 nm. Utilizou-se álcool etílico P.A como branco de leitura, a porcentagem de inibição do radical DPPH para cada concentração do padrão Trolox[®] foi calculada com o auxílio da **Equação 3**. O procedimento foi realizado em réplicas de seis e, a partir da média dos valores de porcentagem de inibição do radical DPPH obtidos, calculou-se a equação da reta da curva analítica (porcentagem de inibição *versus* concentração) pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003; WANG et al., 2008).

4.2.5 Atividade antioxidante por ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

A determinação da atividade antioxidante dos extratos glicólicos por ORAC foi baseada na medida do decréscimo da fluorescência da fluoresceína (3,6 – dihidroxiespiro (isobenzofuran-1 {3H}9{9H}-xanten-3-ona), como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo pela ação da peroxila gerada pelo APPH (2,2 – azobis (2-amidinopropano)diidrocloreto). Os antioxidantes presentes nas amostras dos extratos glicólicos reagiram rapidamente com os radicais peroxila doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Essa inibição promovida foi proporcional à atividade antioxidante das amostras de extratos glicólicos. A perda de fluorescência da fluoresceína não segue a cinética de ordem zero, ou seja, não é linear com o tempo, mas exponencial com o tempo, portanto, a técnica empregada para a quantificação foi a da área sob a curva de decréscimo (AUC) (LIMA, 2008; PRIOR; CAO, 1999).

O ensaio foi realizado utilizando Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como padrão. Microplacas de 96 poços foram requeridas para preparo da curva analítica de Trolox[®] e para as análises dos extratos glicólicos. Todos os testes foram realizados em triplicata. As concentrações do padrão Trolox[®] foram preparadas em tampão fosfato 75mM pH=7,1, assim como as diluições dos extratos glicólicos necessárias para adequação ao método proposto. A partir de uma concentração inicial de padrão trolox[®], diluições seriadas foram preparadas de modo a obter as seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 μ M. Os poços das primeiras e das últimas linhas e colunas da microplaca foram preenchidos com exatamente 300 μ L de água destilada para manter a temperatura do sistema. Cada poço da microplaca recebeu exatamente 25,0 μ L de amostra, podendo ser

amostras das concentrações de Trolox[®] para elaboração da curva padrão ou amostras das diluições dos extratos. Em seguida, exatos 150,0 µL de fluoresceína 40 nM foram adicionados. Após 30 minutos de incubação a 37,0 °C adicionaram-se exatamente 25 µL de AAPH 153 mM. O branco foi preparado com exatos 200 µL de tampão fosfato pH= 7,1. A intensidade da fluorescência das amostras (485 nm_{ex}/ 525 nm_{em}) foi determinada a cada 5 minutos, durante 1 hora, em leitor multi-modal de microplacas *Synergy HT* – Biotek. As áreas sob a curva de decréscimo (AUC) da perda de fluorescência da fluoresceína de cada concentração do padrão trolox[®] foram utilizadas para a construção da curva analítica (AUC *versus* concentração). A equação da reta dessa curva foi calculada pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados e utilizada na determinação da atividade antioxidante dos extratos glicólicos expressa em micromolar de Trolox[®] equivalente.

4.2.6 Análise estatística dos ensaios realizados

A análise estatística dos resultados obtidos em cada ensaio, anteriormente citado, foi realizada no Excel 2000 e no programa STATISTICA Release 7.0. A média, o desvio padrão, a análise de variância (ANOVA *one-way*) e, quando apropriado, o teste de Tukey foram as ferramentas utilizadas para determinação de resultados estatisticamente significativos, considerando $n=3$ e $p \leq 0,05$. Quando apropriado, também, realizou-se o teste T de *Student* para comparações entre pares de resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da presença de flavonoides por ensaios cromáticos e cromatográficos

O teste cromático utilizando a reação de cianidina, de Shinoda ou hidrogenação apresentou importância como estágio preliminar de análise. Os ensaios cromáticos apresentam importância como etapa prévia na análise de flavonoides e, em alguns casos, é possível diferenciar as diversas classes desse grupo por meio desta metodologia. A reação da cianidina, de Shinoda ou hidrogenação é uma técnica cromática amplamente empregada na detecção de flavonoides. Os derivados flavônicos de coloração amarela reduzem-se adquirindo coloração avermelhada e os antociânicos adquirem coloração azulada (SIMÕES et al., 2007).

No ensaio realizado, foi possível verificar a presença de flavonoides em quatro extratos glicólicos que adquiriram coloração variando do róseo ao vermelho indicando a redução de derivados flavônicos de coloração amarela. A **Tabela 1** sintetiza os resultados obtidos, os extratos de açaí (*E. oleracea*), romã (*P. granatum*), uva (*V. vinifera*) e framboesa (*R. idaeus*) apresentaram resposta positiva ao teste.

Tabela 1 – Identificação cromática de flavonoides por meio do teste de Shinoda

Extratos glicólicos												
Ensaio	Açaí	Acerola	Castanha da índia	Chá verde	Erva mate	Framboesa	Ginco	Menta	Morango	Própolis	Romã	Uva
Coloração Anterior
	Marrom	Amarelo claro	Amarelo claro	Laranja claro	Laranja	Amarelo claro	Laranja claro	Marrom escuro	Amarelo claro	Amarelo claro	Marrom claro	Laranja claro
Coloração Posterior
	Vermelho	Laranja	Amarelo escuro	Laranja escuro	Laranja escuro	Rosa claro	Laranja escuro	Marrom	Laranja claro	Amarelo	Vermelho escuro	Vermelho claro
Resultado final
	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Os resultados dos ensaios de cromatografia em camada delgada (CCD) estão representados, esquematicamente, nas **Figuras 22 e 23**. As figuras correspondem, respectivamente, aos sistemas envolvendo o padrão de referência rutina e o padrão de referência quercetina. As colorações indicadas nas figuras reproduzem o observado nas placas cromatográficas após revelação das mesmas com difenilboriloexietilamina (1% p/v em metanol), sob luz ultravioleta (365 nm). Esse reagente é capaz de detectar todos os flavonoides, não sendo específico para determinadas classes de flavonoides. As manchas geradas nas placas de CCD após a revelação com o mesmo são laranjas, amarelas ou verdes (SIMÕES et al., 2007).

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi a técnica escolhida para realização do ensaio cromatográfico por ser uma metodologia rápida, simples, reprodutível e econômica. Essa técnica de adsorção líquido-sólido permite separar componentes de uma mistura por migração diferencial dos mesmos em função das forças de interação entre duas fases imiscíveis: móvel e estacionária. Especificamente, a separação ocorre pela diferença de afinidade dos componentes da mistura presentes na fase móvel pela fase estacionária. Essa metodologia é amplamente utilizada para acompanhamento de reações orgânicas e para purificação e identificação de substâncias (DEGANI et al, 1998).

Verificou-se, de acordo com a **Figura 22** que os extratos glicólicos de ginkgo (*G. biloba*), chá verde (*C. sinensis*), açaí (*E. oleracea*), acerola (*M. glabra*), castanha da Índia (*A. hippocastanum*), romã (*P. granatum*), própolis e erva-mate (*I. Paraguariensis*) apresentaram flavonoides em sua constituição, uma vez que as pequenas manchas geradas, após revelação da placa, possuíam coloração laranja ou verde. Não foi possível verificar a presença do flavonoide rutina, utilizado como referência, nos doze extratos analisados. Pequenas manchas de coloração laranja, verde ou amarela indicaram, na **Figura 23**, que os extratos glicólicos de ginkgo (*G. biloba*), chá verde (*C. sinensis*), romã (*P. granatum*), própolis, uva (*V. vinifera*), framboesa (*R. idaeus*), morango (*F. vesca*) e menta (*M. piperita*) apresentaram flavonoides. Não se verificou a presença do flavonoide quercetina, usado como referência, nas doze amostras estudadas. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) revelou que todos os extratos glicólicos selecionados apresentaram flavonoides em sua constituição. Assim, pôde-se proceder à quantificação dos mesmos nos extratos.

Figura 22 – Placa cromatográfica dos extratos glicólicos para o sistema com padrão de flavonoide rutina

Figura 23 – Placa cromatográfica dos extratos glicólicos para o sistema com padrão de flavonoide quercetina

5.2 Teor de polifenóis totais

O cálculo do teor de polifenóis totais das amostras dos extratos glicólicos foi realizado com o auxílio da curva analítica do ácido gálico padrão de referência secundário (pureza de 97%). A curva analítica (**Figura 24**) foi construída de acordo com os valores de absorbância das diferentes concentrações de ácido gálico, expostos na **Tabela 2** que, também, apresenta o estudo do intervalo da curva analítica.

Figura 24 – Curva analítica média do ácido gálico padrão de referência secundário (n=6)

O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados gerou a equação da reta descrita na **Equação 4**, com valores de **intersecção com o eixo y** e **coeficiente angular** (inclinação da reta) iguais a 0,0055 e 0,0009, respectivamente, e **coeficiente de correlação linear** (R^2) médio igual a 0,9971.

$$y = 0,0009 x + 0,0055$$

Equação 4 - Equação da reta da curva analítica média do ácido gálico padrão de referência secundário obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde **x** é a concentração do ácido gálico padrão de referência secundário (µg/mL) e **y** é a absorbância.

A partir da equação da reta obtida foi possível calcular o teor de polifenóis totais dos extratos glicólicos, conforme exposto na **Tabela 3**. Esse teor foi calculado por meio da

Equação 4, sendo obtido a partir da substituição de y pelo valor da absorbância obtida nos ensaios de quantificação de polifenóis e expresso em EAG (equivalentes de ácido gálico) mg/mL. O programa STATISTICA Release 7.0 foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os teores de polifenóis totais dos extratos glicólicos. Utilizou-se análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do Teste de Tukey ($n = 3$; $p < 0,05$). O resultado obtido está expresso na **Tabela 3**. A **Figura 25** ilustra, comparativamente, os teores de polifenóis dos extratos glicólicos.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 3** e a **Figura 25**, que o extrato glicólico de romã (*P. granatum*) apresentou o maior teor de polifenóis totais dentre os extratos avaliados. Os extratos de erva-mate (*I. paraguariensis*), menta (*M. piperita*), chá verde (*C. sinensis*), açaí (*E. oleracea*), ginko (*G. biloba*) e própolis apresentaram, nesta ordem, valores decrescentes de polifenóis totais. Os extratos glicólicos de uva (*V. vinifera*) e morango (*F. vesca*) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, assim como os extratos de acerola (*M. glabra*) e castanha da Índia (*A. hippocastanum*), esses quatro extratos apresentaram teores de polifenóis inferiores ao do grupo de extratos citado anteriormente. O extrato de framboesa (*R. idaeus*) foi o que apresentou menor teor de polifenóis totais.

Considerando as diferenças estatisticamente significativas, puderam-se ordenar os extratos glicólicos na seguinte ordem decrescente de teor de polifenóis totais: romã; erva-mate; menta; chá verde; açaí; ginko; própolis; acerola e castanha da Índia; uva e morango; e framboesa.

Estudos envolvendo a quantificação de polifenóis totais em matérias-primas cosméticas são importantes para garantir a eficácia das formulações desenvolvidas com as mesmas. Diversas atividades clínicas são atribuídas aos componentes naturais utilizados na Cosmetologia, entretanto, tornam-se necessários estudos científicos *in vitro* e *in vivo* que comprovem tais atividades (DAVIS; PEREZ, 2009).

A literatura científica apresenta inúmeros trabalhos relacionados ao estudo de extratos, porém, poucas pesquisas envolvem extratos comerciais glicólicos. A avaliação de extratos comerciais utilizados na indústria cosmética é fundamental para assegurar a qualidade, a eficácia e a segurança dos produtos formulados com os mesmos.

Tabela 2 - Dados para a construção da curva analítica do ácido gálico padrão de referência secundário, obtidos por espectrofotometria a 750 nm

Concentração teórica do ácido gálico padrão de referência secundário (µg/mL)									
Absorbâncias	150,0	250,0	350,0	500,0	600,0	750,0	1000,0	R ²	R ² médio
A ₁	0,1327	0,2273	0,3420	0,4530	0,5470	0,7137	0,9113	0,9975	0,9971
A ₂	0,1327	0,2217	0,3427	0,4437	0,5580	0,7093	0,9047	0,9968	
A ₃	0,1357	0,2343	0,3405	0,4520	0,5453	0,7093	0,9118	0,9981	
A ₄	0,1342	0,2308	0,3533	0,4515	0,5462	0,7115	0,9020	0,9960	
A ₅	0,1342	0,2280	0,3522	0,4478	0,5517	0,7093	0,9118	0,9968	
A ₆	0,1340	0,2290	0,3513	0,4497	0,5510	0,7117	0,9028	0,9963	
A _{média}	0,1339	0,2285	0,3470	0,4496	0,5499	0,7108	0,9074		
A _{dp}	0,0011	0,0042	0,0059	0,0034	0,0048	0,0018	0,0047		
Estudo do Intervalo									
Concentração calculada (µg/mL)	142,65	247,81	379,44	493,46	604,85	783,67	1002,13		
Precisão (%)	0,88	1,88	1,72	0,78	0,87	0,25	0,53		
Exatidão (%)	95,10	99,12	108,41	98,69	100,81	104,49	100,21		
Limite de detecção LD	11,26 µg/mL								
Limite de quantificação LQ	37,53 µg/mL								

Legenda: A₁ a A₆: réplicas das absorbâncias (n=6); A_{média}: média das absorbâncias; A_{dp}: desvio padrão das absorbâncias; R²: coeficiente de correlação linear das réplicas das curvas analíticas (n = 6); R² médio: média dos coeficientes de correlação linear (coeficiente de correlação linear da curva analítica média). As concentrações calculadas do ácido gálico foram obtidas por meio da **Equação 4**; a precisão foi calculada dividindo o desvio padrão pela concentração média determinada e multiplicando o resultado por 100; a exatidão foi calculada dividindo a concentração média experimental pela teórica e multiplicando por 100; os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as **Equações 1** e **2**, respectivamente.

Tabela 3 - Dados para o cálculo do teor de polifenóis totais (mgEAG/mL) dos extratos glicólicos

Extratos glicólicos												
	Açaí	Acerola	Castanha da Índia	Chá verde	Erva-mate	Framboesa	Ginco	Menta	Morango	Própolis	Romã	Uva
A1	0,469	0,401	0,384	0,429	0,546	0,145	0,345	0,514	0,323	0,294	0,593	0,273
A2	0,478	0,366	0,393	0,416	0,548	0,155	0,340	0,497	0,328	0,282	0,579	0,271
A3	0,449	0,380	0,384	0,449	0,538	0,145	0,350	0,481	0,317	0,289	0,588	0,274
A _{média}	0,465	0,382	0,387	0,431	0,544	0,148	0,345	0,497	0,323	0,288	0,587	0,273
A _{dp}	0,015	0,017	0,005	0,016	0,005	0,006	0,005	0,016	0,006	0,006	0,007	0,001
Teor de polifenóis totais (mgEAG/mL) e análise estatística												
Diluição	2,5	-----	-----	5	12,5	-----	3,33	5	-----	3,33	25	-----
T1	1,289	0,401	0,421	2,353	7,500	0,155	1,255	2,825	0,353	1,066	16,306	0,298
T2	1,313	0,416	0,431	2,279	7,532	0,166	1,236	2,731	0,358	1,023	15,926	0,295
T3	1,231	0,440	0,421	2,464	7,398	0,154	1,273	2,641	0,347	1,048	16,292	0,299
T _{médio}	1,278	0,419	0,424	2,365	7,477	0,159	1,255	2,732	0,353	1,045	16,174	0,297
T _{dp}	0,043	0,020	0,006	0,093	0,070	0,007	0,018	0,092	0,005	0,021	0,214	0,002
Teste de Tukey	E	G	G	D	B	H	EF	C	GH	F	A	GH

Legenda: A₁ a A₃: absorbâncias em triplicata; A_{média}: média das absorbâncias; A_{dp}: desvio padrão das absorbâncias; T₁ a T₃: teor de polifenóis totais em triplicata (mgEAG/mL); EAG: equivalentes de ácido gálico; T_{médio}: média dos teores de polifenóis totais; T_{dp}: desvio padrão dos teores de polifenóis totais; Teor(%): teor de polifenóis expresso em porcentagem. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos (p< 0,05; n = 3)

Figura 25 - Teor de polifenóis (mgEAG/mL) totais dos extratos glicólicos. EAG: equivalentes de ácido gálico, letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos entre os extratos glicólicos analisados; $p < 0,05$; $n = 3$.

Segundo Rababah e colaboradores, 2010, o solvente e a temperatura utilizados no preparo de extratos podem influenciar o teor de polifenóis totais dos mesmos. A pesquisa realizada por esses autores demonstrou que extratos de romã (*P. granatum*), preparados com metanol em diferentes temperaturas, apresentaram teores de polifenóis variando de 1302,5 a 4952,4 mgEAG/100g. Extratos preparados com etanol apresentaram faixa de variação de 707,5 a 4237,4 mgEAG/100g e extratos preparados com água destilada variaram de 996,5 a 2931,3 mgEAG/100g. De acordo com os resultados expressos na **Tabela 3**, o extrato glicólico comercial de romã (*P. granatum*) apresentou 16,174 mgEAG/mL. Esse resultado encontra-se dentro das faixas de variações do teor de polifenóis totais observadas por Rababah e colaboradores. Surveswaran e colaboradores, 2007, quantificaram o teor de polifenóis totais de extratos metanólicos de romã (*P. granatum*) preparados a partir de sementes e pericarpos obtendo, respectivamente, 5,1 e 192,2 mgEAG/g (RABABAH et al., 2010; SURVESWARAN et al., 2007).

Dudonné e colaboradores, 2009, avaliaram o teor de polifenóis totais em extrato aquoso de erva-mate (*I. paraguariensis*) empregando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os autores obtiveram 202,60 mgEAG/g de extrato, esse valor foi superior ao valor de, aproximadamente, 100 mgEAG/g encontrado por Ranilla e colaboradores, 2010. De acordo com os resultados expressos na **Tabela 3**, o extrato glicólico comercial de erva-mate (*I. paraguariensis*) apresentou 7,477 mgEAG/mL. Esse valor foi inferior aos valores encontrados nas pesquisas de Duddoné e Ranilla (DUDONNÉ et al., 2009; RANILLA et al., 2010).

Estudos envolvendo a *M. piperita* foram realizados por diversos autores. Dorman e colaboradores, 2003, quantificaram os polifenóis totais do extrato aquoso de menta (*M. piperita*) obtendo 230,8 mgEAG/g de extrato. Moraes-de-Souza, 2007, avaliou infusões de *M. piperita* fresca e processada, obtendo 7,37 e 33,85 mgEAG/g, respectivamente. Maldonado e colaboradores, 2005, verificaram a presença de 1,30 mgEAG/ mL de infusão de menta fresca (*M. piperita*) e 55,1 mgEAG/g de material fresco. Verificou-se que o extrato glicólico comercial de menta (*M. piperita*) apresentou, de acordo com a **Tabela 3**, 2,732 mgEAG/mL de extrato. Esse valor aproximou-se dos valores obtidos para infusões de menta fresca (DORMAN et al., 2003; MALDONADO et al., 2005; MORAES-DE-SOUZA, 2007).

O teor de polifenóis totais do extrato glicólico comercial de chá verde (*C. sinensis*) foi 2,365 mgEAG/mL de extrato (**Tabela 3**). Esse valor encontra-se dentro do intervalo de valores obtidos no estudo de diferentes extratos de chá verde realizado por Unachukwu e colaboradores, 2010. Os autores utilizaram a metodologia de Folin-Ciocalteu para quantificar os polifenóis totais de extratos aquosos e metanólicos preparados a partir de amostras

comerciais de chá verde (*C. sinensis*) provenientes de diferentes empresas. Os extratos avaliados apresentaram variações na faixa de 1,17 a 18,59 mgEAG/g de chá seco. Rusak e colaboradores, 2008, avaliaram extratos de chá verde (*C. sinensis*) preparados com diferentes solventes (água destilada com suco de limão, água destilada pura e álcool etílico) e com tempos de extração distintos. Os valores de polifenóis totais obtidos pelos autores variaram de 0,76 a 2,38 mgEAG/mL. Khokhar e Magnusdottir, 2002, encontraram valores de teor de polifenóis superiores aos obtidos nas pesquisas de Unachukwu e Rusak. Os autores avaliaram extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de chá verde (*C. sinensis*) obtendo variação de 65,8 a 106,2 mgEAG/g de chá verde (KHOKHAR; MAGNUSDOTTIR, 2002; RUSAK et al., 2008; UNACHUKWU et al., 2010).

Kuskoski e colaboradores, 2006, determinaram o teor de polifenóis totais, por meio da metodologia de Folin-Ciocalteu, em polpa de açaí (*E. oleracea*) comercializada obtendo 1,37 mgEAG/g. Teor semelhante foi encontrado no extrato glicólico comercial de açaí (*E. oleracea*), que apresentou 1,278 mgEAG/mL (**Tabela 3**). Pompeu e colaboradores, 2009, prepararam diferentes extratos de *E. oleracea* utilizando temperaturas distintas e proporções variadas de etanol. Os autores observaram que os teores de polifenóis totais dos extratos variaram na faixa de 0,86 a 4,71 mgEAG/g (KUSKOSKI et al., 2006; POMPEU et al., 2009).

O teor de polifenóis totais do extrato glicólico comercial de ginkgo (*G. biloba*) foi 1,255 mgEAG/mL de extrato (**Tabela 3**). Esse valor aproximou-se do valor encontrado por Zheng e Wang, 2001. Esses autores quantificaram o teor de polifenóis totais de folhas frescas de ginkgo (*G. biloba*) submetidas à extração com tampão fosfato obtendo 1,57 mgEAG/g de ginkgo. Maltas e colaboradores, 2011, prepararam diferentes extratos de folhas secas de ginkgo (*G. biloba*) usando metanol, acetona e n-hexano como solventes. Os autores obtiveram valores superiores ao encontrado por Zheng e Wang. O extrato metanólico apresentou 76,0 mgEAG/g e os extratos preparados com acetona e n-hexano apresentaram, respectivamente, 59,4 e 27,6 mgEAG/g (MALTAS et al., 2011; ZHENG; WANG, 2001).

A própolis pode apresentar variações em sua composição química, de acordo com sua origem geográfica. Assim, diversas pesquisas investigam a composição química e a ação terapêutica da mesma em função do seu local de origem. Chaillou e Nazareno, 2009, determinaram o teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis procedentes de diferentes locais da província de Santiago del Estero, no norte da Argentina. Os extratos apresentaram teor de polifenóis no intervalo de 92 a 187 mgEAG/g. Extrato etanólico e aquoso de própolis oriundos da Índia foram estudados por Laskar e colaboradores, 2010. Os

autores observaram que os extratos aquoso e etanólico apresentaram teores de polifenóis totais iguais a 269,10 e 159,10 mgEAG/g, respectivamente. Os teores de polifenóis obtidos nas pesquisas de Cahillou e Laskar foram superiores ao teor de 1,045 mgEAG/mL encontrado no extrato comercial glicólico de própolis (**Tabela 3**) (CHAILLOU; NAZARENO, 2009; LASKAR et al., 2010).

Oliveira, 2007, determinou o teor de polifenóis totais de extratos comerciais padronizados de própolis, provenientes de uma empresa brasileira, obtendo o valor de 13,3 mgEAG/g para extratos alcoólico e glicólico. Esse valor de 1,3% está de acordo com os valores obtidos por Silva e colaboradores, 2006. Os autores avaliaram extratos comerciais etanólicos de própolis originários de diversos estados brasileiros verificando que os mesmos apresentaram teor de polifenóis totais no intervalo de 0,4 a 3,9% (OLIVEIRA, 2007; SILVA et al., 2006).

O teor de polifenóis totais do extrato glicólico comercial de acerola (*M. glabra*) foi 0,419 mgEAG/mL de extrato (**Tabela 3**). Esse valor foi inferior ao encontrado por Kuskoski e colaboradores, 2006, e por Prado, 2009. Os primeiros autores determinaram o teor de polifenóis totais em polpas comerciais congeladas de acerola (*M. glabra*) obtendo 5,8 mgEAG/g. Prado, 2009, avaliou o teor de polifenóis totais do extrato hidroalcoólico de polpa de acerola (*M. glabra*) obtendo 15,8 mgEAG/mL de extrato. O teor de polifenóis totais do extrato glicólico comercial de castanha da Índia (*A. hippocastanum*) foi 0,424 mgEAG/mL (**Tabela 3**). Esse valor foi inferior aos valores determinados por Muetzel e Becker, 2006. Esses autores prepararam extratos de castanha da Índia (*A. hippocastanum*) com acetona e água destilada obtendo teores de polifenóis totais entre, aproximadamente, 75 a 90 mgEAT/mL (KUSKOSKI et al., 2006; MUETZEL; BECKER, 2006; PRADO, 2009).

Os valores obtidos de polifenóis totais dos extratos glicólicos comerciais de uva (*V. vinifera*) e morango (*F. vesca*) foram, respectivamente, 0,297 e 0,353 mgEAG/mL (**Tabela 3**). Esses teores foram inferiores aos valores determinados na pesquisa de Kuskoski e colaboradores, 2006. A quantificação de polifenóis totais em polpas comerciais de uva (*V. vinifera*) e morango (*F. vesca*) revelou a presença de, respectivamente, 1,17 e 1,32 mgEAG/g de polpa. Milivojevic e colaboradores, 2011, quantificaram os polifenóis totais do extrato de morango (*F. vesca*) preparado com metanol, água destilada e ácido hidrolórico obtendo 4,69 mgEAG/g. O teor de polifenóis totais do extrato comercial glicólico de uva (*V. vinifera*) aproximou-se dos valores obtidos por Vargas e colaboradores, 2008, em amostras comerciais de suco de uva. Os autores avaliaram sucos de uva oriundos de diferentes empresas obtendo teores na faixa de 0,31 a 0,51 mgEAG/mL. Casazza e colaboradores, 2010, encontraram

valores superiores em extratos metanólicos e etanólicos obtidos da semente e pele de uva (*V. vinifera*). Os teores dos extratos analisados variaram no intervalo de 7,33 a 67,88 mgEAG/g (CASAZZA et al., 2010; KUSKOSKI et al., 2006; MILIVOJEVIC et al., 2011; VARGAS et al., 2008).

Kähkönen e colaboradores, 1999, avaliaram o teor de polifenóis totais do extrato de framboesa (*R. idaeus*) preparado com acetona e água destilada obtendo o valor de 23,9 mgEAG/g. Valor inferior foi determinado por Milivojevic e colaboradores, 2011, em extrato de framboesa (*R. idaeus*) preparado com metanol, água destilada e ácido hidrolórico. Os autores obtiveram, aproximadamente, 1,20 mgEAG/g. De acordo com a **Tabela 3**, verificou-se que o valor do teor de polifenóis totais do extrato comercial glicólico de framboesa (*R. idaeus*) foi 0,159 mgEAG/mL. Esse teor foi inferior ao encontrado nas duas pesquisas citadas anteriormente (KÄHKÖNEN et al.; 1999; MILIVOJEVIC et al., 2011).

Verificou-se que os extratos comerciais glicólicos de romã (*P. granatum*) e açaí (*E. oleracea*) apresentaram teores de polifenóis totais dentro de intervalos descritos na literatura. Os extratos glicólicos de menta (*M. piperita*), chá verde (*C. sinensis*), ginkgo (*G. biloba*) e uva (*V. vinifera*) apresentaram teores de polifenóis totais inferiores aos teores descritos por determinados autores. Entretanto, esses mesmos teores se aproximavam de resultados obtidos por outros autores. Os extratos de erva-mate (*I. paraguariensis*), própolis, acerola (*M. glabra*), morango (*F. vesca*), castanha da Índia (*A. hippocastanum*) e framboesa (*R. idaeus*) apresentaram teores de polifenóis totais inferiores aos encontrados na literatura.

Diversos fatores estão relacionados com a variabilidade do teor de metabólitos secundários das plantas. A época de colheita das mesmas pode determinar a quantidade e a natureza de seus constituintes ativos, uma vez que variações sazonais no conteúdo das classes de metabólitos secundários são comuns. O ritmo circadiano também pode interferir no teor de metabólitos secundários. Pesquisas demonstraram que a composição desses metabólitos pode variar consideravelmente durante o ciclo dia/noite. Algumas plantas atingem o máximo de concentração de determinado metabólito na parte da manhã, enquanto outras o atingem na parte da tarde. A idade e o desenvolvimento da planta, a temperatura, a disponibilidade hídrica e de nutrientes, a radiação ultravioleta e a poluição atmosférica também são fatores que podem influenciar a quantidade total de metabólitos produzidos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Esses fatores podem ter contribuído com o baixo teor de polifenóis totais encontrado na maioria dos extratos comerciais glicólicos avaliados. Outros fatores relacionados com o preparo dos extratos também podem ter contribuído com esse baixo teor de polifenóis. Sabe-

se que o tipo e o volume de solventes usados, o pH, a temperatura, o número de etapas da extração e o tamanho das partículas das amostras podem influenciar a eficiência do processo de extração (PRADO, 2009).

5.3 Teor de flavonoides totais

O cálculo do teor de flavonoides totais das amostras dos extratos comerciais glicólicos foi realizado com o auxílio da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário (pureza de 97%). A curva analítica (**Figura 26**) foi construída de acordo com os valores de absorbância das diferentes concentrações de quercetina, expostos na **Tabela 4** que, também, apresenta o estudo do intervalo da curva analítica.

Figura 26 – Curva analítica do flavonoide quercetina padrão de referência secundário (n=6)

O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados gerou a equação da reta descrita na **Equação 5**, com valores de **intersecção com o eixo y** e **coeficiente angular** (inclinação da reta) iguais a 0,0061 e 0,0297, respectivamente, e **coeficiente de correlação linear** (R^2) médio igual a 0,9991.

$$y = 0,0297 x - 0,0061$$

Equação 5 - Equação da reta da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde x é a concentração de quercetina padrão de referência secundário ($\mu\text{g/mL}$) e y é a absorbância

A partir da equação da reta obtida foi possível calcular o teor de flavonoides totais dos extratos glicólicos, conforme exposto na **Tabela 5**. Esse teor foi calculado por meio da

Equação 5, sendo obtido a partir da substituição de y pelo valor da absorbância obtida nos ensaios de quantificação de flavonoides e expresso em EQ (equivalentes de quercetina) mg/mL. O programa STATISTICA Release 7.0 foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os teores de flavonoides totais dos extratos glicólicos. Utilizou-se análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do Teste de Tukey ($n = 3$; $p < 0,05$). O resultado obtido está expresso na **Tabela 5**. A **Figura 27** ilustra, comparativamente, os teores de flavonoides dos extratos glicólicos.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 5** e a **Figura 27**, que o extrato glicólico de romã (*P. granatum*) apresentou o maior teor de flavonoides totais dentre os extratos avaliados (0,492 mgEQ/mL). Os extratos de erva-mate (*I. paraguariensis*), menta (*M. piperita*), própolis, ginko (*G. biloba*), castanha da Índia (*A. hippocastanum*) e chá verde (*C. sinensis*) apresentaram, nesta ordem, os seguintes valores decrescentes de flavonoides totais: 0,246; 0,208; 0,188; 0,113; 0,097 e 0,089 mgEQ/mL. Os extratos de açaí (*E. oleracea*) e acerola (*M. glabra*) apresentaram, respectivamente, 0,056 e 0,017 mgEQ/mL. Os extratos glicólicos de castanha da Índia (*A. hippocastanum*) e chá verde (*C. sinensis*) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, assim como os extratos de uva (*V. vinifera*) e morango (*F. vesca*) que apresentaram, respectivamente, 0,012 e 0,007 mgEQ/mL. O extrato de framboesa (*R. idaeus*) foi o que apresentou menor teor de flavonoides totais (0,004 mgEQ/mL) no grupo de extratos analisados.

Considerando as diferenças estatisticamente significativas, puderam-se ordenar os extratos glicólicos na seguinte ordem decrescente de teor de flavonoides totais: romã; erva-mate; menta; própolis; ginko; castanha da Índia e chá verde; açaí; acerola; uva e morango; e framboesa.

A análise comparativa dos teores de flavonoides totais dos extratos glicólicos comerciais com os resultados da literatura foi realizada, preferencialmente, com trabalhos científicos que envolviam a determinação de flavonoides totais por meio da metodologia de complexação com cloreto de alumínio. Entretanto, o teor de flavonoides totais do extrato glicólico de castanha da Índia (*A. hippocastanum*) foi comparado com o teor obtido em metodologia envolvendo cromatografia líquida de ultra eficiência, devido à escassez de trabalhos envolvendo esse extrato e o método de complexação com cloreto de alumínio. Observou-se, também, a ausência dessa metodologia em pesquisas envolvendo extratos de açaí (*E. oleracea*) e acerola (*M. glabra*). Assim, o teor de flavonoides totais desses extratos foi comparado com teores de antocianinas totais (compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides).

Tabela 4 - Dados para a construção da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário, obtidos por espectrofotometria a 425 nm

Concentração teórica da quercetina padrão de referência secundário (µg/mL)						
Absorbâncias	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0
A ₁	0,1557	0,2987	0,4523	0,5933	0,7427	0,9060
A ₂	0,1537	0,3080	0,4517	0,5840	0,7553	0,9160
A ₃	0,1547	0,3033	0,4520	0,5887	0,7490	0,9110
A ₄	0,1447	0,2970	0,4372	0,5687	0,7583	0,8923
A ₅	0,1557	0,3070	0,4613	0,6147	0,7687	0,9230
A ₆	0,1397	0,2867	0,4160	0,5623	0,7868	0,9040
A _{média}	0,1507	0,3001	0,4451	0,5853	0,7601	0,9087
A _{dp}	0,0068	0,0079	0,0162	0,0187	0,0158	0,0106
Estudo do Intervalo						
Concentração calculada (µg/mL)	5,27	10,31	15,19	19,91	25,79	30,80
Precisão (%)	4,35	2,58	3,60	3,16	2,06	1,16
Exatidão (%)	105,57	103,10	101,28	99,56	103,20	102,67
Limite de detecção LD	0,45 µg/mL					
Limite de quantificação LQ	1,50 µg/mL					

Legenda: A₁ a A₆: réplicas das absorbâncias (n=6); A_{média}: média das absorbâncias; A_{dp}: desvio padrão das absorbâncias; R²: coeficiente de correlação linear das réplicas das curvas analíticas (n = 6); R²_{médio}: média dos coeficientes de correlação linear (coeficiente de correlação linear da curva analítica média). As concentrações calculadas da quercetina foram obtidas por meio da **Equação 5**; a precisão foi calculada dividindo o desvio padrão pela concentração média determinada e multiplicando o resultado por 100; a exatidão foi calculada dividindo a concentração média experimental pela teórica e multiplicando por 100; os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as **Equações 1 e 2**, respectivamente.

Tabela 5 - Dados para o cálculo do teor de flavonoides totais (mgEQ/mL) dos extratos glicólicos

Extratos glicólicos												
	Açaí	Acerola	Castanha da Índia	Chá verde	Erva-mate	Framboesa	Ginco	Menta	Morango	Própolis	Romã	Uva
A1	0,328	0,481	0,575	0,550	0,880	0,117	0,628	0,740	0,212	0,645	0,575	0,367
A2	0,343	0,496	0,56	0,54	0,889	0,113	0,695	0,733	0,208	0,678	0,58	0,349
A3	0,304	0,499	0,58	0,484	0,851	0,119	0,667	0,742	0,191	0,679	0,581	0,348
A _{média}	0,325	0,492	0,572	0,525	0,873	0,116	0,663	0,738	0,204	0,667	0,579	0,355
A _{dp}	0,019	0,001	0,001	0,036	0,020	0,003	0,033	0,005	0,011	0,019	0,003	0,011
Teor de flavonoides totais (mgEQ/mL) e análise estatística												
Diluição	5	-----	5	5	8,3	-----	5	8,3	-----	8,3	25	-----
T1	0,056	0,016	0,098	0,094	0,248	0,004	0,107	0,209	0,007	0,182	0,489	0,013
T2	0,059	0,017	0,095	0,092	0,250	0,004	0,118	0,207	0,007	0,191	0,493	0,012
T3	0,052	0,017	0,099	0,083	0,240	0,004	0,113	0,209	0,007	0,191	0,494	0,012
T _{médio}	0,056	0,017	0,097	0,089	0,246	0,004	0,113	0,208	0,007	0,188	0,492	0,012
T _{dp}	0,003	0,000	0,002	0,006	0,006	0,000	0,006	0,001	0,000	0,005	0,003	0,000
Teste de Tukey	G	H	F	F	B	I	E	C	HI	D	A	HI
Teor(%)	0,006	0,002	0,010	0,009	0,025	0,0004	0,011	0,021	0,001	0,019	0,049	0,001

Legenda: A₁ a A₃: absorbâncias em triplicata; A_{média}: média das absorbâncias; A_{dp}: desvio padrão das absorbâncias; T₁ a T₃: teor de flavonoides totais em triplicata (mgEQ/mL); EQ: equivalentes de quercetina; T_{médio}: média dos teores de flavonoides totais; T_{dp}: desvio padrão dos teores de flavonoides totais; Teor(%): teor de flavonoide expresso em porcentagem. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos entre os extratos (p<0,05; n = 3)

Figura 27 - Teor de flavonoides (mgEQ/mL) totais dos extratos glicólicos. EG: equivalentes de quercetina, letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos entre os extratos glicólicos analisados; $p < 0,05$; $n = 3$.

Estudos envolvendo a determinação de flavonoides totais por complexação com cloreto de alumínio, utilizando rutina como padrão, foram realizados em extratos metanólicos de romã (*P. granatum*) e menta (*M. piperita*). O extrato de romã (*P. granatum*) apresentou teor de flavonoides totais de 54,3 mgER/g de extrato e o extrato de menta (*M. piperita*) apresentou 4,18 mgER/g de extrato. De acordo com a **Tabela 5**, esses valores foram superiores aos encontrados nos extratos comerciais glicólicos de romã (*P. granatum*) e menta (*M. piperita*) que apresentaram valores expressos em equivalentes de quercetina de 0,492 e 0,208 mgEQ/mL, respectivamente (MOUSSA, 2011; SAMARTH; SAMARTH, 2009).

Extratos metanólicos de erva-mate (*I. paraguariensis*) e de cascas de uva (*V. vinifera*) tiveram seus teores de flavonoides totais determinados por metodologia espectrofotométrica envolvendo cloreto de alumínio e outros reagentes. A análise do extrato de erva-mate (*I. paraguariensis*) foi realizada com padrão catequina. Os autores da pesquisa obtiveram teor de 165 mgEC/g de extrato. Esse valor foi superior ao teor de 0,246 mgEQ/mL, indicado na **Tabela 5**, do extrato comercial glicólico de erva-mate (*I. paraguariensis*). O extrato de uva (*V. vinifera*) apresentou teor de 8,81 mgEQ/g. Esse valor foi superior ao teor de 0,012 mgEQ/mL determinado no extrato comercial glicólico de uva (*V. vinifera*) (**Tabela 5**). A mesma metodologia foi usada na determinação dos teores de flavonoides totais de extratos de framboesa (*R. idaeus*) preparados com acetona, ácido acético e água, em diferentes condições de tempo e temperatura. Os teores variaram no intervalo de 31,31 a 48,19 mgEC/100g sendo maiores que o teor de 0,004 mgEQ/mL obtido no extrato comercial glicólico de framboesa (*R. idaeus*) (MOLINA-QUIJADA et al., 2010; PILJAC-ZEGARAC; SAMEC, 2011; TSAI et al.; 2008).

Laskar e colaboradores, 2010, determinaram os teores de flavonoides totais de extratos aquoso e etanólico de própolis, provenientes da Índia, obtendo, respectivamente, 25,5 e 57,25 mgEQ/g. Estudo realizado com própolis oriunda de São Paulo demonstrou teor de flavonoides totais de 26,41 mgEQ/g de própolis bruta. Oliveira, 2007, determinou o teor de flavonoides totais de extratos comerciais padronizados de própolis obtendo valores de 4,7 e 4,6 mgEQ/g para extratos aquoso e glicólico, respectivamente. De acordo com a **Tabela 5**, o extrato glicólico comercial de própolis não-padronizado apresentou teor de flavonoides totais de 0,188 mgEQ/mL, esse valor foi inferior aos descritos na literatura (FUNARI; FERRO, 2006; LASKAR et al., 2010, OLIVEIRA, 2007).

Chen e colaboradores, 2011, utilizaram o método de complexação com cloreto de alumínio para avaliar o teor de flavonoides totais, extraídos com ou sem o auxílio de diferentes enzimas, de folhas de *G. biloba*. Os autores encontraram teores de flavonoides

totais no intervalo de 14,0 a 28,3 mgEQ/g. Esses valores foram superiores ao valor de 0,113 mgEQ/mL encontrado no extrato comercial glicólico de ginkgo (*G. biloba*) (**Tabela 5**) (CHEN et al., 2011).

Pereira e colaboradores, 2009, quantificaram o teor de flavonoides totais de amostras comerciais de chá verde (*C. sinensis*). As amostras foram preparadas adicionando 100 mL de água destilada a 1 g do material comercial. Os autores verificaram que os teores de flavonoides totais das amostras comerciais variaram na faixa de 0,61 a 1,10 mgEQ/g de amostra. Esse valor foi superior ao valor de 0,089 mgEQ/mL encontrado no extrato comercial glicólico de chá verde (*C. sinensis*) (**Tabela 5**) (PEREIRA et al., 2009).

Kapusta e colaboradores, 2007, determinaram a concentração total de flavonoides em sementes de castanha da Índia (*A. hippocastanum*) utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência. Os autores obtiveram valor superior (0,88% em matéria seca) ao encontrado no extrato comercial glicólico de castanha da Índia (*A. hippocastanum*) (0,097 mgEQ/mL – **Tabela 5**) (KAPUSTA et al., 2007).

O teor de flavonoides totais de extrato metanólico de frutos de *F. vesca* foi determinado por Cheel e colaboradores, 2007. Os autores encontraram, aproximadamente, 100 mgEQ/100g de fruto fresco, esse valor foi superior ao valor de 0,007 mgEQ/mL determinado no extrato glicólico comercial de morango (*F. vesca*) (**Tabela 5**) (CHEEL et al., 2007).

Kuskoski e colaboradores, 2006, avaliaram o teor de antocianinas totais de polpas comercializadas de açaí (*E. oleracea*) e acerola (*M. glabra*) obtendo, respectivamente, 22,8 mg/100g e 16,0 mg/100g. Esses valores foram superiores aos teores de flavonoides totais obtidos nos extratos comerciais glicólicos de açaí (*E. oleracea*) e acerola (*M. glabra*) (0,056 e 0,017 mgEQ/mL, respectivamente) (KUSKOSKI et al., 2006).

Observou-se que os teores de flavonoides totais dos extratos comerciais glicólicos foram inferiores aos teores descritos na literatura. Os resultados expostos no item 5.2 indicaram que a maioria dos extratos analisados possuía teores de polifenóis totais inferiores aos descritos na literatura. A partir desses resultados, esperava-se que os teores de flavonoides totais dos extratos fossem inferiores aos da literatura.

O método empregado na determinação do teor de flavonoides totais foi baseado na formação de complexos estáveis entre os flavonoides em metanol e o cátion alumínio. O complexo flavonoide-Al promoveu um desvio batocrômico (para maiores comprimentos de onda) e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica. Esse fato evitou a

interferência de outras substâncias fenólicas na determinação da quantidade de flavonoides totais (BURIOL et al.; 2009; LIANDA, 2009).

Diversos pesquisadores demonstraram que esse método produz valores de flavonoides totais inferiores aos reais indicando que o mesmo pode ser pouco exato. As diferentes classes de flavonoides apresentam variações de absorção na região do comprimento de onda utilizado na análise (425 nm). Esse comprimento de onda corresponde à absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, os complexos de outros flavonóis com alumínio também absorvem na região de 425 nm, entretanto, complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores. Assim, o valor determinado no ensaio e o valor real são mais próximos entre si quando a proporção de flavonóis na amostra é maior (BURIOL et al.; 2009; LIANDA, 2009).

Os fatores descritos no item 5.2 como época de colheita, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da plantas e método de preparo dos extratos glicólicos associados à possível subestimativa nas determinações de amostras com grande quantidade de flavonas podem ter contribuído com o baixo teor de flavonoides totais determinado nas amostras comerciais dos extratos glicólicos.

5.4 Atividade antioxidante pela ação sequestradora do radical DPPH

O cálculo da atividade antioxidante das amostras dos extratos glicólicos foi realizado com o auxílio da curva analítica de Trolox[®] padrão antioxidante (teor de pureza 97%). A curva analítica (**Figura 28**) foi construída de acordo com os valores de porcentagem de inibição do radical DPPH de cada concentração do Trolox[®], expostos na **Tabela 6**.

Figura 28 – Curva analítica do Trolox[®] padrão de referência secundário (n=6)

O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados gerou a equação da reta descrita na **Equação 6**, com valores de **intersecção com o eixo y** e **coeficiente angular** (inclinação da reta) iguais a 0,3842 e 0,2699, respectivamente, e **coeficiente de correlação linear** (R^2) médio igual a 0,9975.

$$y = 0,2699 x - 0,3842$$

Equação 6 - Equação da reta da curva analítica do Trolox[®] padrão de referência secundário obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde x é a concentração de Trolox[®] padrão de referência secundário (μM) e y é a porcentagem de inibição do radical DPPH.

A partir da equação da reta obtida foi possível calcular a atividade antioxidante dos extratos glicólicos, expressa em μmol de Trolox[®] equivalente/ mL ($\mu\text{molTE/mL}$), conforme exposto na **Tabela 7**. Esse teor foi calculado por meio da **Equação 6**, sendo obtido a partir da substituição de y pelo valor da inibição do radical DPPH, calculado com o auxílio da **Equação 3**. O programa STATISTICA Release 7.0 foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre as atividades antioxidantes dos extratos glicólicos. Utilizou-se análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do Teste de Tukey ($n = 3$; $p < 0,05$). O resultado obtido está expresso na **Tabela 7**. A **Figura 29** ilustra, comparativamente, as atividades antioxidantes dos extratos glicólicos.

De acordo com os resultados obtidos na **Tabela 7** e na **Figura 29**, verificou-se que o extrato de romã (*P. granatum*) apresentou a maior atividade antioxidante, em Trolox[®] equivalente, seguido do extrato de erva-mate (*I. paraguariensis*) e, posteriormente, do extrato de menta (*M. piperita*), e própolis. O extrato de chá verde (*C. sinensis*) apresentou atividade antioxidante estatisticamente igual à do extrato de menta (*M. piperita*). Os demais extratos, exceto o de açaí (*E. oleracea*), não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre si e apresentaram atividade antioxidante inferior aos extratos citados anteriormente. O extrato de açaí (*E. oleracea*) apresentou a menor atividade antioxidante dentre todos os extratos analisados.

Tabela 6 - Dados para a construção da curva analítica do Trolox[®] padrão de referência secundário, obtidos por espectrofotometria a 517 nm

Concentração teórica de Trolox [®] padrão de referência secundário (µM)						
Absorbâncias	100,0	140,0	180,0	220,0	300,0	344,0 Controle
A ₁	0,735	0,625	0,545	0,430	0,206	0,090 1,00
A ₂	0,729	0,618	0,532	0,398	0,177	0,089 1,00
A ₃	0,726	0,618	0,543	0,366	0,188	0,086 1,00
A ₄	0,653	0,541	0,448	0,330	0,112	0,080 0,895
A ₅	0,651	0,529	0,429	0,306	0,115	0,064 0,895
A ₆	0,644	0,539	0,418	0,382	0,098	0,064 0,895
Porcentagem de inibição do radical DPPH						
	R ²					R ² médio
PI ₁	26,64	37,59	45,60	57,05	79,41	91,02 0,9981
PI ₂	27,24	38,25	46,90	60,24	82,33	91,05 0,9981
PI ₃	27,51	38,25	45,77	63,47	81,20	91,45 0,9922
PI ₄	27,04	39,55	49,94	63,09	87,45	91,17 0,9907
PI ₅	27,23	40,82	52,07	65,77	87,19	92,81 0,9909
PI ₆	28,04	39,70	53,22	57,28	89,05	92,84 0,9830
PI _{médio}	27,27	39,05	48,91	61,16	84,43	91,73
PI _{DP}	0,44	1,08	3,00	3,24	3,62	0,77

Legenda: A₁ a A₆: réplicas das absorbâncias (n=6); PI = porcentagem de inibição do radical DPPH calculada pela **Equação 3**; PI_{médio}: média das porcentagens de inibição; PI_{DP}: desvio padrão das porcentagens de inibição. R²: coeficiente de correlação linear; R²_{médio}: média dos coeficientes de correlação linear.

Tabela 7 - Dados para o cálculo da atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente ($\mu\text{molTE/mL}$) dos extratos glicólicos

Extratos glicólicos												
	Açaí	Acerola	Castanha da Índia	Chá verde	Erva-mate	Framboesa	Ginco	Menta	Morango	Própolis	Romã	Uva
PI ₁	45,9	44,9	37,4	71,4	51,0	63,1	40,1	57,8	78,8	53,5	53,5	67,1
PI ₂	50,7	43,7	33,9	67,7	46,1	69,2	35,8	53,2	77,3	48,3	50,8	70,3
PI ₃	52,5	43,2	36,6	66,5	47,9	60,7	35,4	54,2	75,9	52,6	52,6	68,1
PI _{média}	49,8	43,9	35,9	68,5	48,3	64,3	37,1	55,1	77,4	51,5	52,3	68,5
PI _{DP}	3,40	0,87	1,82	2,58	2,52	4,34	2,61	2,46	1,48	2,76	1,37	1,64
Atividade antioxidante em Trolox equivalente (μmolTE/mL) e análise estatística												
Diluição	2,5	7	7	50	200	3	15	50	5	18	500	3
AA ₁	0,422	1,155	0,960	13,162	37,544	0,697	2,208	10,647	1,454	3,543	98,421	0,742
AA ₂	0,467	1,125	0,870	12,464	33,845	0,765	1,971	9,780	1,427	3,197	93,423	0,777
AA ₃	0,483	1,110	0,940	12,246	35,241	0,671	1,946	9,963	1,399	3,480	96,675	0,753
AA _{médio}	0,458	1,130	0,924	12,624	35,543	0,711	2,042	10,130	1,426	3,407	96,173	0,757
AA _{DP}	0,032	0,023	0,047	0,479	1,868	0,048	0,145	0,457	0,027	0,184	2,537	0,018
Teste de Tukey	E	DE	DE	C	B	DE	DE	C	DE	D	A	DE

Legenda: PI₁ a PI₃: réplicas das porcentagens de inibição do DPPH (n=3); AA_{média}: média das atividades antioxidantes; AA_{dp}: desvio padrão das atividades antioxidantes. AA₁ a AA₃: réplicas das atividades antioxidantes ($\mu\text{molTE/mL}$) (n=3); PI_{médio}: média das porcentagens de inibição; PI_{DP}: desvio padrão das porcentagens de inibição TE: Trolox[®] equivalente. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos (p< 0,05; n = 3).

Figura 29 – Atividade antioxidante (μmolTE/mL) dos extratos glicólicos por DPPH. TE: Trolox[®] equivalente, letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos entre os extratos; $p < 0,05$; $n = 3$.

Surveswaran e colaboradores, 2007, determinaram a atividade antioxidante, usando o radical DPPH, de extratos metanólicos de romã (*P. granatum*) preparados a partir de sementes e pericarpos obtendo, respectivamente, 2,90 e 394,66 mmolTE/100g de material seco. Observou-se, de acordo com a **Tabela 7**, que a atividade antioxidante do extrato comercial glicólico de romã (*P. granatum*) (96,173 μ molTE/mL) foi superior à atividade antioxidante do extrato obtido de sementes, porém inferior à atividade antioxidante do extrato obtido de pericarpos (SURVESWARAN et al., 2007).

Dados da literatura demonstraram que a atividade antioxidante, determinada por meio da metodologia do DPPH, de polpas comerciais de uva (*V. vinifera*), açaí (*E. oleracea*), morango (*F. vesca*) e acerola (*M. glabra*) foi, respectivamente, 7,0; 6,9; 9,2; 53,2 μ molTE/g de matéria fresca. De acordo com a **Tabela 7**, esses valores foram superiores aos encontrados nos extratos comerciais glicólicos de uva (*V. vinifera*), açaí (*E. oleracea*), morango (*F. vesca*) e acerola (*M. glabra*) (0,757; 0,458; 1,426; 1,130 μ molTE/mL, respectivamente). Piljac-Zegarac e Samec, 2011, determinaram a atividade antioxidante por DPPH de extratos de framboesa (*R. idaeus*) preparados com acetona, ácido acético e água, em diferentes condições de tempo e temperatura, obtendo valores no intervalo de 1,2 a 1,7 mmolTE/100g. Esses valores foram superiores ao teor de 0,711 μ molTE/mL encontrado no extrato comercial glicólico de framboesa (*R. idaeus*) (**Tabela 7**) (KUSKOSKI et al., 2006; PILJAC-ZEGARAC; SAMEC, 2011).

Macedo e colaboradores, 2011, avaliaram a atividade antioxidante de extratos secos de chá verde (*C. sinensis*) e erva mate (*I. paraguariensis*) pela metodologia envolvendo o radical DPPH e obtiveram, respectivamente, 2682 e 2879 μ molTE/g de extrato seco. Esses resultados foram superiores aos valores de 12,624 e 35,543 μ molTE/mL obtidos, respectivamente, nos extratos comerciais glicólicos de chá verde (*C. sinensis*) e erva-mate (*I. paraguariensis*) (MACEDO et al., 2011).

Estudo envolvendo extratos alcoólicos de própolis oriundos da Grécia e do Chipre revelou que os mesmos possuíam atividade antioxidante variando de 0,33 a 1,11 mmolTE/g de extrato. De acordo com a **Tabela 7**, o valor de 3,407 μ molTE/mL encontrado no extrato comercial glicólico de própolis foi inferior aos valores determinados no estudo citado. Extrato hidroalcoólico de folhas ginkgo (*G. biloba*) e extratos metanólicos de menta (*M. piperita*), cultivada em diferentes condições, tiveram suas atividades antioxidantes determinadas pela metodologia envolvendo o radical livre ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). O primeiro extrato apresentou 225,5 mmolTE/100g de material seco e os extratos metanólicos de menta apresentaram valores no intervalo de 51,3 a 570 μ molTE/g. Esses

valores foram superiores aos determinados nos extratos glicólicos comerciais de *G. biloba* (2,042 $\mu\text{molTE/mL}$) e *M. piperita* (10,130 $\mu\text{molTE/mL}$) (GÖKTAS et al., 2008; KALOGEROPOULOS et al., 2009; YI; WETZSTEIN, 2010).

Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante devido às suas propriedades redutoras e estrutura química. Essas duas características exercem papel fundamental na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. Observou-se que os quatro extratos glicólicos com maior teor de polifenóis totais (romã, erva-mate, menta e chá verde) exibiram as maiores atividades antioxidantes do grupo de extratos analisados. (SOUSA et al., 2007).

5.5 Atividade antioxidante por ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

O cálculo da atividade antioxidante das amostras dos extratos glicólicos foi realizado com o auxílio da curva analítica de Trolox[®] padrão antioxidante (teor de pureza 97%). A curva analítica (**Figura 30**) foi construída de acordo com os valores de áreas sob a curva de decréscimo (AUC) da perda de fluorescência da fluoresceína das diferentes concentrações de Trolox[®].

Figura 30 – Curva analítica do Trolox[®] padrão de referência secundário 97% (n=6)

O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados gerou a equação da reta descrita na **Equação 7**, com valores de **intersecção com o eixo y** e **coeficiente angular** (inclinação da reta) de 4106262,29 e 273475,58, respectivamente, e **coeficiente de correlação linear** (R^2) médio igual a 0,9800.

$$y = 273475,58 x - 4106262,29$$

Equação 7 - Equação da reta da curva analítica do Trolox[®] padrão de referência secundário obtida pelo método dos mínimos quadrados. Onde x é a concentração de Trolox[®] padrão de referência secundário (μM) e y é a área sob a curva de decréscimo (AUC) da perda de fluorescência da fluoresceína

A partir da equação da reta obtida foi possível calcular a atividade antioxidante dos extratos glicólicos, expressa em μmol de Trolox[®] equivalente/ mL ($\mu\text{molTE/mL}$), conforme exposto na **Tabela 8**. Esse teor foi calculado por meio da **Equação 7**, sendo obtido a partir da substituição de y pelo valor da área sob a curva de decréscimo (AUC) da perda de fluorescência da fluoresceína. O programa STATISTICA Release 7.0 foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre as atividades antioxidantes dos extratos glicólicos. Utilizou-se análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do Teste de Tukey ($n = 3$; $p < 0,05$). O resultado obtido está expresso na **Tabela 8**. A **Figura 31** ilustra, comparativamente, as atividades antioxidantes dos extratos glicólicos.

Tabela 8 – Atividades antioxidantes determinadas por ORAC dos extratos glicólicos tratadas estatisticamente

Extrato glicólico	Atividade antioxidante ($\mu\text{molTE/mL}$)	Teste de Tukey
Açaí	$6,249 \pm 0,669$	EFG
Acerola	$3,416 \pm 0,231$	FG
Castanha da Índia	$13,646 \pm 2,669$	EF
Chá verde	$24,723 \pm 0,587$	CD
Erva-mate	$115,51 \pm 1,241$	A
Framboesa	$2,398 \pm 0,210$	G
Ginco	$16,961 \pm 1,898$	DE
Menta	$62,870 \pm 6,194$	B
Morango	$4,559 \pm 0,047$	FG
Própolis	$32,227 \pm 3,221$	C
Romã	$63,661 \pm 5,715$	B
Uva	$5,796 \pm 0,447$	FG

Legenda: TE: Trolox[®] equivalente; letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre os extratos glicólicos analisados.

Figura 31 – Atividade antioxidante (μmolTE/mL) dos extratos glicólicos por ORAC. TE: Trolox[®] equivalente, letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos entre os extratos; $p < 0,05$; $n = 3$.

Observou-se, de acordo com a **Tabela 8** e com a **Figura 31**, que o extrato de erva-mate apresentou a maior atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente, seguido do extrato de romã e de menta que não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre si. Na sequência, seguiram os extratos de própolis, chá verde, ginkgo, castanha da Índia e açaí. Por fim, seguiram os extratos de uva, morango e acerola que apresentam atividades antioxidantes estatisticamente iguais entre si. O extrato de framboesa apresentou a menor atividade antioxidante desse grupo.

Dados da literatura demonstraram que extratos aquosos de erva-mate (*I. paraguariensis*), menta (*M. piperita*), chá verde (*C. sinensis*) e framboesa (*R. idaeus*), avaliados pela metodologia ORAC, apresentaram atividade antioxidante de 5092; 1409; 4704 e 608 $\mu\text{molTE/g}$, respectivamente. Esses valores foram superiores aos valores de 115,51; 62,870; 24,723 e 2,398 $\mu\text{molTE/mL}$ obtidos, respectivamente, nos extratos comerciais glicólicos de erva-mate (*I. paraguariensis*), menta (*M. piperita*), chá verde (*C. sinensis*) e framboesa (*R. idaeus*) (**Tabela 8**) (DUDONNÉ et al., 2009; KRATCHANOVA et al., 2010; MACEDO et al., 2011).

Schauss e colaboradores, 2006, determinaram a atividade antioxidante por ORAC de extrato de açaí (*E. oleracea*) preparado com acetona e água. Os autores obtiveram 997 $\mu\text{molTE/g}$. De acordo com a **Tabela 8**, esse valor foi superior ao valor de 6,249 $\mu\text{molTE/mL}$ obtido no extrato comercial glicólico de açaí (*E. oleracea*). Müller e colaboradores, 2010, utilizaram a mesma metodologia para determinar a atividade antioxidante de polpa de acerola e morango obtendo, respectivamente, 94,2 e 38,3 $\mu\text{molTE/g}$. Os extratos comerciais glicólicos de acerola (*M. glabra*) e morango (*F. vesca*) apresentaram atividade antioxidante inferior a esses valores (3,416 e 4,559 $\mu\text{molTE/mL}$, respectivamente). Estudo realizado com extratos de sementes de uvas (*V. vinifera*) demonstrou que a atividade antioxidante dos mesmos, determinada por ORAC, variou no intervalo de 1425,9 a 3009,2 $\mu\text{molTE/g}$. Conforme indicado na **Tabela 8**, o extrato comercial glicólico de uva (*V. vinifera*) apresentou atividade antioxidante inferior (5,796 $\mu\text{molTE/mL}$) ao intervalo determinado no estudo citado (BOZAN et al., 2008; MÜLLER et al., 2010; SCHAUSS et al., 2006).

Hudnall, 2007, demonstrou que um extrato de própolis preparado com água e acetona apresentou atividade antioxidante, determinada por ORAC, de 2459 $\mu\text{molTE/g}$. Esse valor foi superior ao valor de 32,227 $\mu\text{molTE/mL}$ encontrado no extrato comercial glicólico de própolis. Jardini, 2010, avaliou a atividade antioxidante por ORAC de frações de ácidos fenólicos da polpa e das sementes de romã (*P. granatum*) obtendo valores no intervalo de 740,92 a 12.202,06 $\mu\text{molTE/g}$. Esses valores foram superiores ao encontrado no extrato

comercial glicólico de romã (*P. granatum*) que apresentou atividade antioxidante de 63,661 $\mu\text{molTE/mL}$. Zheng e Wang, 2001, determinaram a atividade antioxidante, por ORAC, de extrato de ginkgo (*G. biloba*) preparado com tampão fosfato obtendo o valor de 13,18 $\mu\text{molTE/g}$. O valor determinado no extrato comercial glicólico de ginkgo (*G. biloba*) foi levemente superior (16,961 $\mu\text{molTE/mL}$) ao valor determinado pelos autores (HUDNALL, 2007; JARDINI, 2010; ZHENG; WANG, 2001).

Observou-se que a maioria dos extratos comerciais apresentou atividade antioxidante, determinada por ORAC, inferior aos dados da literatura. O mesmo comportamento foi verificado nos resultados gerados pela metodologia do DPPH (item 5.4). Adicionalmente, verificou-se que, no ensaio ORAC, os três extratos comerciais com maior teor de polifenóis totais (romã, erva-mate e menta) apresentaram as maiores atividades antioxidantes do grupo de extratos analisados.

Os valores de atividade antioxidante obtidos pelos ensaios de DPPH e ORAC, para cada extrato, foram analisados comparativamente com o auxílio do teste t de Student pareado ($p < 0,05$) visando verificar diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão expressos na Tabela 9 e na Figura 32.

Tabela 9 – Resultado do teste t de Student pareado comparando ORAC e DPPH

Extratos glicólicos	ORAC ($\mu\text{molTE/mL} \pm \text{DP}$)	DPPH ($\mu\text{molTE/mL} \pm \text{DP}$)	Teste T de Student
Açaí	6,249 $\pm$ 0,669	0,458 $\pm$ 0,032	*
Acerola	3,416 $\pm$ 0,231	1,10 $\pm$ 0,023	*
Castanha da Índia	13,646 $\pm$ 2,669	0,924 $\pm$ 0,047	*
Chá verde	24,723 $\pm$ 0,587	12,624 $\pm$ 0,479	*
Erva-mate	115,51 $\pm$ 1,241	35,543 $\pm$ 1,868	*
Framboesa	2,398 $\pm$ 0,210	0,711 $\pm$ 0,048	*
Ginkgo	16,961 $\pm$ 1,898	2,042 $\pm$ 0,145	*
Menta	62,870 $\pm$ 6,194	10,130 $\pm$ 0,457	*
Morango	4,559 $\pm$ 0,047	1,426 $\pm$ 0,027	*
Própolis	32,227 $\pm$ 3,221	3,407 $\pm$ 0,184	*
Romã	63,661 $\pm$ 5,715	96,173 $\pm$ 2,537	*
Uva	5,796 $\pm$ 0,447	0,757 $\pm$ 0,018	*

Legenda: TE: Trolox[®] equivalente; DV = desvio padrão; O símbolo * indica diferenças estatisticamente significativa entre os resultados de ORAC e DPPH

Figura 32 – Análise comparativa da atividade antioxidante ($\mu\text{molTE/mL}$) dos extratos glicólicos por DPPH e ORAC. TE: Trolox[®] equivalente

De acordo com a **Tabela 9**, verificou-se que todos os extratos glicólicos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os resultados de ORAC e DPPH, indicando que, neste estudo, os resultados de DPPH e ORAC não foram semelhantes. Os métodos utilizados para determinação da atividade antioxidante atuam por distintos mecanismos. O método do radical DPPH consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar. Este radical de coloração púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. O decréscimo da leitura de absorbância, realizada a 517 nm, permite calcular a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. O método de ORAC utiliza o radical livre peroxila gerado após a decomposição térmica de AAPH - 2,2 -azobis (2-amidinopropano) diidroclorido. A fluoresceína (3,6 - dihidroxiespiro (isobenzofuran-1 {3H}9{9H}-xanten-3-ona) é utilizada como marcador fluorescente estável e os radicais peroxila diminuem sua fluorescência. O antioxidante a ser estudado reage com a peroxila doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Essa inibição é proporcional à atividade antioxidante. Utiliza-se Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como padrão e os resultados são expressos em equivalentes de Trolox[®] (LIMA, 2008; SOUSA et al, 2007).

Dudonné e colaboradores, 2009, realizaram um estudo comparativo entre diferentes métodos de determinação de atividade antioxidante em extratos de plantas e verificaram que o ensaio de ORAC não apresentou boa correlação com os demais métodos de determinação da atividade antioxidante, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro) e SOD (superóxido dismutase). No ensaio de ORAC, a reação da espécie reativa com o substrato é desenvolvida até o final, sendo diferente dos demais métodos que utilizam uma porcentagem de inibição do radical a um tempo fixo. O método de ORAC combina tanto a porcentagem de inibição quanto a longitude do tempo total de inibição do radical livre por um antioxidante. Essa diferença entre os métodos, segundo Dudonné e colaboradores, poderia explicar a discrepância encontrada no estudo (DUDONNÉ et al, 2009; LIMA, 2008).

Ambos os métodos apresentam vantagens, o ensaio de DPPH é amplamente utilizado para a determinação de atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas, possui como vantagem o fato do radical ser estável e disponível comercialmente, facilitando o uso e evitando sua formação por distintas formas. Como desvantagem não pode ser utilizado em ensaios biológicos, porque as proteínas precipitam em meio alcoólico. O ensaio por ORAC apresenta como vantagem o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, havendo

menor interferência dos compostos coloridos presentes na amostra. Além disso, utiliza o radical peroxila como pró-oxidante, o que confere maior significado biológico (LIMA,2008). Embora os resultados gerados pelos métodos sejam diferentes, foi possível determinar por meio dos dois métodos que os extratos de romã, erva-mate e menta apresentaram valores de atividade antioxidante, em equivalente de Trolox[®], superiores aos demais extratos.

6. CONCLUSÕES

Os métodos propostos para a quantificação do teor de polifenóis totais e flavonoides totais em amostras comerciais de extratos glicólicos não padronizados demonstraram-se adequados. Foi possível selecionar, dentre os doze extratos estudados, aqueles que apresentaram maior teor de flavonoides totais e polifenóis totais. Neste contexto, destacaram-se os extratos de romã (*P. granatum*), erva mate (*I. paraguariensis*), menta (*M. piperita*), própolis, ginkgo (*G. biloba*) e chá verde (*C. sinensis*). Esses extratos foram escolhidos para os ensaios de estabilidade e análise do Fator de Proteção Solar (FPS) descritos, respectivamente, nos **Capítulos 2 e 3**.

A atividade antioxidante determinada por métodos distintos, um amplamente utilizado (DPPH) e outro despontando como nova opção de metodologia (ORAC), elegeu os extratos de romã (*P. granatum*), erva mate (*I. paraguariensis*) e menta (*M. piperita*), como os de maior valores de atividade antioxidante. A maioria dos extratos comerciais glicólicos apresentou teores de polifenóis e flavonoides totais e valor de atividade antioxidante inferiores aos descritos na literatura.

7. REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – **Anuário 2009**. Disponível em: < <http://www.abihpec.org.br>>. Acesso em: 26 jul. 2010.
- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – **II Caderno de Tendências Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Disponível em: < http://www.abihpec.org.br/conteudo/caderno_tendencias.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2011.
- ABURJAI, T.; NATSHEH, F.M.; Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 987-1000, 2003.
- AÇAÍ ARCHIVE FOR CATEGORY. *Euterpe oleracea*. Disponível em: < <http://saviofragoso.wordpress.com/category/as-frutas/acai/>> Acesso em: 01 nov. 2010.
- ANDERSEN, F.A Final report on the safety assessment of *Mentha Piperita* (Peppermint) Oil, *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf Extract, *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf, and *Mentha*

Piperita (Peppermint) Leaf Water. **International Journal of Toxicology**, v. 20 (SUPPL. 3), p. 61-73, 2001.

ANDERSEN O.M.; MARKHAM K.R.. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications** CRC Press Taylor & Francis: Boca Raton, p. 1197, 2006.

ANTIGNAC E.; NOHYNEK G.J.; RE T.; CLOUZEAU J.; TOUTAIN H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology** v. 49, p. 324-341, 2011.

ARAÚJO, A.I.F; LIMA, E.P; SILVA, G.A; SANTOS, O.H.; SOARES, T.F. **Plantas nativas do Brasil empregadas em fitocosmética**. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro de 2010. Disponível em: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0037-2.PDF>. Acesso em: 30 out.2010.

ARCT J.; PYTKOWSKA K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v.26, p. 347-357, 2008.

ASLAM, M.N; LANSKY, E.P.; VARANI J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103 p. 311–318, 2006.

ASSIS, S.A.D., FERNANDES, F.P., MARTINS, A.B.G., OLIVEIRA, O.M.M.D.F. Acerola: Importance, culture conditions, production and biochemical aspects **Fruits**, v.63, n. 2, p. 93-101, 2008.

B. JÚNIOR, I.D. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para produtos de *Mentha piperita* L. obtidos de diferentes tecnologias farmacêuticas**. João Pessoa, 2009 172p. [Tese de Doutorado – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal da Paraíba].

BABY, A.R; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A; SARRUF, F.D; TAVANTE-JÚNIOR, C.R; PINTO, C.A.S.O; ZAGUE, V.; ÁREAS, E.P.G; KANEKO, T.M; VELASCO M.V.R Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

BANOV D. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de *Ginkgo biloba***. São Paulo, 2002. 112 p. [Dissertação de Mestrado em Fármaco e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].

BAREL A. Anticellulite Products and Treatments. In: _____ **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Estados Unidos: Informa Healthcare, 3 ed. Cap 59, p. 603-612, 2009.

BAUMANN LS.; Less-known botanical cosmeceuticals. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 330–342, 2007.

BÍBLIA. português. **A BÍBLIA SAGRADA**. Traduzida por João Ferreira de Almeida. Revista e Corrigida. Ed. 1995. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 1995. 1408p.

BLANCO-DÁVILA, F. Beauty and the body: the origins of cosmetics. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 3, p.1196-1204, 2000.

BOTTARO, M.; GONÇALVES, G.M.S. Obtenção de extrato de açaí, **avaliação do efeito antioxidante *in vitro* e desenvolvimento de formulações dermocosméticas para a sua veiculação**. Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas - 29 e 30 de setembro de 2009.

BOZAN B.; TOSUN G.; ÖZCAN D. Study of polyphenol content in seed of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry** v. 109, p. 426-430, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30,1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução R.E. n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 de maio 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2008.

BRITO, N.M; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.

BURIOL L.; FINGER D.; SCHMIDT E.M.; SANTOS J.M.T.; ROSA M.R.; QUINÁIA S.P.; TORRES Y. R. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**. v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

CAMPELO, E.C.S.; MARTINS, M.H.B.; CARVALHO, I.T.; PEDROSA, E.M.R. Teores de vitamina C em polpas de acerola (*Malpighia glabra* L.) congeladas. **B.CEPPA**, v. 16, n. 1, p. 107-113, 1998.

CASAZZA A.A.; ALIAKBARIAN B.; MANTEGNA S.; CARVOTTO G.; PEREGO P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of food engineering** v. 100, p. 50-55, 2010.

CATÃO, R. M. R; ANTUNES, R. M. P; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M.G.V.M., SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados dos ambulatoriais de *Staphylococcus aureus* **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n.2, p. 111-114, 2006.

CHAILLOU L.L.; NAZARENO M.A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **Food Science and Technology** v. 42, p. 1422-1427, 2009.

CHAUDHRI, S.K.; JAIN, N.K. History of cosmetics. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v.3, n.3, p.164-7, 2009.

CHEEL J.; THEODULOZ C.; RODRÍGUEZ J. A., CALIGARI P.D.S.; SCHMEDA-HIRSCHMANN. Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. **Food Chemistry** v. 102, p. 36-44, 2007.

CHEN S.; XING X.H.; HUANG J.J.; XU M.S. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 28, p. 100-105, 2011.

CHUARIENTHONG P.; LOURITH N.; LEELAPORNPISID P. Clinical efficacy comparison of anti-wrinkle cosmetics containing herbal flavonoides. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, p. 99-106, 2010.

CORRÊA F.L.O.; SOUZA C.A.S. ; MENDONÇA V.;CARVALHO J.G Acúmulo de nutrientes em mudas de acerola adubadas com fósforo e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 765-769, 2002.

COZZOLINO D.; RESTAINO E.; FASSIO A. Discrimination of yerba mate (*Ilex paraguayensis*. St. Hil.) samples according to their geographical origin by means of near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Sensing and Instrumentation Food Quality and Safety** v. 4, p. 67-72, 2010.

CRF-SP. **Publicação do Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo** – Fevereiro/2010. Indústria. 2ed. Disponível em: <<http://www.crfsp.org.br>>. Acesso em: 27 jul. 2010.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2009, p. 670.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba***. Ribeirão Preto, 2008. 176p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo].

DAVIS S.C; PEREZ R. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p.502-506, 2009.

DEGANI A.L.G, CASS Q.B; VIEIRA PC. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola Cromatografia**, n.7, p. 21-25, 1998.

DORMAN H.J.D.; KOSAR M.; KAHLOS K.; HOLM Y.; HILTUNEN R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563 – 69, 2003.

DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; OLIVEIRA, J.M; VILANOVA, M.; TEIXEIRA, J.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SCHWAN, R.F. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and others compounds. **Food Research International**, v. 43, p. 2303-2314, 2010.

DUDONNÉ, S; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

DUKE, J.A. **CRC Handbook of Medicinal Herbs**. 2 ed. Boca Raton, Florida, CRC Press, 2002, p.896.

EVANS W.C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 16ed. Elsevier, 2009, p. 603.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Volume I. São Paulo, 2010. p. 43/ 204-206. (a)

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Volume II. São Paulo, 2010. p. 670. (b)

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Volume II. São Paulo, 2010. p. 714. (c)

FÖLSTER-HOLST, R.; LATUSSEK, E. Syntetic tannins in Dermatology- A therapeutic option in a variety of pediatric dermatoses. **Pediatric Dermatology**, v.29, n.3, p. 296-301, 2007.

FONT QUER, PIO. **Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado**. 15 ed. Barcelona, Editorial Labor S.A., 1033 p.1995.

FONTES M. Os percursos do corpo na Cultura Contemporânea. **XIX Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação** – UNB- 6 a 9 de setembro de 2006.

FUNARI C.S.; FERRO V.O.; Análise de própolis. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GÁLVEZ MV. Antioxidantes en fotoprotección, realmente funcionan? **Actas Dermo-Sifiliografica**, v.101, n.3, p.197-200, 2010

GOBBO-NETO L.; LOPES N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOLYNSKI, A.A. **Controle de helmintos de frangos de corte utilizando as plantas *Mentha piperita*, *Carapa guianensis*, *Artemisia absinthium* e *Chenopodium ambrosioides*** Seropédica, 2003. 44p. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro]

GÖKTAS S.; ÜLKÜ S.; BAYRAKTAR O. Clinoptilolite-rich mineral as a novel carrier for the active constituents present in *Ginkgo biloba* leaf extract. **Applied Clay Science** v.40, p.6-14, 2008.

GONÇALVES, M.P.J.; BOTRELD, A; SOARES, N.F.F.; STRINGHETA, P.C. Irradiação gama como alternativa de conservação de polpa de acerola. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.2, p.159-163, 2006.

GRUENWALD J.**PDR for Herbal Medicines** (Physician`s Desk Reference for Herbal Medicines). 2 ed. Montuale, medical economies, 2000, p. 858.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clavendon Press, 1985. p. 12

HARBORNE J.B. Arsenal for survival: Secondary plant products. **Taxon**. v. 49, n.3 p.435-449, 2000.

HARRIS R.; LECUMBERRI E.; MATEOS-APARICIO I.; MENGÍBAR M.; HERAS A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *ilex paraguariensis* **Carbohydrate Polymers** artigo in press.

HASLAM E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes de action. **J. Nat. Prod.** v. 59, p. 205-215, 1996.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy**. 1.ed. Elsevier Science. Espanha, 2004, p.309.

HENRIETTE'S HERBAL HOMEPAGE. *Camellia sinensis*. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p03/pages/camellia-sinensis-5.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Fragaria vesca* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p06/pages/fragaria-vesca-2.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Ginkgo biloba* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p06/pages/ginkgo-biloba-9.htm> >. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Ilex paraguariensis*. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p07/pages/ilex-paraguariensis-2.htm> >. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Malpighia glabra* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p08/pages/malpighia-glabra-1.htm>> Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Mentha piperita* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p09/pages/mentha-x-piperita-12.htm> >. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Punica granatum* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p11/pages/punica-granatum-3.htm> >. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Vitis vinifera* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p14/pages/vitis-vinifera-2.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2010.

_____. *Rubus idaeus* L. Disponível em: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p12/pages/rubus-idaeus-5.htm> >. Acesso em 01 nov. 2010.

HUDNALL, M. US Patent 7294351: Composition containing fractionated bee propolis, 2007.

JARDINI, F.A. **Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Punica granatum* L) – avaliação *in vivo* e em cultura de células**. São Paulo, 2010. 115p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].

KÄHKÖNEN M.P.; HOPIA A.I.; VUORELA H.J.; RAUHA J.P.; PIHLAJA K.; KUJALA T.S.; HEINONEN M. Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KALOGEROPOULOS N.; KONTELES S.J.; TROULLIDOU E.; MOURTZINOS I.; KARATHANOS V.T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry** v.116, n.2, p. 452-461, 2009.

KAPUSTA I.; JANDA B.; SZAJWAJ B.; STOCHMAL A.; PIACENTE S.; PIZZA C.; FRANCESCHI F.; FRANZ C.; OLESZEK W. Flavonoids in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds and powdered waste water byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 8485-90, 2007.

KHOKHAR S.; MAGNUSDOTTIR S.G.M.; Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 3, p. 565-70, 2002.

KRATCHANOVA M.; DENEV P.; CIZ M.; LOJEK A.; MIHAİLOV A. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. **Acta Biochimica Polonica** v.57, n.2, p.229-234, 2010.

KÜÇÜKKURT, I.; INCE, S.; KELES, H.; AKKOL, E.K.; AVCI, G.; YESİLADA, E.; BACAK E. Beneficial effects of *Aesculus hippocastanum* L seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 129, p. 18-22, 2010.

KUSKOSKI E.M.; ASUERO A.G.; MORALES M.T.; FETT R. Frutos tropicais silvestres e polpa de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LASKAR R.A.; SK I.; ROY N.; BEGUM N.A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. **Food chemistry**, v.112, p. 233-237, 2010.

LEROI-GOURHAN, A. The flowers found with Shanidar IV, a Neanderthal Burial in Iraq. **Science**, v. 190, n. 4214, p. 562-4, 1975.

LIANDA R.L.P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. Seropédica, 2009. 156p. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro]

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)** São Paulo, 2008. 181p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – Universidade de São Paulo].

LIMA, V.L.A.G; MELO, E.A; MACIEL, M.I.S; LIMA, D.E.S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.1, p.101-3, 2003.

LOPES V.C.; MARTINS M.H.B; CARVALHO I.T. Teor de ácido ascórbico e dehidroascórbico em polpas de acerola (*Malpighia glabra* L.) congeladas e comercializadas na cidade do Recife –PE. **B.CEPPA**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 1997.

MACEDO J.A.; BATTESTIN V.; RIBEIRO M.L.; MACEDO G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry** v. 126, p. 491-497, 2011.

MALDONADO S.H.G.; PACHECO I.T.; AVILÉS A.M.; GALLEGOS J.A.A.; LÓPEZ R.M.; LARA R.G. Potencial de plantas de uso común em México como fuente de compuestos

fenólicos, hierro y vitamina C. **Agricultura Técnica em México**, v. 31, n.2, p. 115-123, 2005.

MALTAS E.; VURAL H.C.; YILDIZ S. Extraction og genomic DNA from polysaccharide – and phenolics- rich *Ginkgo biloba*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 3, p. 332-339, 2011.

MARRONNIER COMMUN. **Dictionnaires et encyclopédies sur academic**. Disponível em :< <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/57497>>. Acesso em: 28 out. 2010.

MARTINI, M.C.; SEILLER M. **Actifs & Additifs en Cosmétologie**. 2 ed. Paris: Editora Lavoisier TEC & DOC, 1999. p. 632.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras de pele**. Ribeirão Preto, 2009. 166p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo].

MATA, V.A. Da força física à estética corporal: as mudanças nas relações sociais retratadas no corpo. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 9, n. 1, p. 35-43, 1998.

MELO, J.G; MARTINS, J.D.G.R; AMORIM, E.L.C; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasílica**. v. 21, n.1, 27-36 p., 2007.

MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SRUR, A.U.S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada **Acta Amazônica** v. 38, n.2, p. 311-16, 2008.

MILIVOJEVIC J.; MAKSIMOVIC V.; NIKOLIC M.; BOGDANOVIC J.; MALETIC R.; MILATOVIC. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and rubus berries. **Journal of Food Quality** v. 34, n.1, p. 1-9, 2011.

MISCELLANEOUS BEE EQUIPMENT. Própolis amarela. Disponível em: < <http://www.bushfarms.com/beesmisc.htm>>. Acesso em 01 nov. 2010.

MOLINA-QUIJADA D.M.A.; MEDINA-JUÁREZ L.A.; GONZÁLEZ-AGUILLAR G.A.; ROBLES-SÁNCHEZ R.M.; GÁMEZ-MEZA N. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. **Journal of Food** v.8, n.1, p. 57-63, 2010.

MORAES-DE-SOUZA, R.A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**. Piracicaba, 2007. 59p. [Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo].

MOUSSA A.M.; EMAM A.M.; DIAB Y.M.; MAHMOUD M.E.; MAHMOUD A.S. Evaluation of antioxidant potential of 124 Egyptian plants with emphasis on the action of *Punica granatum* leaf extracts on rats. **International Food Research Journal**. v. 18, p. 532-539, 2011.

MUETZEL S.; BECKER K. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 125, p. 139-149, 2006.

MÜLLER L.; GNOYKE S.; POPKEN A.M.; BÖHM V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **Food Science and Technology** v. 43, p. 992-999, 2010.

MUSEU DEL PERFUM. Search Bottles. Disponível em: <<http://www.museudelperfum.com>>. Acesso em: 04 ago.2010.

NASCIMENTO, M.S; SILVA, N. Tratamentos químicos na sanitização de morango (*Fragaria vesca* L) **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2010.

NATUCENTRO PRÓPOLIS. Própolis marrom, verde e vermelha. Disponível em: <www.natucentro.com.br/materia_innatura.php>. Acesso em: 01 nov. 2010.

NICHOLS, J.A; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**. v.303, n. 2, p. 302:71-83, 2010

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***. Ribeirão Preto, 2007. 155 p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo].

PAGLIARONE, A.C. **Efeito da própolis sobre a produção de citocinas e expressão do receptor TLR-4 por camundongos submetidos a estresse** Botucatu, 2009. 110p. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista]

PATEL, A.V.; ROJAS-VERA, J.; DACKER, C.G. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. **Current Medicinal Chemistry**. v.11, p.1501-12, 2004.

PEREIRA A.V.; ALMEIDA T.C.; BELTRAME F.L.; COSTA M.E.; GARRIDO L.H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 31, n.2, p. 119-124, 2009.

PILJAC-ZEGARAC J.; SAMEC D. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. **Food Research International** v. 44, p. 345-350, 2011.

PINHEIRO E. S. **Avaliação dos aspectos sensoriais, físico-químicos e minerais do suco de uva da variedade benitaka (*Vitis vinifera* L.)** Fortaleza, 2008. 106p. [Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Ceará]

POMPEU D.R.; SILVA E.M.; ROGEEZ H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6076-6082, 2009.

PRADO A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Piracicaba, 2009. 106 p. [Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo]

PRIOR, R.L; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.11/12, p.1173-81, 1999.

QUEIROZ, C.R.R.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroreira preta (*Myracrodruon urundeuva*) **Revista Árvore** v.26, n.4, p. 485-492, 2002.

RABABAH, T.M; BANAT, F.; RABABAH, A.; EREIFEJ, K.; YANG, W. Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. **Journal of Food Science**, v. 75, n.7, p. 626-632, 2010.

RANILLA, L.G.; KWON, Y.; APOSTOLIDIS E.; SHETTY K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Tecnology** v. 101, n. 12, p. 4676-89, 2010.

RASEIRA, M.C.B; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C. Aspectos técnicos da cultura de framboeseira. **Documentos 120**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 22 p., 2004.

REUTER J.; MERFORT I.; SCHEMPP C.M. Botanicals in dermatology. An evidence-based review. **American Journal of Clinical Dermatology**. v. 11, n.4, p.247-267, 2010.

REUTER J.; WÖLFLE U.; WECKESSER S.; SCHEMPP C.M. Which plant for which skin disease? Part 1: Atopic dermatitis, psoriasis, acne, condyloma and herpes simplex. **Journal of the German Society of Dermatology**. v. 8, n.10, p.788-796, 2010.

RUSAK G.; KOMES D.; LIKIC S.; HORZIC D.; KOVAC M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food chemistry**, v. 110, p. 852-858, 2008.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. **Analysis of Cosmetic Products**. Elsevier, 2007, p.487.

SAMARTH R.M.; SAMARTH M.; Protection against radiation-induced testicular damage in swiss albino mice by *Mentha piperita* (Linn.). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 329-334, 2009.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-6, 1998.

SCHAUSS A.G.; WU X.; PRIOR R.L.; OU B.; HUANG D.; OWENS J.; AGARWAL A.; JENSEN G.S.; HART A.N.; SHANBROM G.S. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, p. 8604-8610, 2006.

SCHULTZ J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açais de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius submetidos a tratamentos para sua conservação**. Florianópolis, 2008. 52p. [Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Agrárias– Universidade Federal de Santa Catarina]

SILVA, A.R.; MENEZES, P.F.C; MARTINELLO, T.; NOVAKOVICH, G.F.L; PRAES, C.E.O; FEFERMAN, I.H.S. Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, p. 73-80, 2010.

SILVA J. F.M.; SOUZA M.C.; MATTA S.R.; ANDRADE M.R.; VIDAL F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 431-435, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007. p.1102.

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**, [S.l.], v. 299, p. 152-178, 1999.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUZA S.R.S. **Investigação fitoquímica e capacidade antioxidante da raiz de *Euterpe oleracea* Mart. (açai)**. Belém, 2009. 81p. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Pará]

STAHL E.; SCHILD, W. **Pharmazeutische Biologie**, 4. Drogenanalyse II. Inhaltsstoffe und Tisolierungen. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. p. 126-127, 1981

SURVESWARAN S.; CAI Y.Z.; CORKE H.; SUN M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food chemistry** v. 102, p. 938-953, 2007.

TAI T.H.; TAI T.H.; CHIEN Y.C.; LEE C.W.; TAI P.J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food chemistry**. v. 110, p. 859-864, 2008.

UNACHUKWU U.J.; AHMED S.; KAVALIER A.; LYLES J.T.; KENNELLY E.J. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidants profiles. **Journal of Food Science**, v.75, n.6, p.C541- C548, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 32 ed. v.1, **Validation of Compendial Procedures**. 2009. p.733-737.

VALENTA, C.; NOWACK, E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. **International Journal of Pharmaceutics** v.185, n.1, p.103-111, 1999.

VARGAS P.N.; HOELZEL S.C.; ROSA C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alim. Nutr.** V. 19, n. 1, p. 11-15, 2008.

VIEIRA, A.T.B.; Origens da medicina romana na História Natural, de Plínio o velho. **Revista Archai**, Brasília, n.03, p. 31-43, 2009. Disponível em [http:// archai.unb.br/revista](http://archai.unb.br/revista).

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas** 2.ed. Springer. Germany, 1996, p.384

WANG HF, WANG YK, YIH KH. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils. **Journal of Cosmetic Science**, v. 59, p. 509-22, 2008.

WERKMAN, C.; GRANATO, D.C.; KERBAUY, W.D.; SAMPAIO, F.C.; BRANDÃO, A.A.H.; RODE, S.M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, n.3, p.104-111, 2008.

YI W.; WETZSTEIN H.Y. Biochemical, biological and histological evaluation of some culinary and medicinal herbs grown under greenhouse and field conditions. **J. Sci. Food Agric.**, v. 90, p. 1063-1070, 2010.

ZHENG W.; WANG S. Y.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of agricultural and food chemistry** v. 49, n.11, p. 5165-70, 2001.

ZILHÃO, J.; ANGELUCCI, D.E.; BADAL-GARCÍA, E.;D'ERRICO, F.; DANIEL, F.; DAYET, L.; et al. Symbolic use of marine shells and mineral pigments by Iberian Neandertals. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 107, n.3, p. 1023-28, 2010.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA ESTABILIDADE DE EXTRATOS GLICÓLICOS

RESUMO

A presença de extratos glicólicos em formulações cosméticas pode afetar a estabilidade das mesmas devido às variações de solubilidade e estabilidade apresentadas por eles. Estudos de estabilidade relacionados com produtos contendo extratos glicólicos são frequentes, entretanto, aqueles avaliando os extratos isoladamente são menos comuns. Assim, o presente trabalho avaliou a estabilidade organoléptica, físico-química e química de seis extratos glicólicos de uso cosmético [chá verde (*Camellia sinensis*), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), ginko (*Ginkgo biloba* L.), menta (*Mentha piperita* L.), própolis e romã (*Punica granatum* L.)], não padronizados e disponíveis no mercado brasileiro. Avaliaram-se, ao longo de 90 dias, as características organolépticas, o valor do pH, da viscosidade dinâmica, da densidade absoluta, o teor de polifenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante desses extratos nas condições geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C), estufa ($45,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura ambiente com e sem proteção da incidência de luz solar ($23,0 \pm 2,0$ °C). O Estudo de Estabilidade proposto revelou comportamentos distintos entre os extratos. Cada extrato apresentou variações superiores ao intervalo de $\pm 10,0$ % em pelo menos um dos parâmetros avaliados. Valor de pH, teor de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante foram os parâmetros que sofreram variações no extrato de chá verde (*C. sinensis*). O extrato de erva-mate (*I. paraguariensis*) apresentou variações no teor de flavonoides totais e no valor da atividade antioxidante. O extrato de ginko (*G. biloba*) demonstrou variações no teor de polifenóis totais e nos mesmos parâmetros do extrato de erva-mate. Teor de polifenóis totais e atividade antioxidante foram os parâmetros alterados no extrato de menta (*M. piperita*). O extrato de própolis apresentou variações no teor de polifenóis e flavonoides totais e o extrato de romã (*P. granatum*) demonstrou alterações no valor da atividade antioxidante. Observou-se que a temperatura elevada (45 °C) afetou a estabilidade de todos os extratos, exceto do extrato de romã. De acordo com os parâmetros individualmente avaliados, sugere-se que os extratos glicólicos de chá verde, ginko e menta sejam armazenados, ao abrigo da luz solar, em geladeira (5 °C) para minimizar o efeito da temperatura e da luz solar sobre suas estabilidades. Também, sugere-se que os extratos glicólicos de erva-mate e própolis sejam armazenados à temperatura ambiente ou em geladeira.

Palavras-chave: extrato vegetal, própolis, avaliação de estabilidade, polifenóis, flavonoides, atividade antioxidante

1. INTRODUÇÃO

A indústria nacional de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética (HPPC) apresentou crescimento de 10,60% nos últimos treze anos detendo, atualmente, o terceiro maior mercado mundial. Seu faturamento “ExFactory”, líquido de imposto sobre renda, passou de R\$ 4,90 bilhões em 1996 para R\$ 24,90 bilhões em 2009. Apesar da crise no setor financeiro internacional ocorrida em 2009, a indústria nacional de HPPC permaneceu em contínuo crescimento. A grande maioria das empresas desse setor agiu com pró-atividade diante desse quadro adverso, mantendo seus planos de investimento em *marketing*, comunicação e pesquisa e desenvolvimento, aumentando a produtividade e minimizando os efeitos da crise (ABIHPEC ANUÁRIO, 2010; ABIHPEC PANORAMA, 2010).

Segundo dados da Euromonitor, o mercado brasileiro de produtos para a pele movimentou US\$ 3,60 bilhões no ano de 2008, atingindo a sexta colocação no *ranking* mundial com participação de 4,80%. Japão, Estados Unidos, China, França e Alemanha ocupam, respectivamente, as primeiras colocações nessa categoria que apresentou, em 2008, crescimento mundial de 10,38% com movimentação de US\$ 75,77 bilhões. Em relação à categoria proteção solar, o mercado nacional movimentou US\$ 720 milhões no mesmo ano, atingindo a segunda colocação no *ranking* mundial com participação de 9,20%. O mercado total da categoria apresentou crescimento de 9,57% movimentando US\$ 7,81 bilhões, sob a liderança dos Estados Unidos que detêm 18,40% do mercado (ABIHPEC ANUÁRIO, 2010).

Inúmeros produtos são destinados à pele como os esfoliantes, anticelulites, antiestrias hidratantes, bronzeadores, *antiaging* e protetores solares. Muitos desses produtos apresentam componentes de origem vegetal em suas composições, seguindo a tendência de incorporação de ingredientes naturais em formulações cosméticas. Extratos vegetais são amplamente utilizados em formulações para a pele, apesar das variações de solubilidade e estabilidade apresentadas pelos mesmos que desafiam a vida de prateleira (*shelf-life*) e a estabilidade dos produtos acabados. Dessa forma, estudos de estabilidade dos produtos acabados e das matérias-primas são fundamentais no desenvolvimento de produtos para o cuidado da pele (ABIHPEC ANUÁRIO, 2010; EPSTEIN, 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Antes do lançamento de qualquer produto cosmético, tornam-se necessárias evidências convincentes de que durante o tempo entre a produção do cosmético e o uso do mesmo pelo

consumidor não haverá qualquer mudança que afete negativamente seu desempenho, que o torne menos aceitável ou que o faça causar riscos ao consumidor. Estudos de estabilidade são partes integrantes do processo de desenvolvimento de produtos cosméticos, tais estudos orientam o desenvolvimento da formulação adequada e a escolha correta dos materiais de acondicionamento, estimam o prazo de validade e fornecem informações para a sua confirmação, fornecem subsídios para o aperfeiçoamento das formulações e auxiliam no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica. A execução desses testes deve ser realizada minuciosamente para garantir a confiabilidade e segurança dos produtos (ABIHPEC, 2007; BUTLER, 2000).

O teste de estabilidade tem por objetivo assegurar que os novos produtos cosméticos e os produtos modificados, ou seja, aqueles que sofreram alterações em suas formulações ou no material de acondicionamento, atendam aos padrões de qualidade físicos, químicos e microbiológicos e mantenham a funcionalidade e a estética quando armazenados sob condições apropriadas. Cannell, 1985, relata que o teste de estabilidade determina se um dado produto em seu material de acondicionamento possui adequada vida de prateleira (*shelf-life*) sob as condições do mercado em que o mesmo é vendido. Segundo a *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists* (IFSCC), o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, ou seja, seus resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso. Ele baseia-se em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam a acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições do mercado (BRASIL, 2004; CANNELL, 1985; CTFA & COLIPA, 2004).

É de responsabilidade de cada empresa a avaliação da estabilidade de seus produtos, antes de disponibilizá-los ao consumo, tal requisito é fundamental para manter a qualidade e segurança dos mesmos. Produtos disponíveis aos consumidores que apresentem problemas de instabilidade organoléptica, físico-química e/ou microbiológica podem colocar em risco a saúde do consumidor. A legislação brasileira vigente exige a apresentação dos dados de estabilidade no ato da regularização do produto acabado e nas inspeções realizadas pela autoridade sanitária. “Além disso, deve ser cumprido o Termo de Responsabilidade firmado pela empresa, no qual a mesma declara possuir dados que atestam à eficácia e a segurança do seu produto” (ABIHPEC, 2007).

2.1.1 VIDA DE PRATELEIRA (*SHELF-LIFE*)

Não existem definições oficiais ou legais de vida de prateleira aplicadas a produtos cosméticos. As Diretivas de Cosméticos da Comunidade Européia exigem que os produtos

cosméticos com menos de 3 anos de estabilidade sejam rotulados com uma data de vencimento. No Reino Unido, o regulamento de 2008 relativo à segurança de produtos cosméticos (*Cosmetic Products (safety) regulations*) exige que produtos cosméticos com durabilidade de 30 meses ou menos sejam comercializados com uma data de duração mínima (“*best-before*” date), a indicação da data deve ser mencionada da seguinte forma: “melhor utilizar antes de” e, em seguida, deve constar a data (dia/mês/ano ou mês/ano) ou a indicação de onde a mesma se localiza na embalagem. Também, deve haver a descrição de qualquer condição particular que afete a durabilidade do produto (BUTLER, 2000; CANNELL, 1985; COSMETIC PRODUCTS (SAFETY) REGULATIONS, 2008).

Os produtos que apresentam durabilidade maior que 30 meses devem ser comercializados com o símbolo indicado na **Figura 1**, juntamente com a indicação (meses ou anos) do período após a abertura que o produto pode ser usado sem causar riscos ao consumidor (COSMETIC PRODUCTS (SAFETY) REGULATIONS, 2008).

Figura 1 – Símbolo exigido para cosméticos com durabilidade maior que 30 meses (COSMETIC PRODUCTS (SAFETY) REGULATIONS, 2008)

Vida de prateleira pode ser definida como o intervalo de tempo que o produto permanece em conformidade com suas especificações, sendo armazenado sob as condições do mercado, ou seja, é o período de tempo entre a data de fabricação do produto e a data em que o mesmo cessa de cumprir com suas especificações. É natural que os produtos apresentem modificações com a passagem do tempo até tornaram-se insatisfatórios para o uso. Um produto que está perto do limite de suas especificações, em relação a qualquer parâmetro, quando é liberado para a venda apresentará um tempo relativamente pequeno para começar a descumprir com suas especificações, indicando que sua vida de prateleira é curta. Por esta razão, dois tipos de especificações são estabelecidos para avaliação da vida de prateleira: especificação de liberação (*release specification*) e especificação de checagem (*check specification*). A primeira deve ser cumprida pelo produto na fabricação do mesmo e na liberação para a venda e a segunda, durante todo o período de sua vida de prateleira (BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

A **Figura 2** ilustra a definição de vida de prateleira baseada nas especificações citadas. De acordo com as mesmas, vida de prateleira é o período de tempo necessário para que o menor parâmetro estável do produto, armazenado sob as condições do mercado, mude do valor limite da especificação de liberação para o valor limite da especificação de checagem (BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

Figura 2 – Especificação de liberação e checagem como determinantes da vida de prateleira (BUTLER, 2000)

Além de demonstrar a estabilidade do produto, a vida de prateleira também demonstra a estabilidade da combinação do produto com o material de acondicionamento. Assim, abordam-se, além da estabilidade física e química do produto, possíveis interações produto-material que podem gerar efeitos danosos no produto, no material ou em ambos. A estabilidade de um produto é composta por dois elementos: a estabilidade inerente do mesmo no material de acondicionamento e a compatibilidade entre ambos. O primeiro refere-se à estabilidade do produto armazenado em material de acondicionamento inerte e impermeável, capaz de protegê-lo totalmente do ar ambiente, sem apresentar interações com o mesmo e o segundo, inclui todas as interações entre o produto e o material de acondicionamento (CANNELL, 1985; BUTLER, 2000).

2.1.2 FATORES QUE INFLUENCIAM A ESTABILIDADE

A estabilidade de um produto cosmético pode ser influenciada por cada componente da formulação seja ativo ou não e por variáveis relacionadas ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento, à formulação e às condições ambientais e de transporte. De acordo com a origem, as alterações podem ser extrínsecas, ou seja, determinadas por fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos e vibração) ou intrínsecas, determinadas por fatores inerentes à formulação, principalmente por interação de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento. Incompatibilidade física e incompatibilidade química são exemplos de alterações intrínsecas (BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008).

Fatores extrínsecos

Os fatores extrínsecos (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos e vibração) influenciam a estabilidade de diferentes formas. O tempo é responsável pelo envelhecimento da formulação, podendo gerar alterações nas características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas. As temperaturas elevadas aceleram a taxa com que as modificações ocorrem como consequência da aceleração das reações físico-químicas e químicas que levam a alterações na viscosidade, cor, odor, aspecto e atividade de componentes do produto. Por outro lado, temperaturas baixas aceleram alterações físicas como turvação, precipitação e cristalização (BRASIL, 2004; BUTLER, 2000).

O oxigênio e a luz ultravioleta participam da geração de radicais livres e desencadeiam reações de óxido-redução, assim, produtos sensíveis à luz devem ser envasados em material de acondicionamento escuro ou opaco e devem receber a adição de substâncias antioxidantes a fim de retardar o processo oxidativo. A umidade é responsável por causar alterações físicas, principalmente, em produtos sólidos, modificando seu peso ou volume e tornando-o amolecido e pegajoso, também favorece a contaminação microbiológica. Os diversos materiais de acondicionamento de produtos cosméticos, tais como, vidro, plástico, papel e metal podem alterar a estabilidade da formulação, dessa forma, deve ser realizada a análise prévia da interação do material com a formulação a fim de determinar a melhor relação entre eles (BRASIL, 2004; VELASCO-DE-PAOLA, 2001).

Emulsões, géis, suspensões e soluções são os produtos cosméticos mais susceptíveis à contaminação microbiológica devido à presença de água nos mesmos. A conservação de tais formulações depende da adição de um sistema conservante adequado e validado e da

execução das Boas Práticas de Fabricação. A vibração que ocorre durante o transporte dos produtos pode provocar separação de fases de emulsões, compactação de suspensões, alteração da viscosidade, entre outros danos à formulação, assim, o controle desse fator minimiza seus efeitos (BRASIL, 2004; VELASCO-DE-PAOLA, 2001).

Fatores intrínsecos

Incompatibilidade física e química são as principais alterações determinadas por fatores intrínsecos, tais alterações nem sempre são visualizadas pelo consumidor. A primeira gera modificações no aspecto físico das formulações, como precipitação, separação de fases, cristalização, entre outras. Valor de pH inadequado, reações de óxido-redução, reações de hidrólise, interações entre ingredientes da formulação e entre os mesmos e o material de acondicionamento representam a incompatibilidade química. O valor de pH do produto deve atender a três aspectos, estabilidade dos ingredientes da formulação, eficácia e segurança do produto evitando, assim, alterações no mesmo. As reações de óxido-redução podem modificar as características organolépticas e físicas da formulação e alterar a atividade das suas substâncias ativas. As reações de hidrólise ocorrem, principalmente, em substâncias com função éster e amida e são favorecidas por teores elevados de água nas formulações. Além das reações de óxido-redução e de hidrólise, reações indesejáveis podem ocorrer entre os ingredientes da formulação, anulando ou alterando sua atividade. A interação entre os componentes do material de acondicionamento e os ingredientes da formulação pode gerar modificações em nível físico ou químico (BRASIL, 2004; VELASCO-DE-PAOLA, 2001).

2.1.3 TESTES DE ESTABILIDADE

O Guia de Estabilidade da COLIPA/CTFA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) recomenda que cada empresa possua um programa de testes de estabilidade capaz de atender de maneira eficiente às exigências de qualidade e segurança dos produtos cosméticos. Os programas são considerados válidos quando asseguram a estabilidade final do produto frente às seguintes categorias: integridade física dos produtos sob condições apropriadas de armazenamento, transporte e uso; estabilidade química; microbiológica e compatibilidade entre a formulação e o material de acondicionamento, ou quando são equivalentes às recomendações encontradas no Guia. No Brasil, as empresas do setor empregam referências sobre estudos de estabilidade utilizadas pela indústria farmacêutica devido à inexistência de normas específicas padronizadas para a indústria cosmética. As diretrizes da ANVISA estabelecidas no Guia de Estabilidade de Produtos

Cosméticos de 2004 auxiliam as empresas na realização dos testes de estabilidade, entretanto as características particulares de cada empresa podem exigir adaptações nas recomendações propostas (BRASIL, 2004; CTFA & COLIPA, 2004).

Qualquer teste de estabilidade tem por objetivo geral determinar a estabilidade do produto envasado e a compatibilidade entre a formulação e o material de acondicionamento. A escolha do programa destes testes deve considerar, além do objetivo geral, os objetivos específicos dos casos particulares. Se a amostra analisada for um produto novo, deve-se elaborar um programa completo com testes de estabilidade e compatibilidade. Quando se conhece a estabilidade da formulação e a compatibilidade da mesma com o material de acondicionamento e deseja-se estudar especificamente esta após alterações, tais como: modificação na mesma, no processo de fabricação e na especificação de uma matéria-prima; introdução de matéria-prima de outro fornecedor; troca do material de acondicionamento; e introdução de material de acondicionamento de outro fabricante, pode-se elaborar um programa simplificado e de menor tempo que o programa elaborado para o produto novo (BUTLER, 2000).

Os testes de estabilidade devem ser realizados sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade do produto no menor tempo possível. Assim, devem-se armazenar as amostras em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade do produto. Entende-se por prazo de validade, o tempo em que o produto mantém suas propriedades, quando conservado na embalagem original e sem avarias, em condições adequadas de armazenamento e utilização. Normalmente, as condições de armazenagem utilizadas nos testes de estabilidade são temperaturas baixa, ambiente e alta, umidade elevada, exposição à luz, ciclos de congelamento e descongelamento e vibração (BRASIL 2004; BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

As amostras submetidas à condição de temperatura ambiente são armazenadas à temperatura ambiente monitorada. As amostras submetidas à temperatura baixa, normalmente, são armazenadas em geladeira na temperatura de $5,0 \pm 2,0$ °C ou no *freezer* nas temperaturas de $-5,0 \pm 2,0$ °C ou $-10,0 \pm 2,0$ °C. As condições de temperatura elevada envolvem o armazenamento das amostras em estufas que podem apresentar as seguintes temperaturas: $37,0 \pm 2,0$ °C, $40,0 \pm 2,0$ °C; $45,0 \pm 2,0$ °C, $50,0 \pm 2,0$ °C. O aumento da temperatura acelera a taxa de modificações do produto, normalmente um aumento de 10 °C dobra a velocidade das reações. Um produto instável em temperaturas muito elevadas, pode não ser instável em condições normais do mercado, portanto, deve-se ter cautela na análise dos resultados (BRASIL, 2004; BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

A submissão de amostras às condições de umidade elevada faz parte de alguns testes de estabilidade que visam avaliar a proteção do material de acondicionamento em relação a este parâmetro. A umidade pode gerar diversos efeitos negativos sobre determinados produtos. Assim, se o material de acondicionamento não for capaz de deter a umidade ambiente, a mesma provocará alterações no produto, afetando sua estabilidade. A umidade elevada acelera o ingresso de água na formulação quando o material de acondicionamento não promove proteção adequada. A avaliação da perda de água ou de outros componentes voláteis da formulação por meio deste teste não é eficiente, já que, sob umidade elevada, ocorre diminuição da velocidade de perda de voláteis (BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

A exposição à luz pode alterar a cor e o odor dos produtos e degradar ingredientes dos mesmos. O desenvolvimento da aceleração dos efeitos da luz sobre o produto em laboratório e a avaliação da duração e da intensidade da exposição a qual os mesmos são submetidos no mercado não é tarefa fácil. Atualmente, os testes de estabilidade utilizam luz solar captados de vitrines especiais para este fim ou lâmpadas que apresentem espectro de emissão semelhante ao solar como as lâmpadas de xenônio (BRASIL, 2004; BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

As amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento são armazenadas em temperaturas alternadas por intervalos regulares de tempo. Esse teste provoca estresse mais severo nas formulações do que os testes realizados em condições constantes. O Guia de Estabilidade da ANVISA sugere as seguintes condições para sua realização: ciclos de 24 horas à temperatura ambiente e 24 horas a $-5,0 \pm 2,0$ °C; ciclos de 24 horas a $40,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas a $4,0 \pm 2,0$ °C; ciclos de 24 horas a $45,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas a $-5,0 \pm 2,0$ °C e ciclos de 24 horas a $50,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas a $-5,0 \pm 2,0$ °C (BRASIL, 2004; BUTLER, 2000).

Os testes mecânicos envolvendo vibração tornam-se necessários para avaliação da estabilidade de emulsões e para determinar se produtos em pó ou granulosos são passíveis de ter separação (*demixing*). Os testes são realizados por um período de horas em equipamentos vibratórios e são úteis na avaliação do comportamento das preparações em pós ou granulosas durante o transporte e armazenamento (BUTLER, 2000; CANNELL, 1985).

De maneira geral, quatro tipos de alterações podem ocorrer durante a realização dos testes de estabilidade: alterações físicas, químicas, microbiológicas e relacionadas ao material de acondicionamento. Na primeira categoria, podem-se citar modificações na viscosidade, textura, cor, odor e pH, perda de componentes voláteis e absorção de água, oxigênio e dióxido de carbono. As alterações químicas envolvem a degradação de constituintes ativos, interação entre ingredientes da formulação e perda dos mesmos por sorção (absorção e adsorção) do

material de acondicionamento. Em relação às alterações microbiológicas, pode ocorrer perda da eficácia do sistema conservante e contaminação microbiana. Corrosão e fissuração sob tensão (*stress cracking*) podem ocorrer no material de acondicionamento (BUTLER, 2000).

2.1.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, os principais tipos de estudos de estabilidade são: Estabilidade Acelerada, Normal e de Longa duração ou Teste de Prateleira. Antes de iniciar qualquer estudo de estabilidade, deve-se centrifugar uma amostra do produto a 3000 rpm durante 30 minutos, se a amostra não apresentar sinais de instabilidade, pode-se prosseguir com os estudos. A sequência sugerida de estudos acelerados, normais e de prateleira tem por objetivo avaliar a formulação em etapas buscando informações sobre sua estabilidade (BRASIL, 2004).

Alguns autores consideram a avaliação prévia das formulações envolvendo dois testes, o da Centrifugação e do Estresse Térmico, como Estudo de Estabilidade Preliminar. O primeiro teste é realizado à temperatura ambiente com velocidade de rotação de 10.000 rpm por 10 minutos; 3.000 rpm por 30 minutos; ou com velocidades de 1.000, 2.500 e 3.500 rpm por 15 minutos cada. O segundo envolve o banho termostatzado, sendo realizado sob condições controladas e com elevação gradativa da temperatura inicial do teste. Normalmente, abrange o intervalo controlado de 40,0 a 80,0 °C com progressão de elevação de 5,0 a 10,0 °C/30 minutos, sendo a avaliação realizada após retorno das amostras à temperatura ambiente. As formulações que não apresentam modificações como separação de fases e formação de precipitado, após os testes, são submetidas aos demais estudos de estabilidade (BABY, 2005; BABY et al., 2007; VELASCO et al., 2008).

2.1.4.1 ESTABILIDADE ACELERADA

Esse estudo é, também, conhecido como Teste de Triagem, Estabilidade Preliminar ou de Curto Prazo. É realizado na fase de desenvolvimento das formulações, normalmente com formulações de bancada, não tem a finalidade de estimar a vida útil das formulações, mas sim auxiliar e orientar a escolha entre as mesmas. O Estudo de Estabilidade Acelerada consiste em submeter as amostras às condições extremas de temperatura, acelerando possíveis reações entre seus componentes para posterior observação de sinais de instabilidade, visualizados por meio de ensaios relacionados a vários parâmetros escolhidos de acordo com a forma cosmética estudada. Esse estudo, normalmente, tem duração de 15 dias e as amostras são submetidas ao aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e

aquecimento, conforme as sugestões descritas no **Quadro 1** (BONTORIM, 2009; BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008).

Quadro 1 – Temperaturas extremas adotadas em Estudo de Estabilidade Preliminar (BRASIL, 2004).

Sugestões de valores adotados para as condições do estudo		
<i>Temperaturas elevadas</i>	<i>Temperaturas baixas</i>	<i>Ciclos de congelamento e descongelamento</i>
Estufa: $37,0 \pm 2,0$ °C	Geladeira: $5,0 \pm 2,0$ °C	Ciclos de 24 horas a $40,0 \pm 2,0$ °C, e 24 horas a $4,0 \pm 2,0$ °C por 4 semanas
Estufa: $40,0 \pm 2,0$ °C	Freezer: $-5,0 \pm 2,0$ °C	Ciclos de 24 horas a $45,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas a $-5,0 \pm 2,0$ °C por 12 dias
Estufa: $45,0 \pm 2,0$ °C	Freezer: $-10,0 \pm 2,0$ °C	Ciclos de 24 horas a $50,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas a $-5,0 \pm 2,0$ °C por 12 dias
Estufa: $50,0 \pm 2,0$ °C		

A primeira avaliação das amostras é realizada no tempo 0 (T_0), data da manipulação ou produção das mesmas, e as demais avaliações devem ser realizadas diariamente até o final do estudo. Os parâmetros avaliados são definidos pelo formulador, de acordo com as características das amostras e dos componentes utilizados no preparo das mesmas e, normalmente, utilizam-se parâmetros relacionados com características organolépticas (aspecto, cor, odor e sabor quando aplicável) e físico-químicas (valor de pH, viscosidade, densidade, entre outros). Os resultados obtidos nas avaliações devem ser expressos como média aritmética dos valores das análises realizadas em triplicata (BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008).

2.1.4.2 ESTABILIDADE NORMAL

A Estabilidade Normal, também, é conhecida por Estabilidade Acelerada ou Exploratória, é realizada durante o desenvolvimento das formulações, podendo ser utilizada para avaliar lotes de bancada e até lotes piloto de fábrica. Fornece dados para prever a estabilidade do produto, o tempo de vida útil e a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. É realizada em condições menos extremas que a Estabilidade Acelerada, porém em intervalo de tempo maior, serve como auxiliar para a determinação da estabilidade do produto e para estimar o prazo de validade do mesmo. Pode ser empregada quando houver mudanças na composição da formulação ou no processo de fabricação e para validar

fabricações terceirizadas e o uso de novos equipamentos (BABY, 2005; BABY et al., 2007; BONTORIM, 2009; BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008; VELASCO et al., 2008).

Este estudo apresenta, normalmente, duração de 90 dias, entretanto, em casos específicos, pode-se estender o estudo por 6 meses ou até um ano. As amostras são submetidas ao aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores, exposição à radiação luminosa e às condições ambientais. Posteriormente, são analisadas em relação aos vários parâmetros determinados em função da forma cosmética avaliada. O **Quadro 2** apresenta sugestões das condições de realização do estudo. A avaliação das amostras ocorre, geralmente, no tempo inicial 0 (T_0), após 24-48 horas da manipulação ou elaboração da formulação e nos tempos correspondentes ao 3°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90° dias, sendo a escolha dos períodos realizada de acordo com o desenho do experimento. Essa periodicidade pode variar conforme experiência técnica, especificações do produto, características especiais de algum componente da formulação ou sistema conservante utilizado. No caso de estudo estendido, após a realização das análises iniciais citadas anteriormente correspondentes aos 90 dias de estudo, recomenda-se que a avaliação seja realizada uma vez por mês até seu término (BABY, 2005; BABY et al., 2007; BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008; VELASCO et al., 2008).

Assim como na Estabilidade Acelerada, os parâmetros avaliados são definidos pelo formulador de acordo com as características das amostras e dos componentes utilizados no preparo das mesmas. São analisados parâmetros relacionados com características organolépticas (aspecto, cor, odor e sabor quando aplicável), físico-químicas (valor de pH, viscosidade, densidade, entre outros) e microbiológicas (estudo do sistema conservante do produto realizado por meio do Teste de Desafio efetuado antes e ou após o período de estudo normal) (BRASIL, 2004).

Quadro 2 – Condições adotadas em estudo de Estabilidade Normal (BRASIL, 2004).

Sugestões de condições adotadas para realização do estudo		
<i>Temperaturas elevadas</i>	<i>Temperaturas baixas</i>	<i>Exposição à radiação luminosa</i>
Estufa: $37,0 \pm 2,0$ °C	Geladeira: $5,0 \pm 2,0$ °C	Luz solar captada por vitrines especiais para este fim
Estufa: $40,0 \pm 2,0$ °C	Freezer: $-5,0 \pm 2,0$ °C	Lâmpadas de espectro de emissão semelhante ao do sol: lâmpadas de xenônio
Estufa: $45,0 \pm 2,0$ °C	Freezer: $-10,0 \pm 2,0$ °C	Fontes de luz ultravioleta
Estufa: $50,0 \pm 2,0$ °C

2.1.4.3 ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO OU TESTE DE PRATELEIRA

O Teste de Prateleira, também, conhecido por Estabilidade de Longa Duração ou *Shelf Life*, tem por objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimado no estudo de Estabilidade Normal. As amostras, devidamente acondicionadas em embalagens adequadas, são mantidas à temperatura ambiente e analisadas periodicamente até o término do prazo de validade. A frequência das análises é determinada em função do produto, do número de lotes produzidos e do prazo de validade estimado. Esse estudo avalia o comportamento do produto em condições normais de armazenamento e é realizado no período de tempo equivalente ao prazo de validade estimado pelos estudos de estabilidade prévios (BONTORIM, 2009; BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008).

Da mesma maneira que os demais estudos de estabilidade, os parâmetros avaliados são definidos de acordo com as características das amostras e dos componentes utilizados no preparo das mesmas. Deve-se armazenar um número de amostras suficiente para realização de todos os testes que serão executados durante o estudo (BRASIL, 2004).

Após a realização dos estudos de estabilidade, recomenda-se a elaboração de um relatório final no qual constem as seguintes informações:

- Identificação do produto;
- Material de acondicionamento utilizado no teste;
- Condições do estudo (condições de armazenamento das amostras, período de tempo do teste e periodicidade das avaliações);
- Resultados (tabelas e gráficos com as condições de armazenamento, tempo e periodicidade das análises);
- Conclusão (avaliar os resultados obtidos, relatar a aprovação ou não dos produtos nas condições do teste e estimar o prazo de validade);
- Assinatura do responsável pelo estudo (BRASIL, 2004).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a estabilidade organoléptica, físico-química e química de seis extratos glicólicos de uso cosmético (chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã), não padronizados e disponíveis no mercado brasileiro, por meio de parâmetros estabelecidos de acordo com a natureza dos mesmos, em diferentes condições de temperatura e luminosidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos / Acessórios

- Balança analítica *Sartorius* (BL - 210S) – Sartorius;
- Balanças semi-analíticas *Mettler* (P - 120) – Mettler – e *Scientech* (SA210) – Quimis;
- Banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner*[®] - Unique – Modelo 1600A;
- Câmera digital PowerShot A470 Canon – 7.1 Megapixels;
- Cronômetro Starflex C510;
- Destilador de água (106) – Fabbe;
- Espectrofotômetro UV-1203 UV/Vis Shimadzu, com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm - Beckman Coulter;
- Estufa, com graduação de temperatura de 0 a 100 °C Fabbe;
- Micropipeta 50 a 200 µL – Labsystems – e micropipeta 5 a 50µL;
- Peagômetro *Digimed* (DM 20) – Digimed;
- Pipeta plástica de Pasteur descartável;
- Refrigerador (Ecoplus 370) Bosch;
- Viscosímetro de Ostwald modificado (Cannon-Fenske n° 300)

4.1.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes possuíam grau de pureza analítico (PA)

- Ácido acético glacial (Synth) – LabSynth;
- Água destilada;
- Álcool etílico 95% (Synth) – LabSynth;
- Álcool metílico 95% PA-ACS (Synth) – LabSynth;
- Carbonato de sódio – Merck;
- Cloreto de alumínio – Vetec;
- Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) – Aldrich Co;
- Reagente de Folin-Ciocalteu – Merck;
- Solução tampão pH 4 (3,95 - 4,05) – Synth;
- Solução tampão pH 7 (6,95 - 7,05) – Synth

4.1.3 Substâncias químicas de referência

- Ácido gálico padrão de referência secundário, teor de pureza 97% – Merck;
- Quercetina padrão de referência secundário, teor de pureza 96% (NF XI) Sigma Chemical;
- Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), padrão de referência secundário, teor de pureza 97% - Aldrich Co

4.1.4 Matérias-primas

- Extratos comerciais glicólicos não padronizados, fornecidos pela indústria brasileira A. Optou-se por não revelar o nome da empresa visando evitar *marketing* da mesma nesse estudo acadêmico:

- Chá verde (*C. sinensis*), INCI: *Camellia sinensis leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;

- Erva-mate (*I. paraguariensis*), INCI: *Ilex paraguariensis leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha

- Ginko (*G. biloba*), INCI: *Ginkgo biloba leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;

- Menta (*M. piperita*), INCI: *Mentha piperita leaf extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;

- Própolis, INCI: *Propolis extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Substância resinosa;

- Romã (*P. granatum*), INCI: *Punica granatum fruit extract*;

Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto

4. 2 Métodos

4.2.1 Estudo da estabilidade dos extratos glicólicos

Os extratos glicólicos de chá verde (*C. sinensis*), erva-mate (*I. paraguariensis*), ginko (*G. biloba*), menta (*M. piperita*), própolis e romã (*P. granatum*) foram submetidos a um estudo de estabilidade elaborado de acordo com recomendações nacionais e internacionais presentes nos Guias de estabilidade de cosméticos da COLIPA e da ANVISA. Embora sejam direcionados para a indústria de cosméticos, esses Guias não apresentam um modelo de estudo específico para matérias-primas. Diante do exposto, também foram utilizadas informações contidas na Resolução RDC nº 249, de 13 de setembro de 2005, que determina o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas de

Fabricação de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos, para a definição do estudo de estabilidade dos extratos glicólicos. Essa resolução, direcionada à indústria farmacêutica, determina a implantação de um programa documentado para monitorar as características da estabilidade de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos, com a indicação dos métodos analíticos empregados (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; CTFA & COLIPA, 2004).

O estudo de estabilidade desenvolvido, representado na **Tabela 1**, considerou as características individuais dos extratos glicólicos e as informações das três fontes citadas anteriormente. O protocolo adotado empregou métodos analíticos e contemplou avaliações físicas, físico-químicas e químicas. As amostras dos extratos glicólicos contendo cerca de 50 mL foram acondicionadas em embalagens opacas de polietileno com boa vedação, semelhantes às de comercialização, e submetidas, em duplicata, a quatro diferentes condições de armazenamento: estufa a $45,0 \pm 2,0$ °C; geladeira a $5,0 \pm 2,0$ °C; temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0$ °C) protegida da incidência de luz; temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0$ °C) exposta à incidência de luz solar indireta. Os parâmetros escolhidos para as análises periódicas envolveram a avaliação das características organolépticas e a determinação do potencial hidrogeniônico (pH), da viscosidade dinâmica, da densidade absoluta, do teor de flavonoides totais, do teor de polifenóis totais e da atividade antioxidante. O estudo foi realizado durante 3 meses e as amostras analisadas nos seguintes tempos: t_0 (tempo inicial do estudo correspondente à data do armazenamento das amostras), t_1 (após 7 dias de armazenamento), t_2 , t_3 , t_4 , t_5 e t_6 após, respectivamente, 15, 30, 45, 60 e 90 dias.

4.2.2 Avaliação das características organolépticas

Nesse estudo, avaliaram-se parâmetros de aspecto, cor e odor e as análises foram realizadas comparando as amostras submetidas ao estudo de estabilidade com uma amostra de referência estabelecida para cada extrato glicólico avaliado. As amostras de referência corresponderam às amostras dos extratos glicólicos expostas à temperatura ambiente controlada ($23,0 \pm 2,0$ °C) e a escolha dessa condição visou à reprodução das condições de estocagem as quais os extratos são expostos no mercado. Além da exposição à temperatura ambiente, as amostras de referência foram estocadas hermeticamente fechadas, ao abrigo da luz solar direta e do calor, segundo recomendações do fornecedor. O objetivo principal da avaliação das características organolépticas foi verificar possíveis alterações físicas nas amostras, tais como: turvação, precipitação, modificação da coloração e alteração do odor (BRASIL, 2004).

Tabela 1 - Protocolo do Estudo de Estabilidade Normal dos extratos glicólicos de uso cosmético

ESTUDO DE ESTABILIDADE NORMAL			
Extratos glicólicos	Condições de armazenamento	Parâmetros avaliados	Periodicidade das análises (dia)
Chá verde (<i>C. sinensis</i>)	Estufa a 45,0 ± 2,0 °C	Características organolépticas	t ₀ (0)
Erva-mate (<i>I. paraguayensis</i>)	Geladeira a 5,0 ± 2,0 °C	Determinação do pH	t ₁ (7)
Ginco (<i>G. biloba</i>)	Temperatura ambiente (23,0 ± 2,0 °C) protegida da incidência de luz	Viscosidade dinâmica	t ₂ (15)
Menta (<i>M. piperita</i>)	Temperatura ambiente (23,0 ± 2,0 °C) exposta à luz solar indireta	Densidade absoluta	t ₃ (30)
Própolis		Teor de flavonóides totais	t ₄ (45)
Romã (<i>P. granatum</i>)		Teor de polifenóis totais	t ₅ (60)
		Atividade antioxidante	t ₆ (90)

As avaliações do aspecto e da cor dos extratos foram realizadas por meio da observação direta de 10 mL de cada amostra dispostos em tubos de ensaio devidamente limpos e secos. As amostras foram comparadas visualmente com as amostras de referência correspondentes, igualmente transferidas para tubos de ensaio e a ocorrência de modificações macroscópicas indicava possíveis sinais de instabilidade. As avaliações ao longo do estudo de estabilidade foram realizadas, em capela de exaustão, sempre no mesmo período do dia e sob iluminação constante. Em relação ao aspecto, as amostras foram julgadas de acordo com os critérios estabelecidos nos seguintes grupos: normal sem alterações; levemente precipitada; separada ou turva e separada, precipitada e turva.

De maneira semelhante, estabeleceram-se quatro grupos para classificação das amostras em relação à coloração: normal sem alterações; levemente modificada, modificada e intensamente modificada. Os mesmos critérios estabelecidos nesses grupos foram utilizados na avaliação do odor, porém nesse parâmetro adicionou-se mais um grupo correspondente às amostras com redução da intensidade do odor. Assim como a avaliação do aspecto e cor, o teste do odor foi realizado por meio da análise comparativa com as amostras de referência definidas anteriormente, diretamente por meio do olfato. A **Tabela 2** sintetiza os critérios de avaliação dos parâmetros organolépticos estabelecidos para os extratos glicólicos. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo analista, a fim de minimizar erros de análise. As amostras analisadas no t_7 , após 90 dias de estudo, e as amostras de referência correspondentes foram fotografadas, em tubos de ensaio, sob iluminação da capela de exaustão por câmera digital PowerShot A470 Canon (7.1 Megapixels) (BRASIL, 2004).

Tabela 2 – Critérios para avaliação dos extratos glicólicos em relação aos parâmetros organolépticos

Parâmetro		
<i>Cor</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Odor</i>
Amostra		
(N) Normal sem alterações	(N) Normal sem alterações	(N) Normal sem alterações
(L) Levemente modificada	(LP) Levemente precipitada, separada ou turva	(L) Levemente modificada
(M) Modificada	(P) Precipitada, separada e turva	(M) Modificada
(F) Fortemente modificada		(F) Fortemente modificada
		(R) Com redução da intensidade

4.2.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A determinação do valor do pH faz parte de um conjunto de análises físico-químicas usadas nos estudos de estabilidade para detectar futuros problemas que possam afetar a estabilidade e a qualidade dos extratos glicólicos. As amostras foram analisadas à temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0$ °C) em réplicas de quatro para cada condição e tempo de análise. A média dos valores obtidos foi utilizada na comparação entre as condições e os tempos do estudo de estabilidade. Os ensaios de determinação do potencial hidrogeniônico foram realizados em peagômetro *Digimed* (DM 20) previamente calibrado com soluções tampão comerciais de pH 4,0 e 7,0.

Determinou-se um volume fixo de 30 mL para a realização dos ensaios. Cada amostra de extrato glicólico foi transferida cuidadosamente para béqueres de 50 mL e mantida à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, iniciou-se a análise com a introdução do eletrodo de vidro na amostra, de maneira que a parte inferior do mesmo fosse totalmente coberta pelo líquido. O eletrodo permaneceu em contato com o líquido por um período mínimo de 2 minutos ou até a estabilização do valor de pH indicado no visor digital do equipamento (GAMA; AFONSO, 2007).

4.2.4 Determinação da viscosidade dinâmica

A escolha da metodologia adequada para a determinação da viscosidade dos extratos glicólicos foi baseada nas recomendações do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Segundo este, diferentes tipos de viscosímetro podem ser utilizados na análise de produtos cosméticos, os viscosímetros rotativos, de orifício e capilar são os mais frequentemente utilizados. O tipo ideal de viscosímetro deve ser escolhido de acordo com as características físicas do material analisado. Líquidos transparentes de baixa viscosidade podem ser analisados por viscosímetros queda de bola ou viscosímetros capilares (BRASIL, 2007). Assim, determinou-se a viscosidade dos extratos glicólicos por viscosímetro capilar (Cannon-Fenske nº 300) indicado na **Figura 3**.

A determinação da viscosidade dinâmica por viscosímetro capilar baseou-se na medição do tempo de escoamento da amostra comparado com o tempo de escoamento da água destilada. Os ensaios foram realizados, em réplicas de quatro, para cada condição e tempo de análise. O viscosímetro de Ostwald modificado (Cannon-Fensk) foi colocado em um banho de água termostatizado com controle de temperatura (25 °C). Fixou-se um volume de análise constante para todas as amostras, capaz de manter o nível da amostra sempre dentro do depósito inferior (C) indicado na **Figura 3**. As amostras foram transferidas

cuidadosamente para o viscosímetro pela abertura de diâmetro maior correspondente ao depósito (C), após a estabilização do sistema, aspirou-se a amostra, com o auxílio de um pipetador, até a marca superior do menisco do viscosímetro indicada na **Figura 3** pela letra A. O tempo de escoamento das amostras entre os meniscos (A) e (B) representados na **Figura 3** foi medido com o auxílio de um cronômetro. O mesmo procedimento adotado para determinação do tempo de escoamento das amostras foi utilizado na avaliação do comportamento da água destilada utilizada como líquido de referência (ALMEIDA et al, 1995; BRASIL, 2007).

Figura 3 – Viscosímetro de Ostwald modificado (Cannon-Fenske nº 300) utilizado no ensaio. Os pontos A e B indicam o intervalo de escoamento utilizado na análise e o C o depósito do líquido analisado

O cálculo da viscosidade dinâmica dos extratos glicólicos foi realizado por meio da **Equação 1** e o resultado expresso em centipoise (cP) (FRANCHETTI; MARCONATO, 2010).

$$\eta_1 = \frac{\eta_2 \times \rho_1 \times t_1}{\rho_2 \times t_2}$$

Equação 1 – Cálculo da viscosidade dinâmica por viscosímetro capilar, onde: η_1 representa a viscosidade dinâmica da amostra à 25 °C, η_2 representa a viscosidade dinâmica da água destilada à 25 °C, ρ_1 representa a massa específica da amostra à 25 °C, ρ_2 representa a massa específica da água destilada à 25 °C, t_1 é o tempo de escoamento da amostra (seg.) e t_2 é o tempo de escoamento da água destilada.

O valor final da viscosidade dinâmica das amostras foi resultado da média dos valores de quatro determinações para cada condição e tempo do estudo de estabilidade.

4.2.5 Determinação da densidade absoluta

Da mesma maneira que os ensaios de viscosidade dinâmica, as análises para determinação da densidade absoluta foram baseadas nas recomendações do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2007).

Os ensaios foram realizados com auxílio de balança analítica, em sala com controle de temperatura. Separou-se um balão volumétrico novo de 25 mL exclusivamente para as análises de determinação da densidade absoluta. Após lavagem e secagem, o mesmo foi pesado em balança analítica em réplicas de quatro. Transferiu-se, cuidadosamente, a amostra para o balão volumétrico evitando a formação de bolhas no processo. O volume do balão foi completado com a amostra até o menisco do mesmo, com o auxílio de uma pipeta plástica de Pasteur descartável. O exterior do balão foi seco com papel toalha absorvente antes da pesagem em balança analítica. Esse processo foi realizado em réplicas de quatro para cada condição e tempo do estudo de estabilidade. Após a primeira análise das réplicas, o balão foi lavado e cuidadosamente seco à temperatura ambiente antes de se iniciar novamente o processo de determinação da densidade absoluta.

O cálculo da densidade absoluta foi realizado com o auxílio da **Equação 2**:

$$D = \frac{M_{Bf} - M_{Bi}}{V}$$

Equação 2 – Cálculo de densidade absoluta (g/mL); onde **D** = densidade absoluta; **M_{Bf}** = massa conjunta do balão com a amostra (grama); **M_{Bi}** = massa do balão (grama) vazio e **V** = volume do balão (mL)

A massa da amostra calculada pela diferença entre a massa do balão contendo a amostra e a massa do balão vazio foi dividida pelo volume do balão obtendo-se, assim, a densidade absoluta expressa em grama por mililitro (g/mL). O valor final usado foi representado pela média das réplicas das análises (BRASIL, 2007).

4.2.6 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais das amostras foi escolhido como um dos parâmetros para a análise da estabilidade química dos extratos glicólicos. Esta avaliação fez parte de um conjunto de análises químicas que incluíam a determinação do teor de polifenóis totais e a determinação da atividade antioxidante dos extratos glicólicos. Esses três parâmetros foram escolhidos devido à importância cosmética dos mesmos, sabe-se que a adição de extratos vegetais às formulações cosméticas tem por objetivo explorar possíveis atividades clínicas

atribuídas a eles, como: atividade anti-inflamatória, antienvelhecimento e antioxidante; despigmentação cutânea; coadjuvante na fotoproteção; e estimulante do crescimento capilar, entre outros. Essas atividades, normalmente, ocorrem devido à presença dos metabólitos secundários nas plantas representados, entre outras classes, pelos compostos fenólicos, dos quais os flavonoides fazem parte. Assim, justifica-se a escolha dos três parâmetros de avaliação da estabilidade química dos extratos glicólicos (SIMÕES et al., 2007; DAL'BELO, 2008).

O teor de flavonoides totais foi quantificado por metodologia Farmacopéica baseada na complexação dos mesmos com cloreto de alumínio. As amostras foram diluídas em solução metanólica 5% v/v de ácido acético glacial em proporções adequadas para a realização do teste, sendo que o valor da diluição foi considerado no cálculo final do teor de flavonoides totais. Transferiram-se exatamente 10,0 mL de cada amostra de extrato diluída adequadamente para balões de 25,0 mL e adicionaram-se exatamente 2,0 mL de solução metanólica 2% p/v de cloreto de alumínio. Completou-se o volume dos balões com solução metanólica 5% v/v de ácido acético glacial. Após 30 minutos de repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), procedeu-se com as leituras espectrofotométricas a 425 nm. O branco utilizado no sistema foi preparado da mesma maneira e com os mesmos reagentes, porém sem adição das amostras. As análises foram realizadas em duplicata para cada condição e tempo do estudo de estabilidade e o teor de flavonoides totais foi obtido por meio da equação da reta da curva analítica do flavonoide quercetina padrão de referência secundário e expresso em Equivalentes de Quercetina (EQ) (BANOV, 2002; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010 a; STAHL & SCHILD 1981).

4.2.7 Determinação do teor de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada empregando a metodologia do reagente de Folin-Ciocalteu. As amostras dos extratos glicólicos foram diluídas em água destilada e em proporções adequadas, que foram consideradas no cálculo final do teor de polifenóis. Transferiram-se exatamente 0,1 mL de cada amostra diluída para balão de 10,0 mL e adicionaram-se exatos 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Em seguida, 6,0 mL de água destilada foram adicionados ao balão e, após um minuto, exatamente 2,0 mL de solução 15 % p/v de carbonato de sódio também foram adicionados. O volume do balão foi completado com água destilada e, após 2 horas de repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), procedeu-se com as leituras espectrofotométricas a 750 nm. O branco utilizado no sistema foi preparado da mesma maneira e com os mesmos reagentes, porém sem adição das amostras. As análises

foram realizadas em duplicata para cada condição e tempo do estudo de estabilidade e o teor de polifenóis totais obtido por meio da equação da reta da curva analítica do ácido gálico padrão de referência secundário e expresso em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010 b; SINGLETON et al., 1999).

4.2.8 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A atividade antioxidante dos extratos glicólicos foi determinada empregando metodologia que avalia a atividade sequestradora do radical DPPH por ação de substâncias antioxidantes ou espécies radicalares. As amostras foram diluídas em álcool etílico em proporções adequadas, que foram consideradas no cálculo final da determinação da atividade antioxidante. Transferiram-se, exatamente, 0,5 mL de cada amostra diluída para tubos de ensaio e adicionaram-se exatos 2,5 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 100 μ M, os mesmos foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C) e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Preparou-se um controle constituído por exatos 0,5 mL de álcool etílico P.A e 2,5 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 100 μ M sob as mesmas condições anteriores. Após os 30 minutos, procedeu-se com as leituras espectrofotométricas a 517 nm das amostras e do controle utilizando álcool etílico P.A como branco de leitura. A absorbância do controle foi utilizada no cálculo de porcentagem de inibição do radical DPPH pelas amostras. As análises foram realizadas em duplicata para cada condição e tempo do estudo de estabilidade e a atividade antioxidante calculada por meio da equação da reta da curva analítica de Trolox[®] padrão de referência secundário (porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* concentração) e expressa em TEAC, Atividade Antioxidante em Trolox[®] Equivalente (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SANCHEZ-MORENO et al., 1998; WANG et al., 2008).

4.2.9 Análise estatística dos ensaios realizados

A análise estatística dos resultados obtidos em cada ensaio citado anteriormente foi realizada no Excel 2000 e no programa STATISTICA Release 7.0. Os valores de média, desvio padrão, análise de variância (ANOVA *one-way*) e, quando apropriado, o teste de Tukey foram as ferramentas utilizadas para determinação de diferenças estatisticamente significativas entre os tempos do estudo de estabilidade, considerando $n = 4$ e $p \leq 0,05$ para as análises de pH, viscosidade dinâmica e densidade absoluta e $n = 2$ e $p \leq 0,05$ para as análises de teor de flavonoides total, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos glicólicos foram analisados individualmente em relação à estabilidade física, físico-química e química. Os critérios de aprovação dos mesmos foram baseados no Guia de Estabilidade de Cosméticos da ANVISA. Em relação à estabilidade física, adotou-se como critério de aprovação, a manutenção da integridade do extrato em todas as condições por todo o teste (pequenas alterações em temperatura elevadas foram aceitáveis) e a manutenção da cor e do odor por, no mínimo, 15 dias à luz solar (BRASIL, 2004).

Em relação à estabilidade físico-química e química, não existem recomendações específicas no Guia de Estabilidade de Cosméticos para a aprovação dos produtos. Existe apenas uma orientação para os ensaios de viscosidade, recomendando a definição dos limites de aceitação, pelo formulador, baseada na percepção visual e sensorial decorridas de alterações. Os limites de aceitação dos parâmetros avaliados nos estudos de estabilidade físico-química e química foram definidos baseados em especificações de checagem (*check specification*) e não de liberação (*release specification*) (**Figura 2**), pois as matérias-primas avaliadas estavam disponíveis no mercado. Adotou-se como critério de aprovação o intervalo de $\pm 10,0 \%$, sendo que os valores obtidos em temperaturas elevadas foram, cuidadosamente, estudados, pois, muitas vezes, o comportamento gerado nessas condições não se reproduz na temperatura ambiente. Assim, pequenas alterações fora do intervalo de aprovação estipulado que ocorreram em temperaturas elevadas foram aceitáveis (BRASIL, 2004; BUTLER, 2000).

5.1 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de chá verde (*C. sinensis*)

Os resultados do estudo de estabilidade física, físico-química e química do extrato de chá verde estão representados nas **Tabelas 3, 4, 5 e 6**. As duas primeiras tabelas representam o estudo da estabilidade física do extrato e as demais correspondem à estabilidade físico-química e química do mesmo, respectivamente. A **Tabela 4** confronta a coloração final das amostras, após 90 dias, com a coloração da amostra de referência. As outras tabelas apresentam os resultados dos ensaios realizados, tratados estatisticamente no *software* STATISTICA Release 7.0 para verificar possíveis diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de análise de cada condição e parâmetro avaliados. Esse tratamento estatístico foi utilizado na construção dos gráficos representados nas **Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9**, que demonstram, respectivamente, o comportamento estatístico, ao longo do tempo, do valor de pH, densidade absoluta, viscosidade dinâmica, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 4**, que o aspecto do extrato de chá verde permaneceu inalterado durante o estudo em todas as condições. Observaram-se mudanças de coloração e odor após 30 e 90 dias, respectivamente, na condição estufa (**Tabela 3**). A intensidade do odor foi reduzida e a coloração tornou-se mais intensa. O valor de pH do extrato de chá verde armazenado na condição estufa apresentou variação negativa de 10,2 % após 90 dias de estudo. As condições temperatura ambiente protegida da exposição solar e temperatura ambiente exposta à luz solar apresentaram variação negativa de 2,6 % após 90 dias de estudo. A condição geladeira não apresentou diferenças entre os valores de pH do tempo inicial (t_0) e do tempo final (t_6), após 90 dias de armazenamento, embora oscilação de 3,7 % tenha ocorrido após 45 dias de estudo (**Figura 4**). Esses resultados sugerem que o extrato de chá verde deve ser armazenado em temperaturas baixas (5 °C) visando evitar alterações no valor de pH. As **Figuras 5 e 6** demonstraram que a densidade absoluta e a viscosidade dinâmica permaneceram constantes em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições, evidenciando que a temperatura e a luz solar não exerceram influência nesses parâmetros.

A **Figura 7** indicou que o teor de flavonoides totais, expresso em equivalentes de quercetina, permaneceu constante, nas condições temperatura ambiente e geladeira, durante todo o estudo. A condição estufa apresentou, ao final de 90 dias de armazenamento, aumento de 20,0 % no teor de flavonoides totais. Declínio de 20,0 % no teor de flavonoides foi observado nas amostras armazenadas à temperatura ambiente com exposição à luz solar. Esses resultados indicaram que temperaturas elevadas e exposição à luz podem comprometer a estabilidade química do extrato glicólico de chá verde, assim a conservação do mesmo em temperaturas baixas e ao abrigo da luz torna-se necessária.

O teor de polifenóis totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (**Figura 8**), apresentou oscilações em todas as condições, durante o estudo. Após 90 dias de estudo, observou-se aumento de 16,1, 14,6 e 19,3 % no teor de polifenóis totais das amostras armazenadas em temperatura ambiente com e sem exposição solar e em geladeira, respectivamente. O teor de polifenóis totais da amostra armazenada em estufa apresentou declínio de 15,4 %, após 90 dias de armazenamento. Os resultados obtidos sugerem que a condição estufa é a mais prejudicial para o extrato de chá verde, pois favorece o declínio do teor de polifenóis totais.

Os resultados da atividade antioxidante, expressa em Trolox[®] equivalente (**Figura 9**), demonstraram que, após 7 dias de estudo, as amostras armazenadas em temperatura ambiente com e sem exposição solar e em estufa apresentaram declínio no valor inicial da atividade

antioxidante com subsequente estabilidade até o final do estudo. O declínio inicial dessas amostras corresponderam, respectivamente, a 20,6, 29,2 e 28,2 %. A amostra armazenada em geladeira permaneceu estável durante todo o estudo, indicando que essa condição é mais favorável à manutenção da atividade antioxidante do extrato de chá verde. Os resultados obtidos nos ensaios de determinação da atividade antioxidante e de quantificação de flavonoides e polifenóis totais indicaram que as amostras de extratos de chá verde apresentaram variações ao longo do estudo de estabilidade superiores ao intervalo de $\pm 10,0$ %, principalmente quando armazenadas em estufa. As amostras armazenadas em geladeira apresentaram-se estáveis nos ensaios de flavonoides totais e atividade antioxidante. Assim, o armazenamento do extrato glicólico de chá verde em temperatura baixas (5 °C) favorece a manutenção da estabilidade do mesmo.

Wang e Helliwell, 2000, realizaram um estudo de estabilidade, durante 6 meses, com infusões de chá verde preparadas com etanol e água purificada, a 5, 25 e 40 °C. Os autores observaram, por cromatografia líquida de alta eficiência, que as catequinas (epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigallocatequina-3-galato (EGCG)) das amostras armazenadas a 40 °C sofreram epimerização progressiva ao longo do estudo de estabilidade gerando os epímeros catequina (C), galocatequina (GC), galato-3-catequina (CG) e galato-3-galocatequina (GCG), respectivamente. Os autores concluíram que a reação de epimerização é influenciada pela temperatura, já que as amostras armazenadas a 5 e 25 °C não sofreram epimerização ao longo do estudo de estabilidade. As catequinas em sinergismo com os demais constituintes do chá verde são responsáveis pelas propriedades antioxidante e anticarcinogênica do mesmo. Estudos envolvendo oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humana, ação redutora como antioxidante férrico (FRAP) e ensaios de radicais livres com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila foram realizados com os epímeros das catequinas citadas. Observou que o epímero galatocatequina (GC) foi menos potente que seu precursor e os demais epímeros apresentaram atividades semelhantes a seus precursores (SCHMITZ et al., 2005; WANG; HELLIWELL, 2000).

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade do extrato glicólico de chá verde indicaram que a amostra armazenada a 45 °C mostrou-se instável. Ao final do estudo, a coloração da amostra tornou-se mais intensa e o odor foi reduzido. O valor de pH, do teor de polifenóis totais e da atividade antioxidante apresentaram declínio de 10,2, 15,4 e 28,2 %, respectivamente, e o teor de flavonoides totais apresentou aumento de 20,0 %. De acordo com a pesquisa de Wang e Helliwell, é possível que a amostra do extrato estocada na estufa tenha sofrido epimerização, comprometendo sua estabilidade em relação à atividade antioxidante.

Tabela 3 - Estabilidade física do extrato glicólico de chá verde (*C. sinensis*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO											
tempo (dia)	ASPECTO				COR				ODOR		
	Condição de armazenamento										
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A. T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)		
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₁	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₃	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N
t ₄	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N
t ₅	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N
t ₆	N	N	N	N	M	N	N	N	R	N	N

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; (N): amostra normal sem alterações; (L): amostra levemente modificada; (M): amostra modificada; (R): amostra com redução da intensidade do odor

Tabela 4 - Análise visual da cor do extrato glicólico de chá verde (*C. sinensis*), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal

Condição de armazenamento					
Estufa (45,0 ± 2,0 °C)		Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)		T.A E.S. (23,0 ± 2,0 °C)	
Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₆: após 90 dias

Tabela 5 - Estabilidade físico-química do extrato glicólico de chá verde (*C. sinensis*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO											
tempo (dia)	<i>pH</i>			<i>Densidade absoluta</i> (g/mL)			<i>Viscosidade dinâmica</i> (cP)				
	Condição de armazenamento										
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A. T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)		
45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	5,39 ± 0,0 A	5,35 ± 0,0 A	5,41 ± 0,0 A	5,39 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,00 ± 0,0 A	2,69 ± 0,0 A	2,68 ± 0,0 A	2,68 ± 0,0 A
t ₁	5,17 ± 0,0 B	5,28 ± 0,0 C	5,37 ± 0,1 AE	5,25 ± 0,0 B	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,72 ± 0,6 A	2,70 ± 0,0 A
t ₂	5,26 ± 0,0 C	5,45 ± 0,0 D	5,48 ± 0,0 B	5,40 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,74 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A
t ₃	5,04 ± 0,0 D	5,37 ± 0,0 AB	5,34 ± 0,0 DE	5,30 ± 0,0 C	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,72 ± 0,5 A	2,76 ± 0,0 A	2,76 ± 0,0 A
t ₄	5,09 ± 0,0 E	5,55 ± 0,0 E	5,41 ± 0,0 A	5,38 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,74 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,70 ± 0,6 A
t ₅	4,84 ± 0,0 F	5,36 ± 0,0 AB	5,27 ± 0,0 C	5,23 ± 0,0 BD	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,69 ± 0,0 A	2,74 ± 0,5 A	2,69 ± 0,0 A
t ₆	4,85 ± 0,0 F	5,38 ± 0,0 AB	5,29 ± 0,0 CD	5,22 ± 0,0 D	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,69 ± 0,5 A	2,68 ± 0,6 A	2,70 ± 0,6 A

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 4 e p < 0,05).

Tabela 6 - Estabilidade química do extrato glicólico de chá verde (*C. sinensis*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
Teor de flavonóides (EQ) (mg/mL)					Teor de polifenóis (EAG) (mg/mL)					Atividade Antioxidante (TEAC) $\mu\text{molTE/mL}$		
Condição de armazenamento												
Tempo (dia)	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0
t ₀	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 A	1,33 $\pm$ 0,0 AB	1,33 $\pm$ 0,0 A	1,33 $\pm$ 0,0 AB	1,33 $\pm$ 0,0 AB	7,95 $\pm$ 0,2 A	7,95 $\pm$ 0,2 A	7,95 $\pm$ 0,2 A	7,95 $\pm$ 0,2 A
t ₁	0,05 $\pm$ 0,0 AB	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 A	1,21 $\pm$ 0,1 AC	1,14 $\pm$ 0,0 B	1,16 $\pm$ 0,0 A	1,17 $\pm$ 0,0 A	6,59 $\pm$ 0,2 B	6,42 $\pm$ 0,3 A	5,75 $\pm$ 0,3 AB	6,24 $\pm$ 0,5 B
t ₂	0,05 $\pm$ 0,0 ABC	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,05 $\pm$ 0,0 AB	1,47 $\pm$ 0,0 B	1,58 $\pm$ 0,1 C	1,66 $\pm$ 0,1 C	1,49 $\pm$ 0,0 BC	5,40 $\pm$ 0,1 C	5,80 $\pm$ 0,1 A	5,45 $\pm$ 1,1 B	5,60 $\pm$ 0,2 B
t ₃	0,05 $\pm$ 0,0 ABC	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 AB	1,10 $\pm$ 0,0 C	1,21 $\pm$ 0,0 AB	1,17 $\pm$ 0,0 A	1,11 $\pm$ 0,1 A	5,50 $\pm$ 0,4 BC	5,25 $\pm$ 0,1 A	5,18 $\pm$ 0,1 B	5,93 $\pm$ 1,0 B
t ₄	0,05 $\pm$ 0,0 ABC	0,04 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 AB	1,31 $\pm$ 0,0 AB	1,55 $\pm$ 0,0 C	1,61 $\pm$ 0,1 C	1,60 $\pm$ 0,0 C	5,15 $\pm$ 0,4 C	5,41 $\pm$ 0,3 A	5,24 $\pm$ 1,0 B	5,17 $\pm$ 0,3 B
t ₅	0,06 $\pm$ 0,0 BC	0,05 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 AB	1,09 $\pm$ 0,0 C	1,63 $\pm$ 0,0 C	1,51 $\pm$ 0,0 BC	1,67 $\pm$ 0,1 C	5,57 $\pm$ 0,5 BC	5,50 $\pm$ 1,8 A	6,17 $\pm$ 0,7 AB	6,31 $\pm$ 0,6 AB
t ₆	0,06 $\pm$ 0,0 C	0,04 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 A	0,04 $\pm$ 0,0 B	1,09 $\pm$ 0,1 C	1,55 $\pm$ 0,0 C	1,51 $\pm$ 0,0 BC	1,60 $\pm$ 0,0 C	5,71 $\pm$ 0,1 BC	6,15 $\pm$ 1,3 A	5,63 $\pm$ 0,6 B	5,73 $\pm$ 0,1 B

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; EQ: equivalentes em quercetina; EAG: equivalentes em ácido gálico; TEAC: atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 2 e p < 0,05).

Figura 4 – Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 5 – Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 6 – Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 7 – Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 8 – Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 9 – Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox[®] equivalente, do extrato glicólico de chá verde durante o Estudo de Estabilidade Normal

5.2 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de erva-mate (*I. paraguariensis*)

Os resultados do estudo de estabilidade física do extrato de erva-mate estão representados nas **Tabelas 7 e 8**. A **Tabela 8** confronta a coloração final das amostras, após 90 dias, com a coloração da amostra de referência. Os dados obtidos nos ensaios físico-químicos e químicos foram tratados estatisticamente no *software* STATISTICA Release 7.0 e estão representados, respectivamente, nas **Tabelas 9 e 10**. O tratamento estatístico realizado entre os tempos de análise de cada condição e parâmetro avaliados foi utilizado na construção dos gráficos representados nas **Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15** que demonstram, respectivamente, o comportamento estatístico, ao longo do tempo, do valor de pH, densidade absoluta, viscosidade dinâmica, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 8**, que o aspecto do extrato de erva-mate permaneceu inalterado durante o estudo em todas as condições. Observou-se que a amostra armazenada em estufa apresentou mudança de coloração com intensificação da mesma, após 60 dias de estudo (**Tabela 7**). A **Figura 10** indicou que o extrato de erva-mate sofreu pequenas alterações no valor de pH em todas as condições. Após 90 dias de estudo, as amostras armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente com e sem exposição à luz solar apresentaram, respectivamente, aumento de 3,2, 3,0 e 2,8 %, evidenciando comportamento semelhante entre essas três condições de armazenamento. A amostra armazenada em estufa apresentou declínio no valor de pH de 2,8 %, após 90 dias de estudo. A **Figura 11** demonstrou que a densidade absoluta permaneceu constante em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições. A viscosidade dinâmica da amostra armazenada em temperatura ambiente sem exposição solar apresentou aumento de 4,2 %, após 90 dias de estudo. As outras amostras mostraram-se estáveis em relação a esse parâmetro (**Figura 12**). Observou-se que as variações nos parâmetros físico-químicos encontraram-se dentro do intervalo de aprovação $\pm 10,0$ %.

A **Figura 13** indicou que o teor de flavonoides totais, expresso em equivalentes de quercetina, permaneceu constante, na condição temperatura ambiente com exposição solar, durante todo o estudo. A amostra armazenada em geladeira apresentou-se estável durante o estudo, porém, revelou um aumento de 17,4 %, após 30 dias de análise, retornando ao valor inicial na avaliação seguinte e permanecendo estável até o final do estudo. O mesmo comportamento foi observado na amostra armazenada em temperatura ambiente sem exposição solar, entretanto, a mesma apresentou além do aumento após 30 dias de estudo,

outro aumento semelhante, após 60 dias. A condição estufa apresentou oscilação, durante todo o estudo, no intervalo de 13,0 a 26,1% apresentando, após 90 dias, um aumento de 26,1% no teor de flavonoides totais. Esses resultados indicaram que temperaturas elevadas podem comprometer a estabilidade química do extrato glicólico de erva-mate.

O teor de polifenóis totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (**Figura 14**), apresentou-se estável durante todo o estudo em todas as condições, indicando que a temperatura de armazenamento não exerceu influência sobre esse parâmetro. Os resultados da atividade antioxidante, expressa em Trolox[®] equivalente (**Figura 15**), demonstraram que, após 7 dias de estudo, as amostras armazenadas em temperatura ambiente com e sem exposição solar e em geladeira apresentaram aumento de 2,1 a 12,9 % no valor inicial da atividade antioxidante com subsequente estabilidade até o final do estudo. A amostra armazenada em estufa sofreu oscilações no valor da atividade antioxidante até o 30º dia de estudo. Essas oscilações variaram de 7,8 a 17,5 %. Ao final do estudo, o valor da atividade antioxidante da amostra armazenada em estufa foi estatisticamente igual ao valor determinado no tempo inicial (t₀).

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação da atividade antioxidante e de quantificação de flavonoides totais indicaram que as amostras de extratos de erva-mate apresentaram variações ao longo do estudo de estabilidade superiores ao intervalo de $\pm 10,0$ %. Nesses dois ensaios, as amostras armazenadas em estufa apresentaram-se menos estáveis que as demais porque geraram oscilações ao longo de todo o estudo. Assim, sugere-se que o extrato de erva-mate deve ser armazenado em temperatura ambiente ou em geladeira (5 °C).

Ceni, 2005, avaliou a estabilidade do extrato bruto de folhas de erva-mate (*I. paraguariensis*) em relação à atividade enzimática do mesmo. As amostras do extrato foram estocadas nas seguintes temperaturas: -80, -4, 4, 20, 40, 60 e 80 °C. A autora avaliou a atividade de duas enzimas, a polifenoloxidase (PFO) e a peroxidase (POD). Essas enzimas estão associadas às alterações de cor, sabor e aroma das folhas de erva-mate. Elas são capazes de promover a oxidação de compostos fenólicos. Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciaram que a exposição a temperaturas moderadas e altas afetou a atividade das enzimas avaliadas, reduzindo-a (CENI, 2005; SANTOS, 2004).

A oxidação dos compostos fenólicos pode comprometer as atividades clínicas atribuídas à erva-mate. Sabe-se que o processamento da erva-mate utilizada como bebida (chimarrão) envolve tratamento com temperaturas elevadas entre 400 a 600 °C para promover a inativação das enzimas oxidases, esse processo é denominado sapeco mecânico (SANTOS, 2004). A produção do extrato de erva-mate para fins cosméticos deve considerar esse

processo de inativação das enzimas oxidase, já que as mesmas oxidam os compostos fenólicos. O preparo de extratos com folhas de erva-mate sem envolver etapa de aquecimento pode permitir a ação das enzimas oxidases sobre os compostos fenólicos. Nesse caso, de acordo com os resultados obtidos por Ceni, 2005, a diminuição da atividade das enzimas que comprometem o teor de polifenóis do extrato ocorreria com armazenamento do mesmo em temperaturas moderadas e altas. Entretanto, o armazenamento do extrato em temperaturas altas pode gerar reações indesejáveis, como degradação de componentes, alteração de cor e reações de escurecimento não enzimático (CENI, 2005; SANTOS, 2004).

O extrato comercial glicólico de erva-mate apresentou alteração de coloração na condição estufa (45 °C), após 60 dias de estudo e alterações no teor de flavonoides totais ao longo de 90 dias de estudo. A atividade antioxidante do mesmo também sofreu alterações até o 45º dia de análise, indicando a ocorrência de reações indesejáveis na temperatura de 45 °C.

Yatsu e colaboradores, 2011, avaliaram a estabilidade de extrato seco por aspersão de erva-mate (*I. paraguariensis*). Esse extrato foi obtido a partir de extrato aquoso preparado com decocção de folhas de erva-mate a 96 °C por 15 minutos. O extrato foi submetido a ensaios de estabilidade térmica e de fotoestabilidade. O primeiro ensaio envolveu armazenamento do extrato a 40 ± 2 °C por 4 meses e o segundo envolveu exposição do mesmo à radiação ultravioleta C por 48 horas. Os autores observaram que o extrato seco de erva-mate não apresentou alterações no teor de polifenóis, após 48 horas de exposição à radiação UVC (YATSU et al., 2011). A amostra do extrato comercial glicólico de erva-mate exposta à luz solar apresentou comportamento semelhante ao observado pelos autores. Os teores de polifenóis e flavonoides totais permaneceram constantes ao longo do estudo de estabilidade.

Em relação à estabilidade térmica, os autores observaram que a amostra armazenada em embalagem PET (polietileno tereftalato) apresentou mudança de coloração, a cor inicialmente amarela do extrato tornou-se marrom. Após 4 meses de análise, o teor de polifenóis do extrato sofreu decréscimo de 36,9 %. Os autores, também, observaram que o teor de ácido cripto-clorogênico apresentou aumento até o terceiro mês de estudo, com posterior declínio no quarto mês. Segundo os autores, a presença de água na amostra armazenada em embalagem PET (semi-permeável) teria contribuído com esse comportamento, já que a mesma facilitaria a ocorrência de reações enzimáticas aceleradas pelo efeito da temperatura. Os autores, também, sugerem que pode ter ocorrido interconversão entre o ácido cripto-clorogênico e seus isômeros (ácido clorogênico e neoclorogênico), já que sob condições aceleradas pode ocorrer interconversão de compostos polifenólicos (YATSU et

al., 2011). A amostra de extrato glicólico de erva-mate armazenada em estufa (45 °C) não apresentou variação no teor de polifenóis totais durante o estudo de estabilidade, entretanto, o teor de flavonoides totais e a atividade antioxidante da amostra apresentaram, respectivamente, aumento e oscilações ao longo do estudo. Sugere-se que esses eventos possam estar relacionados com reações enzimáticas aceleradas pela temperatura e por interconversão de compostos fenólicos.

Tabela 7 - Estabilidade física do extrato glicólico de erva-mate (*L. paraguariensis*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO											
tempo (dia)	ASPECTO				COR				ODOR		
	Condição de armazenamento										
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A. T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)		
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0 23,0 ± 2,0
t ₀	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N N
t ₁	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N N
t ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N N
t ₃	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N N
t ₄	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N N
t ₅	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N N
t ₆	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N N

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; T₁: após 7 dias; T₂: após 15 dias; T₃: após 30 dias; T₄: após 45 dias; T₅: após 60 dias e T₆: após 90 dias; (N): amostra normal sem alterações; (L): amostra levemente modificada

Tabela 8 - Análise visual do extrato glicólico de erva-mate (*I. paraguayensis*), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal

Condição de armazenamento					
Estufa (45,0 ± 2,0 °C)		Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)		T.A (23,0 ± 2,0 °C)	
Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₆: após 90 dias.

Tabela 9 - Estabilidade físico-química do extrato glicólico de erva-mate (*I. paraguariensis*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	pH			Densidade absoluta (g/mL)			Viscosidade dinâmica (cP)					
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)											
	(°C)											
45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	5,32 ± 0,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	5,32 ±0,0 A	5,32 ±0,0 A	5,32 ±0,0 A	5,32 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	2,95 ±0,5 A	2,95 ±0,5 A	2,83 ±0,6 A	2,88 ±0,5 A
t ₁	5,36 ±0,0 B	5,39 ±0,0 B	5,39 ±0,0 B	5,38 ±0,0 B	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	2,83 ±0,6 A	2,88 ±0,5 A
t ₂	5,31 ±0,0 A	5,38 ±0,0 B	5,41 ±0,0 B	5,39 ±0,0 B	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,03 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	2,95 ±0,0 B	3,02 ±0,5 B
t ₃	5,30 ±0,0 A	5,44 ±0,0 C	5,42 ±0,0 B	5,43 ±0,0 C	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	3,01 ±0,5 B	2,95 ±0,5 AB
t ₄	5,06 ±0,0 C	5,28 ±0,0 D	5,27 ±0,0 C	5,28 ±0,0 D	1,02 ±0,1 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,1 A	3,01 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	2,95 ±0,0 B	2,95 ±0,0 AB
t ₅	5,17 ±0,0 D	5,44 ±0,0 C	5,42 ±0,0 B	5,42 ±0,0 C	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,1 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,1 A	2,95 ±0,0 A	3,01 ±0,0 A	3,01 ±0,5 B	2,95 ±0,0 AB
t ₆	5,16 ±0,0 D	5,49 ±0,0 E	5,47 ±0,0 D	5,48 ±0,0 E	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	2,95 ±0,0 A	3,01 ±0,0 A	3,01 ±0,5 B	2,95 ±0,0 AB

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 4 e p < 0,05).

Tabela 10 - Estabilidade química do extrato glicólico de erva-mate (*I. paraguariensis*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO									
Teor de flavonóides (EQ) (mg/mL)				Teor de polifenóis (EAG) (mg/mL)				Atividade Antioxidante (TEAC) μmol TE/mL	
tempo (dia)	Condição de armazenamento								
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	0,23 ±0,0 A	0,23 ±0,0 A	0,23 ±0,0 A	0,23 ±0,0 A	7,29 ±0,5 A	7,29 ±0,5 A	7,29 ±0,5 A	7,29 ±0,5 A	37,1±0,2 A
t ₁	0,26 ±0,0 BC	0,24 ±0,0 AB	0,23 ±0,0 A	0,25 ±0,0 A	7,04 ±0,4 A	7,43 ±0,0 A	6,68 ±0,1 A	7,03 ±0,3 A	42,6±1,0 B
t ₂	0,26 ±0,0 B	0,26 ±0,0 BC	0,24 ±0,0 AB	0,25 ±0,0 A	7,89 ±0,1 A	7,65 ±0,1 A	7,80 ±0,0 A	7,35 ±0,1 A	44,2±0,8 AB
t ₃	0,28 ±0,0 CD	0,27 ±0,0 C	0,27 ±0,0 C	0,26 ±0,0 A	7,03 ±0,4 A	7,18 ±0,1 A	7,83 ±0,5 A	7,52 ±0,2 A	42,9±0,9 B
t ₄	0,27 ±0,0 BC	0,25 ±0,0 AB	0,24 ±0,0 AB	0,24 ±0,0 A	7,31 ±0,3 A	7,22 ±0,4 A	7,93 ±0,2 A	7,44 ±0,0 A	37,9±0,6 AB
t ₅	0,31 ±0,0 E	0,26 ±0,0 BC	0,26 ±0,0 BC	0,26 ±0,0 A	7,26 ±0,1 A	7,47 ±0,5 A	7,99 ±0,3 A	7,75 ±0,3 A	42,4±2,2 AB
t ₆	0,29 ±0,0 DE	0,24 ±0,0 AB	0,24 ±0,0 AB	0,26 ±0,0 A	6,74 ±0,2 A	7,91 ±0,1 A	7,80 ±0,7 A	7,49 ±0,1 A	42,8±2,8 B

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; EQ: equivalentes em quercetina; EAG: equivalentes em ácido gálico; TEAC: atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 2 e p < 0,05).

Figura 10 – Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 11 – Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 12 – Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 13 – Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 14 – Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 15 – Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox® equivalente, do extrato glicólico de erva-mate durante o Estudo de Estabilidade Normal

5.3 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de ginkgo (*G. biloba*)

Os resultados do estudo de estabilidade física do extrato de ginkgo estão representados nas **Tabelas 11 e 12**. A **Tabela 12** confronta a coloração final das amostras, após 90 dias, com a coloração da amostra de referência. Os dados obtidos nos ensaios físico-químicos e químicos foram tratados estatisticamente no *software* STATISTICA Release 7.0 e estão representados, respectivamente, nas **Tabelas 13 e 14**. O tratamento estatístico realizado entre os tempos de análise de cada condição e parâmetro avaliados foi utilizado na construção dos gráficos representados nas **Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21** que demonstram, respectivamente, o comportamento estatístico, ao longo do tempo, no valor de pH, densidade absoluta, viscosidade dinâmica, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 12**, que o aspecto do extrato de ginkgo permaneceu inalterado durante o estudo em todas as condições. Observou-se que a amostra armazenada em estufa apresentou mudança de coloração com intensificação da mesma, após 30 dias de estudo (**Tabela 11**). A **Figura 16** indicou que o extrato de ginkgo sofreu pequenas alterações no valor de pH em todas as condições, essas alterações corresponderam a variações de 1,6 a 3,8 %. Após 90 dias de estudo, todas as amostras apresentaram valor de pH superior ao valor inicial. Esse aumento no valor de pH não ultrapassou 3,8%. As **Figuras 17 e 18** demonstraram que a densidade absoluta e a viscosidade dinâmica permaneceram constantes em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições, evidenciando que a temperatura e a luz solar não exerceram influência sobre esses parâmetros.

A **Figura 19** indicou que o teor de flavonoides totais, expresso em equivalentes de quercetina, permaneceu constante, nas condições temperatura ambiente sem exposição solar e geladeira, durante todo o estudo. A amostra armazenada em temperatura ambiente com exposição solar apresentou declínio no teor de flavonoides totais de 9,0 %, após 45 dias de análise, e aumento de 18,1 %, após 90 dias de estudo. A amostra armazenada na estufa permaneceu estável durante 15 dias. Após esse período, apresentou oscilações crescentes no intervalo de 18,2 a 27,3 %, alcançando aumento de 27,3 % no teor de flavonoides totais, após 90 dias de estudo. Esses resultados indicaram que temperaturas elevadas e exposição solar podem comprometer a estabilidade química do extrato glicólico de ginkgo, assim, sugere-se que o mesmo seja armazenado em temperatura ambiente ou em geladeira (5 °C) protegido da incidência de luz solar para evitar instabilidade no teor de flavonoides totais.

O teor de polifenóis totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (**Figura 20**), apresentou oscilações em todas as condições, durante o estudo, no intervalo de 6,0 a 27,6 %.

Observou-se que a amostra armazenada em geladeira apresentou aumento de 13,8 % no teor de polifenóis totais, após 7 dias de estudo, permanecendo estável até o 60º dia. As amostras armazenadas em temperatura ambiente com e sem exposição solar apresentaram, respectivamente, aumento de 20,7 e 22,4 %, após 90 dias de estudo. A amostra armazenada em estufa apresentou aumento de 19,8 %, após 15 dias de estudo, retornando ao valor inicial em 30 dias e permanecendo constante até o final do estudo de estabilidade.

Os resultados da atividade antioxidante, expressos em Trolox[®] equivalente (**Figura 21**), indicaram que as amostras armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente com exposição solar apresentaram-se estáveis durante todo o estudo de estabilidade. A amostra estocada em temperatura ambiente sem exposição solar apresentou declínio de 11,3 %, após 45 dias de análise, e aumento de 5,3 % no final do estudo. A amostra armazenada em estufa apresentou, ao longo do estudo, declínios variando de 10,4 a 19,4 %. A análise conjunta dos três parâmetros de avaliação de estabilidade química, ou seja, teores de flavonoides e polifenóis totais e valor de atividade antioxidante, sugere que o extrato de ginkgo deve ser armazenado em geladeira (5 °C) protegido da incidência de luz solar.

Pesquisas envolvendo estudo de estabilidade de extrato de ginkgo são raras. Tommasi e colaboradores, 2006, avaliaram o efeito da temperatura sobre o metabolismo antioxidante de sementes de *G. biloba*. Os autores armazenaram sementes de *G. biloba* a 4 e 25 °C por um período de 12 meses. Análises de peroxidação lipídica foram realizadas a cada 3 meses. Os autores verificaram aumento da peroxidação lipídica nas amostras armazenadas a 4 e 25 °C, após 9 e 3 meses, respectivamente, indicando redução da ação de antioxidantes nas sementes (TOMMASI et al., 2006). Os resultados da atividade antioxidante do extrato comercial glicólico de *G. biloba* indicaram redução da mesma quando o extrato foi submetido ao armazenamento em estufa (45 °C).

Goh e Barlow, 2002, estudaram a ação da temperatura em nozes de *G. biloba*. Os autores submeteram amostras de nozes de *G. biloba* a processo de cozimento em água, em diferentes tempos que variaram de 5 a 240 minutos. Em seguida, foram preparados extratos a partir das nozes submetidas ao tratamento com calor, utilizando acetona e água. A determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos em cada tempo de submissão ao aquecimento indicou redução da atividade antioxidante ao longo do tempo. Os autores sugeriram que essa redução pode ter ocorrido devido à perda de vitamina C, que é instável em temperaturas elevadas (GOH; BARLOW, 2002). Esse resultado foi semelhante ao encontrado na amostra de extrato comercial glicólico de ginkgo armazenada em estufa (45 °C).

Tabela 11 - Estabilidade física do extrato glicólico de gínco (*G. biloba*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	ASPECTO				COR				ODOR			
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₁	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₃	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N
t ₄	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N
t ₅	N	N	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N
t ₆	N	N	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; (N): amostra normal sem alterações; (L): amostra levemente modificada; (M): amostra modificada;

Tabela 12 - Análise visual comparativa do extrato glicólico de ginko (*G. biloba*), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal

Condições de armazenamento					
Estufa (45,0 ± 2,0 °C)		Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)		T.A E.S. (23,0 ± 2,0 °C)	
Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₆: após 90 dias.

Tabela 13 - Estabilidade físico-química do extrato glicólico de ginko (*G. biloba*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	pH			Densidade absoluta (g/mL)			Viscosidade dinâmica (cP)					
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)											
	(°C)											
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	4,94 ±0,0 AB	4,94 ±0,0 A	4,94 ±0,0 A	4,94 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A
t ₁	4,92 ±0,0 A	4,95 ±0,0 AB	5,00 ±0,0 BC	4,97 ±0,0 AB	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	4,58 ±0,0 A	4,56 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,56 ±0,0 A
t ₂	4,96 ±0,0 BC	4,96 ±0,0 AB	4,95 ±0,0 AB	4,96 ±0,0 AB	1,03 ±0,0 A	1,03 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,03 ±0,0 A	4,56 ±0,6 A	4,56 ±0,6 A	4,52 ±0,0 A	4,56 ±0,6 A
t ₃	5,02 ±0,0 D	5,03 ±0,0 C	5,09 ±0,0 E	5,06 ±0,0 C	1,02 ±0,1 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,1 A	1,02 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,58 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A
t ₄	4,94 ±0,0 AB	4,97 ±0,0 B	5,03 ±0,0 CD	4,99 ±0,0 B	1,03 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,1 A	1,02 ±0,1 A	4,58 ±0,5 A	4,52 ±0,5 A	4,52 ±0,5 A	4,52 ±0,5 A
t ₅	4,98 ±0,0 C	5,03 ±0,0 C	5,04 ±0,0 D	5,04 ±0,0 C	1,02 ±0,1 A	1,03 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	4,56 ±0,0 A	4,58 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A
t ₆	5,09 ±0,0 E	5,13 ±0,0 D	5,00 ±0,0 BC	5,12 ±0,0 E	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	1,02 ±0,0 A	4,58 ±0,0 A	4,56 ±0,0 A	4,52 ±0,0 A	4,56 ±0,0 A

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 4 e p < 0,05).

Tabela 14 - Estabilidade química do extrato glicólico de ginko (*G. biloba*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO									
Teor de flavonóides (EQ) (mg/mL)				Teor de polifenóis (EAG) (mg/mL)				Atividade Antioxidante (TEAC) $\mu\text{molTE/mL}$	
tempo (dia)	Condição de armazenamento								
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	
	(°C)								
	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	
	(°C)								
t ₀	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 AB	1,16 $\pm$ 0,0 AB	1,16 $\pm$ 0,0 A	1,16 $\pm$ 0,0 A	1,16 $\pm$ 0,0 A	3,35 $\pm$ 0,1 A
t ₁	0,11 $\pm$ 0,0 AB	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,10 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 ABC	1,32 $\pm$ 0,0 BC	1,35 $\pm$ 0,0 BC	1,23 $\pm$ 0,1 AB	1,30 $\pm$ 0,1 AB	3,13 $\pm$ 0,0 ABD
t ₂	0,12 $\pm$ 0,0 BC	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,10 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 ABC	1,39 $\pm$ 0,1 C	1,42 $\pm$ 0,1 C	1,48 $\pm$ 0,1 B	1,48 $\pm$ 0,0 D	3,05 $\pm$ 0,1 AD
t ₃	0,12 $\pm$ 0,0 CD	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 ABC	1,12 $\pm$ 0,1 AB	1,32 $\pm$ 0,0 BC	1,29 $\pm$ 0,1 AB	1,43 $\pm$ 0,1 BC	3,53 $\pm$ 0,1 BC
t ₄	0,13 $\pm$ 0,0 D	0,10 $\pm$ 0,0 A	0,11 $\pm$ 0,0 A	0,10 $\pm$ 0,0 A	1,08 $\pm$ 0,0 A	1,38 $\pm$ 0,0 C	1,39 $\pm$ 0,0 AB	1,49 $\pm$ 0,0 D	2,97 $\pm$ 0,1 D
t ₅	0,14 $\pm$ 0,0 E	0,12 $\pm$ 0,0 A	0,12 $\pm$ 0,0 A	0,12 $\pm$ 0,0 BC	1,27 $\pm$ 0,1 ABC	1,43 $\pm$ 0,1 C	1,34 $\pm$ 0,1 AB	1,40 $\pm$ 0,1 BC	3,41 $\pm$ 0,2 ABC
t ₆	0,14 $\pm$ 0,0 E	0,13 $\pm$ 0,0 A	0,12 $\pm$ 0,0 A	0,13 $\pm$ 0,0 C	1,09 $\pm$ 0,0 A	1,25 $\pm$ 0,1 AB	1,42 $\pm$ 0,0 B	1,43 $\pm$ 0,0 BC	3,69 $\pm$ 0,0 C

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; EQ: equivalentes em quercetina; EAG: equivalentes em ácido gálico; TEAC: atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 2 e p< 0,05).

Figura 16 – Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 17 – Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 18 – Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 19 – Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 20 – Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 21 – Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox[®] equivalente, do extrato glicólico de ginkgo durante o Estudo de Estabilidade Normal

5.4 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de menta (*M. piperita*)

Os resultados do estudo de estabilidade física do extrato de menta estão representados nas **Tabelas 15 e 16**. A **Tabela 16** confronta a coloração final das amostras, após 90 dias, com a coloração da amostra de referência. Os dados obtidos nos ensaios físico-químicos e químicos foram tratados estatisticamente no *software* STATISTICA Release 7.0 e estão representados, respectivamente, nas **Tabelas 17 e 18**. O tratamento estatístico realizado entre os tempos de análise de cada condição e parâmetro avaliados foi utilizado na construção dos gráficos representados nas **Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27** que demonstram, respectivamente, o comportamento estatístico, ao longo do tempo, do valor de pH, densidade absoluta, viscosidade dinâmica, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 16**, que o aspecto do extrato de menta permaneceu inalterado durante o estudo em todas as condições. Observou-se que a amostra armazenada em estufa apresentou redução do odor, após 45 dias de estudo (**Tabela 15**). A **Figura 22** indicou que o extrato de menta sofreu pequenas alterações no valor de pH em todas as condições, essas alterações corresponderam a variações positivas de 0,5 a 6,3 % e variações negativas de 1,1 a 5,6 %. Após 90 dias de estudo, a amostra armazenada em geladeira apresentou aumento de 1,9 % no valor de pH e as demais amostras apresentaram redução no intervalo de 1,1 a 5,6%. As **Figuras 23 e 24** demonstraram que a densidade absoluta e a viscosidade dinâmica permaneceram constantes em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições, evidenciando que a temperatura e a luz solar não exerceram influência sobre esses parâmetros.

A **Figura 25** indicou que o teor de flavonoides totais, expresso em equivalentes de quercetina, permaneceu constante, em todas as condições, durante todo o estudo. O teor de polifenóis totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (**Figura 26**), apresentou oscilações em todas as condições, durante o estudo. Observou-se que a amostra armazenada em geladeira apresentou aumento de 8,1 % no teor de polifenóis totais, após 7 dias de estudo. Ao final do estudo de estabilidade, essa amostra apresentou 1,4 % de aumento em relação ao valor inicial do teor de polifenóis totais. As amostras armazenadas em temperatura ambiente com e sem exposição solar apresentaram, respectivamente, redução de 1,0 % e aumento de 5,6 % no valor inicial do teor de polifenóis totais, após 90 dias de estudo. A amostra armazenada em estufa apresentou oscilações durante todo o estudo, retornando ao valor inicial, após 90 dias de análise. Observou-se que todas as variações foram inferiores ao intervalo estipulado de $\pm$

10,0 %, exceto a variação de 11,6 % ocorrida na amostra armazenada em estufa, após 45 dias de análise.

Os resultados da atividade antioxidante, expressos em Trolox[®] equivalente (**Figura 27**), indicaram que as amostras armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente sem exposição solar apresentaram-se estáveis durante todo o estudo de estabilidade. A amostra estocada em temperatura ambiente com exposição solar apresentou declínio de 7,8 % no valor inicial da atividade antioxidante, após 90 dias de análise. Ao final do estudo, a amostra armazenada em estufa apresentou declínio de 25,8 % no valor inicial da atividade antioxidante. Esses resultados sugerem que o extrato comercial glicólico de menta deve ser armazenado em geladeira (5 °C) protegido da incidência de luz solar.

Arabshahi e colaboradores, 2007, estudaram a estabilidade de extrato seco de folhas de menta. As amostras do extrato foram aquecidas a 100 °C por 15 minutos para averiguar a ação do aquecimento sobre o extrato de menta. A atividade antioxidante do extrato foi mensurada antes e após o aquecimento. Os autores, também, avaliaram o comportamento do extrato de menta armazenado, no escuro, à temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (5 °C). Nesse ensaio, a atividade antioxidante foi determinada no momento do armazenamento e após 15 dias. Os autores observaram que o aquecimento a 100 °C provocou aumento de 15 % na atividade antioxidante do extrato de menta. Segundo os autores, a temperatura elevada pode ter melhorado a biodisponibilidade dos antioxidantes presentes no extrato de menta. Os resultados obtidos no ensaio do extrato comercial glicólico de menta indicaram redução da atividade antioxidante na amostra armazenada a 45 °C, que pode ter ocorrido devido à formação de compostos pró-oxidantes ou inativação de antioxidantes do extrato glicólico. Como os extratos são diferentes, seco e glicólico, o comportamento térmico dos mesmos pode variar. Além disso, os métodos empregados na determinação da atividade antioxidante foram distintos. Arabshahi e colaboradores, 2007, determinaram a atividade antioxidante de acordo com a quantidade de malonaldeído formado por oxidação do ácido linoléico. E os ensaios com o extrato comercial glicólico de menta envolveram o radical DPPH. A atividade antioxidante do extrato seco de menta armazenado a 25 °C e a 5 °C não apresentou variação, após 15 dias de análise. Esse resultado foi semelhante ao encontrado no estudo da estabilidade do extrato glicólico de menta (ARABSHAHI et al., 2007).

Materska, 2010, avaliou a estabilidade de extrato etanólico de menta e de suas três frações preparadas com água e com 40 e 70 % de metanol. As amostras foram armazenadas por 6 meses a 5 °C e o teor de polifenóis totais foi determinado no dia do armazenamento e após 3 e 6 meses. Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de menta apresentou

redução do teor de polifenóis totais, após 3 e 6 meses de estudo. Observou-se que, após 6 meses, o teor de polifenóis totais inicial foi reduzido a 50 %. A fração aquosa desse extrato apresentou comportamento distinto. O teor de polifenóis totais, após 3 meses de estudo, apresentou um pequeno decréscimo. Ao final do estudo, ou seja, após 6 meses, esse teor apresentou um aumento, tornando-se, praticamente, igual ao teor determinado no início do estudo. Comportamento semelhante foi observado na amostra de extrato comercial glicólico de menta armazenada em geladeira. Observaram-se oscilações no teor de polifenóis totais ao longo do estudo, entretanto, após 90 dias de análise, o teor de polifenóis totais foi, praticamente, igual ao teor determinado no primeiro dia do estudo (MATERSKA, 2010).

A fração obtida do extrato etanólico de menta com 40% de metanol apresentou discreto decréscimo no teor de polifenóis totais, após 6 meses de estudo. A fração do mesmo extrato obtida com 70 % de metanol apresentou-se estável durante o estudo de estabilidade. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que a estabilidade dos compostos fenólicos do extrato de menta pode variar de acordo com o solvente utilizado. Assim, o comportamento observado no extrato comercial glicólico de menta pode ser específico para o solvente utilizado no preparo do mesmo (MATERSKA, 2010).

Tabela 15 - Estabilidade física do extrato glicólico de menta (*M. piperita*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	ASPECTO				COR				ODOR			
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)								(°C)			
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₁	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₃	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₄	N	N	N	N	N	N	N	N	R	N	N	N
t ₅	N	N	N	N	N	N	N	N	R	N	N	N
t ₆	N	N	N	N	N	N	N	N	R	N	N	N

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; (N): amostra normal sem alterações (R): amostra com redução da intensidade do odor.

Tabela 16 - Análise visual do extrato glicólico de menta (*M. piperita*), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal

Condições de armazenamento					
Estufa (45,0 ± 2,0 °C)		Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)		T.A E.S. (23,0 ± 2,0 °C)	
Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₆: após 90 dias.

Tabela 17 - Estabilidade físico-química do extrato glicólico de menta (*M. piperita*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	pH			Densidade absoluta (g/mL)			Viscosidade dinâmica (cP)					
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)											
	(°C)											
45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	5,54 ± 0,0 A	5,55 ± 0,0 A	5,55 ± 0,0 A	5,54 ± 0,0 AB	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,71 ± 0,0 A	2,71 ± 0,0 A	2,71 ± 0,0 A	2,71 ± 0,0 A
t ₁	5,62 ± 0,0 B	5,69 ± 0,0 B	5,67 ± 0,0 D	5,64 ± 0,0 B	1,02 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,71 ± 0,5 A	2,71 ± 0,6 A	2,71 ± 0,6 A	2,71 ± 0,6 A
t ₂	5,42 ± 0,0 C	5,54 ± 0,0 A	5,52 ± 0,0 AB	5,53 ± 0,0 AB	1,02 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,02 ± 0,1 A	1,01 ± 0,0 A	2,73 ± 0,0 A	2,60 ± 0,5 A	2,70 ± 0,6 A	2,60 ± 0,5 A
t ₃	5,30 ± 0,0 D	5,48 ± 0,0 C	5,48 ± 0,0 C	5,45 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,02 ± 0,1 A	1,01 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,73 ± 0,0 A	2,73 ± 0,0 A	2,76 ± 0,0 A
t ₄	5,58 ± 0,0 E	5,89 ± 0,0 D	5,78 ± 0,0 E	5,81 ± 0,0 C	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,63 ± 0,6 A	2,76 ± 0,5 A	2,73 ± 0,6 A
t ₅	5,23 ± 0,0 F	5,57 ± 0,0 E	5,49 ± 0,0 BC	5,60 ± 0,1 B	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,60 ± 0,0 A	2,70 ± 0,0 A	2,60 ± 0,0 A
t ₆	5,23 ± 0,0 F	5,65 ± 0,0 F	5,48 ± 0,0 C	5,47 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,60 ± 0,6 A	2,71 ± 0,5 A	2,73 ± 0,0 A	2,71 ± 0,5 A

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 4 e p < 0,05).

Tabela 18 - Estabilidade química do extrato glicólico de menta (*M. piperita*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
Teor de flavonóides (EQ) (mg/mL)					Teor de polifenóis (EAG) (mg/mL)					Atividade Antioxidante (TEAC) $\mu\text{molTE/mL}$		
tempo (dia)	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0
	t ₀	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	2,83 $\pm$ 0,4 AB	2,83 $\pm$ 0,4 AB	2,83 $\pm$ 0,4 ABC	2,83 $\pm$ 0,4 A	10,3 $\pm$ 0,2 A	10,3 $\pm$ 0,2 A	10,3 $\pm$ 0,2 AB
t ₁	0,21 $\pm$ 0,0 A	0,20 $\pm$ 0,0 A	0,21 $\pm$ 0,0 A	0,21 $\pm$ 0,0 A	2,94 $\pm$ 0,0 A	3,06 $\pm$ 0,0 A	2,93 $\pm$ 0,0 A	2,97 $\pm$ 0,1 A	10,7 $\pm$ 1,6 A	11,3 $\pm$ 3,9 A	10,6 $\pm$ 0,6 A	10,4 $\pm$ 0,3 AB
t ₂	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	2,92 $\pm$ 0,1 BC	3,10 $\pm$ 0,0 AB	2,85 $\pm$ 0,1 A	2,95 $\pm$ 0,3 A	10,9 $\pm$ 0,7 A	11,5 $\pm$ 0,8 A	11,2 $\pm$ 0,4 A	11,1 $\pm$ 0,4 A
t ₃	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	0,23 $\pm$ 0,0 A	2,63 $\pm$ 0,2 AB	2,58 $\pm$ 0,0 A	2,64 $\pm$ 0,1 AB	2,98 $\pm$ 0,1 A	10,5 $\pm$ 0,2 A	11,0 $\pm$ 0,4 A	10,8 $\pm$ 1,4 A	10,4 $\pm$ 0,0 AB
t ₄	0,23 $\pm$ 0,0 A	0,21 $\pm$ 0,0 A	0,23 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,0 A	3,16 $\pm$ 0,1 C	3,02 $\pm$ 0,2 B	3,16 $\pm$ 0,1 BC	3,13 $\pm$ 0,0 B	10,2 $\pm$ 0,5 A	10,7 $\pm$ 0,0 A	10,3 $\pm$ 0,2 A	10,5 $\pm$ 0,1 AB
t ₅	0,23 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,1 A	0,23 $\pm$ 0,0 A	0,22 $\pm$ 0,1 A	2,68 $\pm$ 0,2 ABC	3,02 $\pm$ 0,0 B	3,13 $\pm$ 0,0 C	2,80 $\pm$ 0,2 AB	9,84 $\pm$ 0,2 AB	10,7 $\pm$ 1,1 A	10,6 $\pm$ 1,4 A	11,0 $\pm$ 0,6 A
t ₆	0,20 $\pm$ 0,0 A	0,20 $\pm$ 0,0 A	0,20 $\pm$ 0,0 A	0,21 $\pm$ 0,0 A	2,62 $\pm$ 0,1 AB	2,87 $\pm$ 0,1 AB	2,99 $\pm$ 0,3 BC	2,69 $\pm$ 0,0 AB	7,64 $\pm$ 0,1 B	9,94 $\pm$ 0,1 A	9,73 $\pm$ 0,2 A	9,49 $\pm$ 0,5 B

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; EQ: equivalentes em quercetina; EAG: equivalentes em ácido gálico; TEAC: atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 2 e p < 0,05).

Figura 22 – Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 23 – Comportamento estatístico da densidade absoluto extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 24 – Comportamento estatístico da viscosidade do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 25 – Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 26 – Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 27 – Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox[®] equivalente, do extrato glicólico de menta durante o Estudo de Estabilidade Normal

5.5 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de própolis

Os resultados do estudo de estabilidade física do extrato de própolis estão representados nas **Tabelas 19 e 20**. A **Tabela 20** confronta a coloração final das amostras, após 90 dias, com a coloração da amostra de referência. Os dados obtidos nos ensaios físico-químicos e químicos foram tratados estatisticamente no *software* STATISTICA Release 7.0 e estão representados, respectivamente, nas **Tabelas 21 e 22**. O tratamento estatístico realizado entre os tempos de análise de cada condição e parâmetro avaliados foi utilizado na construção dos gráficos representados nas **Figuras 28, 29, 30, 31, 32 e 33** que demonstram, respectivamente, o comportamento estatístico, ao longo do tempo, do valor de pH, densidade absoluta, viscosidade dinâmica, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 20**, que o aspecto do extrato de própolis permaneceu inalterado durante o estudo em todas as condições. Observou-se que a amostra armazenada em estufa apresentou mudança de coloração com intensificação da mesma, após 15 dias de estudo (**Tabela 19**). A **Figura 28** indicou que o extrato de própolis sofreu pequenas alterações no valor de pH em todas as condições. Após 90 dias de estudo, as amostras armazenadas em geladeira e em estufa apresentaram, respectivamente, aumento de 0,3 e 1,8 %. A amostra exposta à luz solar apresentou declínio de 0,3 % no valor de pH inicial, ao final do estudo. A amostra armazenada em temperatura ambiente apresentou oscilações ao longo do estudo, porém, após 90 dias de análise, seu valor de pH foi igual ao valor obtido no início do estudo. A **Figura 29** demonstrou que a densidade absoluta permaneceu constante em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições. A viscosidade dinâmica apresentou oscilações inferiores ao intervalo estipulado de $\pm 10,0$ % em todas as condições (**Figura 30**).

A **Figura 31** indicou que o teor de flavonoides totais, expresso em equivalentes de quercetina, permaneceu constante, na condição temperatura ambiente com exposição solar, durante todo o estudo. As amostras armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente sem exposição solar apresentaram, respectivamente, aumento de 17,6 e 11,7 % no teor inicial de flavonoides totais, após 15 dias. A análise seguinte demonstrou o retorno do teor de flavonoides totais ao valor inicial do estudo, esse valor permaneceu estável até o final do estudo de estabilidade. A amostra armazenada em estufa apresentou oscilações ao longo do estudo, alcançando, ao final do mesmo, aumento de 11,7 % no teor de flavonoides totais inicial. Esses resultados indicaram que a amostra de extrato glicólico de própolis armazenada em estufa sofreu maiores alterações, ao longo do estudo, do que as demais amostras.

O teor de polifenóis totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (**Figura 32**), das amostras armazenadas em geladeira, em temperatura ambiente sem exposição solar e em estufa apresentou, respectivamente, aumento de 11,1, 12,3 e 13,6 %, após 7 dias de estudo. Nas análises seguintes, esse teor retornou ao valor determinado no início do estudo, permanecendo constante até o final das avaliações. A amostra exposta à luz solar permaneceu constante durante todo o estudo. Os resultados da atividade antioxidante, expressos em Trolox[®] equivalente (**Figura 33**), permaneceram constantes em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições.

Lu e colaboradores, 2003, avaliaram a estabilidade térmica de extrato etanólico de própolis oriunda de Taiwan. Amostras do mesmo foram aquecidas a 50, 80 ou 100 °C por uma hora. Os autores avaliaram a atividade antioxidante e antibacteriana dessas amostras antes do aquecimento e após o mesmo. Os resultados obtidos demonstraram que a atividade antimicrobiana do extrato de própolis mostrou-se estável após o aquecimento do mesmo a diferentes temperaturas. Os resultados da atividade antioxidante determinada pelo ensaio de DPPH revelaram que as três amostras submetidas ao aquecimento de 50, 80 e 100 °C apresentaram redução estatisticamente igual no valor da atividade antioxidante (LU et al., 2003). A amostra de extrato comercial glicólico de própolis armazenada em estufa (45 °C) não apresentou redução no valor da atividade antioxidante ao longo do estudo de estabilidade, a mesma permaneceu estável durante os 90 dias de análise. A diferença observada entre os resultados das duas pesquisas pode ser atribuída a variações de composição química entre os dois extratos analisados. Sabe-se que a própolis pode apresentar composições químicas variadas de acordo com sua origem geográfica. O extrato de própolis analisado no estudo de Lu e colaboradores, 2008, era originário de Taiwan e o extrato comercial glicólico de própolis tem origem brasileira. Assim, possíveis composições químicas distintas entre os extratos podem ter determinado os comportamentos opostos observados nos ensaios de determinação da atividade antioxidante (LU et al., 2003).

Marquele-Oliveira e colaboradores, 2007, avaliaram a estabilidade de extratos alcoólico e glicólico de própolis de origem brasileira. A atividade antioxidante das amostras dos extratos armazenadas em temperatura ambiente e a 40 °C foram analisadas periodicamente durante 360 dias. Os autores observaram que ambos os extratos apresentaram estabilidade em relação à atividade antioxidante durante o período de estudo, nas duas condições avaliadas. O mesmo comportamento foi observado no presente estudo, as amostras do extrato comercial glicólico de própolis armazenadas em temperatura ambiente e em estufa (40 °C) mostram-se estáveis ao longo de 90 dias (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2007).

Tabela 19 - Estabilidade física do extrato glicólico de própolis submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	ASPECTO				COR				ODOR			
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₁	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₂	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N
t ₃	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N
t ₄	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N
t ₅	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N
t ₆	N	N	N	N	L	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; (N): amostra normal sem alterações; (L): amostra levemente modificada.

Tabela 20 - Análise visual do extrato glicólico de própolis, após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal

Condições de armazenamento					
Estufa (45,0 ± 2,0 °C)		Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)		T.A E.S. (23,0 ± 2,0 °C)	
Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₆: após 90 dias.

Tabela 21 - Estabilidade físico-química do extrato glicólico de própolis submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	pH			Densidade absoluta (g/mL)				Viscosidade dinâmica (cP)				
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	5,45 ±0,0 AB	5,45 ±0,0 A	5,45 ±0,0 A	5,45 ±0,0 AB	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	3,54 ±0,5 A	3,54 ±0,5 A	3,54 ±0,5 A	3,54 ±0,5 A
t ₁	5,54 ±0,0 F	5,57 ±0,0 C	5,55 ±0,0 AB	5,51 ±0,0 C	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	3,69 ±0,0 BC	3,59 ±0,5 AB	3,68 ±0,0 AB	3,69 ±0,0 AB
t ₂	5,29 ±0,0 D	5,25 ±0,0 D	5,92 ±0,5 B	5,30 ±0,0 D	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,92 ±0,1 A	3,62 ±0,6 B	3,51 ±0,5 A	3,68 ±0,0 AB	3,76 ±0,0 B
t ₃	5,42 ±0,0 E	5,45 ±0,0 A	5,47 ±0,0 A	5,45 ±0,0 AB	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	3,76 ±0,5 C	3,68 ±0,0 B	3,76 ±0,5 B	3,69 ±0,0 AB
t ₄	5,45 ±0,0 A	5,52 ±0,0 BC	5,51 ±0,0 AB	5,47 ±0,0 B	0,93 ±0,0 A	0,92 ±0,0 A	0,92 ±0,1 A	0,92 ±0,0 A	3,69 ±0,0 BC	3,59 ±0,5 AB	3,76 ±0,5 B	3,69 ±0,0 AB
t ₅	5,47 ±0,0 BC	5,49 ±0,0 AB	5,50 ±0,0 AB	5,51 ±0,0 C	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	3,69 ±0,0 BC	3,69 ±0,0 B	3,76 ±0,0 B	3,76 ±0,5 B
t ₆	5,47 ±0,0 C	5,55 ±0,0 BC	5,30 ±0,0 A	5,43 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	0,93 ±0,0 A	3,69 ±0,0 BC	3,59 ±0,0 AB	3,76 ±0,5 B	3,76 ±0,0 B

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 4 e p < 0,05).

Tabela 22 - Estabilidade química do extrato glicólico de própolis submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
Teor de flavonóides (EQ) (mg/mL)				Teor de polifenóis (EAG) (mg/mL)				Atividade Antioxidante (TEAC) $\mu\text{molTE/mL}$				
tempo (dia)	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0
	t ₀	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,81 $\pm$ 0,0 AB	0,81 $\pm$ 0,0 ABC	0,81 $\pm$ 0,0 AB	0,81 $\pm$ 0,0 A	3,62 $\pm$ 0,0 A	3,62 $\pm$ 0,0 A	3,62 $\pm$ 0,0 A
t ₁	0,19 $\pm$ 0,0 B	0,18 $\pm$ 0,0 AB	0,18 $\pm$ 0,0 AB	0,19 $\pm$ 0,0 A	0,92 $\pm$ 0,0 B	0,93 $\pm$ 0,0 C	0,91 $\pm$ 0,1 BC	0,94 $\pm$ 0,0 A	3,55 $\pm$ 0,0 A	3,72 $\pm$ 0,0 A	3,57 $\pm$ 0,0 A	
t ₂	0,20 $\pm$ 0,0 C	0,20 $\pm$ 0,0 B	0,19 $\pm$ 0,0 B	0,20 $\pm$ 0,0 A	0,72 $\pm$ 0,0 A	0,90 $\pm$ 0,1 BC	0,94 $\pm$ 0,0 C	0,93 $\pm$ 0,1 A	3,72 $\pm$ 0,4 A	3,97 $\pm$ 0,2 A	3,42 $\pm$ 0,1 A	
t ₃	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,17 $\pm$ 0,0 AB	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,79 $\pm$ 0,1 AB	0,79 $\pm$ 0,1 AB	0,79 $\pm$ 0,0 AB	0,79 $\pm$ 0,0 A	3,34 $\pm$ 0,3 A	3,25 $\pm$ 0,4 A	3,35 $\pm$ 0,0 A	
t ₄	0,18 $\pm$ 0,0 AB	0,18 $\pm$ 0,0 AB	0,18 $\pm$ 0,0 AB	0,18 $\pm$ 0,0 A	0,79 $\pm$ 0,0 AB	0,74 $\pm$ 0,0 A	0,71 $\pm$ 0,0 A	0,71 $\pm$ 0,1 A	3,66 $\pm$ 0,1 A	3,32 $\pm$ 0,1 A	3,38 $\pm$ 0,2 A	
t ₅	0,19 $\pm$ 0,0 BC	0,17 $\pm$ 0,0 AB	0,18 $\pm$ 0,0 AB	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,80 $\pm$ 0,1 AB	0,78 $\pm$ 0,0 AB	0,74 $\pm$ 0,1 A	0,77 $\pm$ 0,0 A	3,29 $\pm$ 0,2 A	3,56 $\pm$ 0,3 A	3,59 $\pm$ 0,0 A	
t ₆	0,18 $\pm$ 0,0 B	0,17 $\pm$ 0,0 AB	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,17 $\pm$ 0,0 A	0,80 $\pm$ 0,1 AB	0,78 $\pm$ 0,0 AB	0,74 $\pm$ 0,0 A	0,77 $\pm$ 0,1 A	3,41 $\pm$ 0,1 A	3,57 $\pm$ 0,3 A	3,32 $\pm$ 0,3 A	
												3,63 $\pm$ 0,1 A

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; EQ: equivalentes em quercetina; EAG: equivalentes em ácido gálico; TEAC: atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 2 e p < 0,05).

Figura 28 – Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 29 – Comportamento estatístico da densidade absoluta do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 30 – Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 31 – Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 32 – Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 33 – Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox[®] equivalente, do extrato glicólico de própolis durante o Estudo de Estabilidade Normal

5.6 Estudo de Estabilidade do extrato glicólico de romã (*P. granatum*)

Os resultados do estudo de estabilidade física do extrato de romã estão representados nas **Tabelas 23 e 24**. A **Tabela 24** confronta a coloração final das amostras, após 90 dias, com a coloração da amostra de referência. Os dados obtidos nos ensaios físico-químicos e químicos foram tratados estatisticamente no *software* STATISTICA Release 7.0 e estão representados, respectivamente, nas **Tabelas 25 e 26**. O tratamento estatístico realizado entre os tempos de análise de cada condição e parâmetro avaliados foi utilizado na construção dos gráficos representados nas **Figuras 34, 35, 36, 37, 38 e 39** que demonstram, respectivamente, o comportamento estatístico, ao longo do tempo, do valor de pH, densidade absoluta, viscosidade dinâmica, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Verificou-se, de acordo com a **Tabela 24**, que o aspecto do extrato de romã permaneceu inalterado durante o estudo em todas as condições. Observou-se que a amostra armazenada em estufa apresentou mudança de coloração com intensificação da mesma, após 60 dias de estudo. Redução do odor, também, foi observada, após 60 dias nas condições estufa e geladeira (**Tabela 23**). A **Figura 34** indicou que o extrato de romã sofreu alterações no valor de pH inferiores ao intervalo estipulado de $\pm 10,0$ %, em todas as condições do estudo. Após 90 dias de estudo, as amostras armazenadas em geladeira, em temperatura ambiente com e sem exposição à luz solar e em estufa apresentaram, respectivamente, declínio de 2,0; 2,0; 1,5 e 7,5 % no valor de pH inicial, evidenciando que a variação da amostra armazenada em estufa foi superior às demais. As **Figuras 35 e 36** demonstraram que a densidade absoluta e a viscosidade dinâmica permaneceram constantes em todo o estudo de estabilidade e em todas as condições, evidenciando que a temperatura e a luz solar não exerceram influência nesses parâmetros.

A **Figura 37** indicou que o teor de flavonoides totais, expresso em equivalentes de quercetina, permaneceu, praticamente, constante em todas as condições, durante todo o estudo. A amostra armazenada em geladeira apresentou um declínio de 7,4 %, após 15 dias de análise, retornando, em seguida, ao valor inicial e permanecendo constante até o final do estudo.

O teor de polifenóis totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (**Figura 38**), apresentou-se, praticamente, estável durante todo o estudo, em todas as condições. Houve apenas um declínio, após 60 dias de análise, de 9,6 e 8,1% no teor das amostras armazenadas em temperatura ambiente com e sem exposição solar, respectivamente. Ao final do estudo, essas amostras retornaram ao valor inicial do teor de polifenóis totais. Os resultados da

atividade antioxidante, expressos em Trolox[®] equivalente (**Figura 39**), demonstraram oscilações em todas as condições ao longo do estudo, exceto na condição estufa que permaneceu constante. Após 90 dias de estudo, as amostras armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente com exposição solar apresentaram, respectivamente, declínio de 3,9 e 3,6 % no valor da atividade antioxidante inicial. A amostra estocada em temperatura ambiente sem exposição apresentou oscilações ao longo do tempo, entretanto, ao final do estudo o valor da atividade antioxidante foi igual ao valor determinado no início do estudo. Os resultados obtidos revelaram que a temperatura elevada (45 °C) não afetou a estabilidade do extrato comercial glicólico de romã.

Pedriali e colaboradores, 2010, avaliaram a fotoestabilidade de extrato hidroalcoólico de semente de romã ao longo de três meses de estudo. Os autores realizaram uma análise comparativa entre amostras do extrato armazenadas a temperatura ambiente, protegidas ou não da incidência de luz. Determinação da atividade antioxidante e do teor de polifenóis totais foram os parâmetros utilizados na avaliação do extrato. Os resultados obtidos demonstraram que, após 3 meses, a amostra de extrato exposta a incidência de luz apresentou redução de 9,8 % no teor de polifenóis totais em relação à amostra protegida da incidência de luz. O mesmo comportamento foi observado na atividade antioxidante, entretanto, a redução na atividade antioxidante da amostra exposta à luz correspondeu a 79 %. O extrato comercial glicólico de romã exposto à luz solar apresentou redução de 9,6 % no teor de polifenóis totais inicial, após 60 dias de estudo. Entretanto, observou-se que, após 90 dias de estudo, o teor de polifenóis da amostra retornou ao valor determinado no início do estudo de estabilidade. A atividade antioxidante dessa amostra apresentou declínio de 3,6 %, após 90 dias de análise. Essa redução foi inferior à observada pelos autores do trabalho citado (PEDRIALI et al., 2010).

Panichayupakaranant e colaboradores, 2010, realizaram um estudo de estabilidade com extrato seco de romã, rico em ácido elágico. Os autores determinaram o teor de ácido elágico periodicamente, durante 4 meses, em amostras armazenadas a 4, 30 e 45 °C, protegidas ou não da incidência de luz. O teor de ácido elágico permaneceu constante em todas as condições de armazenamento, durante todo o estudo. Adicionalmente, os autores avaliaram o teor de ácido elágico desse extrato dissolvido em tampão fosfato com diferentes pH. O estudo de estabilidade envolveu o armazenamento das amostras a 30 °C com proteção da incidência de luz, por 4 meses. Ao final do estudo, verificou-se considerável redução no teor do ácido elágico, em todas as amostras analisadas. Os autores acreditam que a instabilidade do ácido elágico em solução ocorre devido à hidrólise do mesmo gerando o ácido hexahidroxidifênico (PANICHAYUPAKARANANT et al., 2010). Os teores de

polifenóis e flavonoides totais do extrato comercial glicólico de romã não apresentaram grandes variações ao longo do estudo, em todas as condições empregadas. Pode-se considerar que esse comportamento foi semelhante ao observado no extrato seco de romã, rico em ácido elágico. A atividade antioxidante do extrato comercial glicólico de romã apresentou redução em todas as condições, exceto na estufa, indicando a presença de reações indesejáveis. De acordo com os resultados obtidos por Panichayupakaranant e colaboradores, 2010, sugere-se que possam ter ocorrido reações de hidrólise no ácido elágico, afetando a atividade antioxidante do extrato.

Paari e colaboradores, 2011, investigaram a ação da temperatura sobre as propriedades antioxidantes do extrato de casca de romã. Os autores submeteram a casca de romã a aquecimento nas temperaturas de 50, 100 e 150 °C por 60 minutos. As análises de determinação da atividade antioxidante, por DPPH, no extrato de casca de romã demonstraram que a temperatura exerceu efeito benéfico sobre a mesma. As amostras aquecidas a 100 e 150 °C apresentaram maior atividade antioxidante do que a amostra aquecida a 50 °C. Os autores acreditaram que esse aumento ocorreu devido à degradação e liberação de compostos antioxidantes unidos da matriz (PAARI et al., 2011). Esse comportamento não foi observado no extrato comercial glicólico de romã. A amostra armazenada em estufa permaneceu estável durante todo o estudo. Bchir e colaboradores, 2010, também avaliaram o efeito da temperatura em extrato de semente de romã, obtendo resultados opostos aos de Paari e colaboradores, 2011. Os autores submeteram sementes de romã a aquecimento nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C por 240 minutos. Eles observaram redução da atividade antioxidante e do teor de polifenóis totais nas três temperaturas estudadas. Essa redução foi diretamente proporcional à temperatura, assim, a amostra submetida a 60 °C apresentou maior redução no valor da atividade antioxidante que as demais amostras. Os autores acreditaram que o aquecimento pode ter sido responsável pela degradação térmica de ácidos fenólicos, flavonoides e ácido ascórbico, responsáveis pela atividade antioxidante das sementes de romã (BCHIR et al., 2010; PAARI et al., 2011).

Os resultados das pesquisas citadas indicaram que o comportamento térmico do extrato de romã pode variar em função da parte da *P. granatum* utilizada no preparo do extrato. Extrato preparado de casca de romã apresentou aumento na atividade antioxidante, após aquecimento e extrato preparado com sementes apresentou redução. O extrato comercial glicólico de romã apresentou-se estável quando armazenado a 45 °C. Segundo dados do fornecedor do extrato glicólico, o mesmo é preparado a partir de frutos de romã, entretanto, não há descrição se o mesmo foi produzido com sementes, cascas ou polpa.

Tabela 23 - Estabilidade física do extrato glicólico de romã (*P. granatum*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	ASPECTO				COR				ODOR			
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₁	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₃	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₄	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
t ₅	N	N	N	N	L	N	N	N	R	R	N	N
t ₆	N	N	N	N	L	N	N	N	R	R	N	N

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; (N): amostra normal sem alterações; (L): amostra levemente modificada; (R): amostra com redução da intensidade do odor

Tabela 24 - Análise visual do extrato glicólico de romã (*P. granatum*), após 90 dias de Estudo de Estabilidade Normal

Condições de armazenamento					
Estufa (45,0 ± 2,0 °C)		Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)		T.A E.S. (23,0 ± 2,0 °C)	
Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆	Referência t ₀	t ₆

Legenda: T.A.: Temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: Temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₆: Após 90 dias.

Tabela 25 - Estabilidade físico-química do extrato glicólico de romã (*P. granatum*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
tempo (dia)	pH			Densidade absoluta (g/mL)				Viscosidade dinâmica (cP)				
	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	45,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0
t ₀	4,55 ± 0,0 A	4,55 ± 0,0 A	4,52 ± 0,0 AB	4,55 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	1,01 ± 0,0 A	2,83 ± 0,5 A	2,83 ± 0,5 A	2,83 ± 0,5 A	2,83 ± 0,5 A
t ₁	4,41 ± 0,0 B	4,56 ± 0,0 A	4,52 ± 0,0 AB	4,51 ± 0,0 B	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,89 ± 0,0 A	2,89 ± 0,0 A	2,88 ± 0,6 A	2,88 ± 0,6 A
t ₂	4,36 ± 0,0 C	4,50 ± 0,0 B	4,46 ± 0,0 AC	4,46 ± 0,0 C	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,89 ± 0,0 A	2,95 ± 0,0 A	2,88 ± 0,0 A	2,95 ± 0,0 A
t ₃	4,46 ± 0,0 D	4,56 ± 0,0 A	4,53 ± 0,0 B	4,55 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,84 ± 0,0 A	2,84 ± 0,5 A	2,84 ± 0,0 A	2,95 ± 0,5 A
t ₄	4,31 ± 0,0 E	4,48 ± 0,0 C	4,48 ± 0,0 ABC	4,46 ± 0,0 C	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,89 ± 0,0 A	2,89 ± 0,0 A	2,83 ± 0,5 A	2,89 ± 0,0 A
t ₅	4,21 ± 0,0 F	4,37 ± 0,0 D	4,44 ± 0,0 C	4,37 ± 0,0 D	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,83 ± 0,0 A	2,83 ± 0,6 A	2,83 ± 0,0 A	2,89 ± 0,6 A
t ₆	4,20 ± 0,0 F	4,46 ± 0,0 E	4,45 ± 0,0 C	4,46 ± 0,0 C	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	1,02 ± 0,0 A	2,88 ± 0,6 A	2,88 ± 0,6 A	2,88 ± 0,6 A	2,88 ± 0,6 A

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 4 e p < 0,05).

Tabela 26 - Estabilidade química do extrato glicólico de romã (*P. granatum*) submetido ao Estudo de Estabilidade Normal

PARÂMETRO AVALIADO												
Teor de flavonóides (EQ) (mg/mL)					Teor de polifenóis (EAG) (mg/mL)					Atividade Antioxidante (TEAC) $\mu\text{molTE/mL}$		
tempo (dia)	Condição de armazenamento											
	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S	Estufa	Geladeira	T.A.	T.A. E.S
	(°C)				(°C)				(°C)			
	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0	23,0 $\pm$ 2,0
t ₀	0,54 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	13,68 $\pm$ 0,3 A	13,68 $\pm$ 0,3 A	13,68 $\pm$ 0,3 A	13,68 $\pm$ 0,3 AB	149,7 $\pm$ 0,0 A	149,7 $\pm$ 0,0 A	149,7 $\pm$ 0,0 AB	149,7 $\pm$ 0,0 A
t ₁	0,57 $\pm$ 0,0 A	0,53 $\pm$ 0,0 AB	0,54 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	13,75 $\pm$ 0,9 A	13,61 $\pm$ 0,2 A	13,46 $\pm$ 0,1 AB	13,55 $\pm$ 0,4 AB	122,9 $\pm$ 9,5 A	129,9 $\pm$ 7,7 B	128,5 $\pm$ 2,3 AC	122,3 $\pm$ 1,9 B
t ₂	0,55 $\pm$ 0,0 A	0,50 $\pm$ 0,0 B	0,53 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	13,91 $\pm$ 0,5 A	13,84 $\pm$ 0,4 A	13,47 $\pm$ 0,2 AB	13,84 $\pm$ 0,9 AB	146,5 $\pm$ 0,6 A	143,9 $\pm$ 1,6 AB	148,8 $\pm$ 2,2 B	144,3 $\pm$ 1,3 AB
t ₃	0,57 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 AB	0,54 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	13,77 $\pm$ 0,4 A	13,84 $\pm$ 0,9 A	13,72 $\pm$ 0,3 A	13,60 $\pm$ 0,2 AB	135,7 $\pm$ 9,0 A	129,1 $\pm$ 4,0 B	133,1 $\pm$ 0,0 ABC	131,7 $\pm$ 9,9 AB
t ₄	0,56 $\pm$ 0,1 A	0,52 $\pm$ 0,0 AB	0,54 $\pm$ 0,0 A	0,55 $\pm$ 0,0 A	12,38 $\pm$ 0,0 A	12,42 $\pm$ 0,3 A	12,78 $\pm$ 0,1 AB	12,51 $\pm$ 0,1 AB	131,3 $\pm$ 12 A	128,5 $\pm$ 6,6 B	145,8 $\pm$ 0,5 AB	146,1 $\pm$ 5,6 A
t ₅	0,56 $\pm$ 0,1 A	0,52 $\pm$ 0,0 AB	0,50 $\pm$ 0,1 A	0,51 $\pm$ 0,1 A	12,39 $\pm$ 0,2 A	12,35 $\pm$ 0,3 A	12,56 $\pm$ 0,5 B	12,33 $\pm$ 0,3 A	138,7 $\pm$ 4,8 A	127,9 $\pm$ 1,9 B	119,6 $\pm$ 6,5 C	131,2 $\pm$ 0,2 AB
t ₆	0,59 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 AB	0,55 $\pm$ 0,0 A	0,54 $\pm$ 0,0 A	13,54 $\pm$ 0,4 A	13,87 $\pm$ 0,2 A	13,65 $\pm$ 0,3 A	13,88 $\pm$ 0,4 B	139,2 $\pm$ 12 A	135,8 $\pm$ 0 AB	145,1 $\pm$ 12 AB	144,7 $\pm$ 12 AB

Legenda: T.A.: temperatura ambiente protegida da incidência de luz; T.A. E.S.: temperatura ambiente exposta à luz solar indireta; t₀: tempo inicial; t₁: após 7 dias; t₂: após 15 dias; t₃: após 30 dias; t₄: após 45 dias; t₅: após 60 dias e t₆: após 90 dias; EQ: equivalentes em quercetina; EAG: equivalentes em ácido gálico; TEAC: atividade antioxidante em Trolox[®] equivalente. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos (t₀ a t₆) de cada condição analisada individualmente em cada parâmetro (n = 2 e p < 0,05).

Figura 34 – Comportamento estatístico do valor de pH do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 35 – Comportamento estatístico da densidade absolutado extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 36 – Comportamento estatístico da viscosidade dinâmica do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 37 – Comportamento estatístico do teor de flavonoides totais, equivalentes em quercetina, do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 38 – Comportamento estatístico do teor de polifenóis totais, equivalentes em ácido gálico, do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal

Figura 39 – Comportamento estatístico do valor da atividade antioxidante, em Trolox[®] equivalente, do extrato glicólico de romã durante o Estudo de Estabilidade Normal

6. CONCLUSÕES

O Estudo de Estabilidade proposto abrangendo a estabilidade física, físico-química e química dos extratos glicólicos revelou comportamentos distintos entre os mesmos. O extrato glicólico de chá verde apresentou variações, superiores ao intervalo de $\pm 10,0 \%$, no valor de pH, no teor de polifenóis e flavonoides totais e no valor da atividade antioxidante. As maiores modificações foram observadas na amostra armazenada em estufa. A análise conjunta dos resultados indicou que o extrato glicólico de chá verde deve ser armazenado, ao abrigo da luz solar, em geladeira (5°C) para minimizar o efeito da temperatura e da luz solar sobre sua estabilidade. O extrato glicólico de erva-mate apresentou variações, superiores ao intervalo de $\pm 10,0 \%$, no teor de flavonoides totais e no valor da atividade antioxidante. As maiores porcentagens de variação foram observadas na amostra estocada a 45°C . De acordo com os parâmetros estudados, o extrato de erva-mate pode ser armazenado à temperatura ambiente ou em geladeira. O extrato glicólico de ginkgo apresentou variações, superiores ao intervalo de $\pm 10,0 \%$, no teor de polifenóis e flavonoides totais e no valor da atividade antioxidante. Observou-se maior porcentagem de variação na amostra armazenada em estufa. Reunindo os resultados dos três ensaios, sugere-se que o extrato glicólico de ginkgo seja armazenado, ao abrigo da luz, em temperatura baixa (5°C).

O extrato glicólico de menta mostrou variações, superiores ao intervalo de $\pm 10,0 \%$, no teor de polifenóis totais e no valor da atividade antioxidante. As maiores modificações foram observadas na amostra armazenada em estufa. A análise conjunta dos resultados indicou que o extrato glicólico de menta deve ser armazenado, ao abrigo da luz solar, em geladeira (5°C). O extrato glicólico de própolis demonstrou variações, superiores ao intervalo de $\pm 10,0 \%$, no teor de polifenóis e flavonoides totais. As amostras armazenadas nas diferentes condições empregadas no estudo apresentaram comportamento semelhante na variação do teor de polifenóis totais. As maiores porcentagens de variação do teor de flavonoides totais foram observadas na amostra estocada a 45°C . Assim, sugere-se que o extrato glicólico de própolis seja armazenado à temperatura ambiente ou em geladeira. O extrato glicólico de romã apresentou variações, superiores ao intervalo de $\pm 10,0 \%$, no valor da atividade antioxidante das amostras estocadas em geladeira e à temperatura ambiente com e sem exposição solar. A atividade antioxidante da amostra armazenada em estufa permaneceu constante durante o ensaio, indicando que a temperatura elevada não afetou a estabilidade desse extrato.

7. REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – **Anuário 2009**. Disponível em: < <http://www.abihpec.org.br>>. Acesso em: 26 jul. 2010.
- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – **Panorama do setor higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. Disponível em: < <http://www.abihpec.org.br>>. Acesso em: 16 out. 2010.
- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Manual de boas praticas em pesquisa e desenvolvimento** para a Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Série Qualidade cosméticos, 2007, 36 p.
- ALMEIDA A.C.S.; SILVA J.P.M.; FREJLICH J. Medida de viscosidade pelo método de Ostwald: Um experimento didático. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. v. 17, n.4, p. 279-283, 1995.
- ARABSHAHI S.; DEVI D.; UROOJ A. Evaluation of antioxidant activity of some plants and their heat, pH and store stability. **Food Chemistry**. v. 100, p. 1100-1105, 2007.
- BABY AR. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, padronizado em flavonóides totais**. São Paulo, 2005. 159 p. [Dissertação de Mestrado em Fármaco e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].
- BABY AR, MIGLIATO KF, MACIEL CPM, ZAGUE V, PINTO CASO, SALGADO HRN, KANEKO TM, VELASCO MVR. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 43, p.405-12, 2007.
- BANOV D. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de *Ginkgo biloba***. São Paulo, 2002. 112p. [Dissertação de Mestrado em Fármaco e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].
- BCHIR B.; BESBES S.; KAROUI R.; ATTIA H.; PAQUOT M.; BLECKER C. Effect of air-drying conditions of osmotically pre-treated pomegranate seeds. **Food and Bioprocess Technology**. Article in press, p.1-13, 2010.
- BONTORIM G. **Estudo de estabilidade de emulsão cosmética utilizando reologia e técnicas convencionais de análise**. Curitiba, 2009. 74 p. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná].
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M.E, BERSET C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p.25-30,1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1.ed. Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos. Brasília: ANVISA, 2007. 130 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução R.E.n. 249, de 13 de setembro de 2005. Determina o cumprimento do Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 de setembro de 2005. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 out. 2010.

BUTLER H. **Poucher's Perfumes, cosmetics and soaps**. 10 ed. Holanda: Kluwer academic publishers, 2000, 813 p.

CANNELL J.S. Fundamentals of stability testing. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 7, p. 291-303, 1985.

CENI G.C. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas**. Erechim, 2005. 175 p. [Dissertação de mestrado – Departamento de Ciências Agrárias - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões]

COSMETIC PRODUCTS (SAFETY) REGULATIONS 2008. United Kingdom. Disponível em: < http://www.derbyshire.gov.uk/images/sfy06_tcm9-8323.pdf > Acesso em: 18 out. 2010.

CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) E COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association), GUIDELINES ON STABILITY TESTING OF COSMETIC PRODUCTS, 2004, 10p.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba***. Ribeirão Preto, 2008. 176p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo].

EPSTEIN H. Skin care products. In: _____ **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Estados Unidos: Informa Healthcare, 3 ed. Cap 11, p. 121-134, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA 5.ed. Volume II. São Paulo, 2010. p. 714 (a)

FARMACOPEIA BRASILEIRA 5.ed. Volume II. São Paulo, 2010. p. 670 (b)

FRANCHETTI S.M.M.; MARCONATO J.C. **Química Geral Experimentos**, p.48, 2010. Disponível em:< <http://www.rc.unesp.br/ib/bioquimica/apostilaqg.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2011.

GAMA, M.S.; AFONSO, J.C. De Svante Arrhenius ao peagâmetro digital: 100 anos de medida de acidez. **Química Nova** v.30, n.1, p. 232-239, 2007.

GOH L.M.; BARLOW P.J. Antioxidant capacity in *Ginkgo biloba*. **Food Research International** v.35, p. 815-820, 2002.

ISAAC V.L.B; CEFALI L.C; CHIARI B.G; OLIVEIRA C.C.L.G; SALGADO H.R.N; CÔRREA M.A. Protocolos para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p.81-96, 2008.

LU L.; CHEN Y.; CHOU C. Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.11, n.4, p.277-282, 2003.

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**, n. 342, p. 40-48, 2007.

MATERSKA M. Evaluation of the lipophilicity and stability of phenolic compounds in herbal extracts. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.** v.9, n.1, p.61-69, 2010.

PAARI A.; NAIDU H. K.; KANMANI P.; SATISHKUMAR R.; YUVARAJ N.; PATTUKUMAR V; ARUL V. Evaluation of irradiation and heat treatment and antioxidant properties of fruit peel extract and its potential application during preservation of goat fish *Parupenaeus indicus*. **Food and Bioprocess Technology**. Article in press, p.1-11, 2011.

PANICHAYUPAKARANANT P.; ITSURIYA A.; SIRIKATITHAM A. Preparation method and stability of ellagic acid-rich pomegranate fruit peel extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n.2, p. 201-205, 2010.

PEDRIALI C.A.; FERNANDES A.U.; SANTOS P.A.; SILVA M.M.; SEVERINO D.; SILVA M.B. Antioxidant activity, cito-and phototoxicity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed pulp extract. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 30, n.4, p. 1017-1021, 2010.

SANCHEZ-MORENO C.; LARRAURI J.A.; SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p. 270-276, 1998.

SANTOS K.A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) em embalagens plásticas**. 2004. 109 p. [Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química- Universidade Federal do Paraná]

SCHMITZ W.; SAITO A.Y.; ESTEVÃO D.; SARIDAKIS H.O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.26, n.2, p. 119-130, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007. p.1102.

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**, [S.l.], v. 299, p. 152-178, 1999.

STAHL E.; SCHILD, W. **Pharmazeutische Biologie**, 4. Drogenanalyse II. Inhaltsstoffe und Tsolierungen. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. p. 126-127, 1981.

TOMMASI F.; PACIOLLA C.; PINTO M.C.; GARA L. Effects of storage temperature viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. Seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, n.44, p. 359-368, 2006.

VELASCO, M.V.R.; MACIEL, C.P.M.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthham **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 181-196, 2008.

VELASCO-DE-PAOLA, M.V.R. Fatores que influenciam na estabilidade dos produtos cosméticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 15, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, p.205-206,2001.

WANG HF, WANG YK, YIH KH. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils. **Journal of Cosmetic Science**, v.59, p. 509-522, 2008.

WANG H.; HELLIWELL K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. **Food Chemistry**, v.70, p. 337-344, 2000.

YATSU F.K.J.; BORGHETTI G.S.; BASSANI V.L. Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) spray-dried powder. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.4, p.413-419, 2011.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA DE EXTRATOS GLICÓLICOS

RESUMO

Compostos polifenólicos presentes em extratos vegetais conferem ação antioxidante, explorada nas formulações antienvhecimento e fotoprotetoras com apelo natural. O presente trabalho avaliou a eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS estimado), por espectrofotometria de reflectância difusa e análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur), de seis extratos glicólicos [chá verde (*Camellia sinensis*), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), menta (*Mentha piperita* L.), própolis e romã (*Punica granatum* L.)] de uso cosmético, incorporados em formulações (emulsões O/A) contendo ou não o filtro solar químico de amplo espectro bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, nas proporções de 2,5% ou 5,0% p/p. Os resultados gerados pelo método de Mansur indicaram que o FPS das formulações foi proporcional à quantidade de filtro utilizado. Aquelas com ou sem adição dos extratos glicólicos e com 2,5% p/p do filtro solar apresentaram FPS variando no intervalo de 3,57 a 4,07; enquanto que, aquelas que continham 5,0% p/p do filtro aditivadas ou não de extrato glicólico apresentaram FPS variando de 6,13 a 7,57. Os resultados gerados pelo espectrofotômetro de reflectância difusa indicaram valores de FPS variando no intervalo de 6,0 a 7,0 para as formulações com 5,0% p/p de filtro aditivadas ou não de extrato glicólico e 3,0 a 4,5 para aquelas que continham 2,5% p/p do filtro solar com ou sem adição dos extratos. Os últimos resultados foram estatisticamente iguais aos primeiros e aos das formulações que não continham o filtro solar aditivadas ou não de extratos glicólicos. As duas metodologias empregadas revelaram ausência de sinergismo entre os extratos glicólicos avaliados e o filtro solar de amplo espectro bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina nas proporções utilizadas.

Palavras-chave: extratos vegetal, própolis, fotoproteção, protetor solar, Fator de Proteção Solar (FPS), método de Mansur, espectrofotômetro de reflectância difusa

1. INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (UV), cuja maior fonte natural é o sol, pode provocar danos ao DNA, alterações químicas e histológicas na epiderme, envelhecimento precoce, cataratas, imunossupressão e carcinogênese, dentre outras deteriorações. O fotoenvelhecimento é responsável por danos agressivos à pele que geram modificações da superfície da mesma, tais como: perda da elasticidade, manchas escuras ou claras, rugas finas e profundas e alteração da superfície. A pele pode apresentar-se mais áspera, ressecada e descamativa. Atualmente, o câncer de pele é um grave problema de saúde pública devido ao aumento de sua incidência provocado, principalmente, pelas mudanças de hábitos da população mundial com maior exposição à radiação solar. Nas duas últimas décadas, iniciou-se, efetivamente, a busca pela proteção contra a radiação solar, uma vez que, os efeitos nocivos do sol tornaram-se mais conhecidos e divulgados. Na atualidade, a necessidade da fotoproteção é uma realidade irrefutável, quer seja pela ação profilática e terapêutica contra o envelhecimento precoce ou pela diminuição da incidência de câncer de pele (COSTA; WEBER, 2004; GONZÁLEZ et al., 2008; MILESI; GUTERRES, 2002; PALM; O' DONOGHUE, 2007; PATHAK, 1997; SGARBI et al., 2007; WILKINSON; MOORE, 1990).

A fotoproteção é o método que previne os efeitos danosos da radiação ultravioleta (UV). É realizada por meio do uso de protetores solares, roupas protetoras e acessórios adequados e exposição segura ao sol. A primeira linha de defesa contra estes efeitos nocivos envolve a utilização dos fotoprotetores. Em 1992, o mercado nacional de fotoprotetores comercializou um montante de 650 toneladas de produtos. Em 2002, a produção evoluiu para aproximadamente 4.200 toneladas, revelando não apenas a crescente importância deste segmento, como também sugerindo o potencial elevado de crescimento para os próximos anos. Segundo dados da Euromonitor, em 2008, o mercado brasileiro de proteção solar movimentou US\$ 720 milhões, atingindo a segunda colocação no *ranking* mundial, com participação de 9,2%, perdendo, apenas, para os Estados Unidos que deteve 18,4% do mercado com movimentação de US\$ 1,44 bilhão. Nesse mesmo ano, o mercado total desta categoria de produtos movimentou US\$ 7,81 bilhões e apresentou crescimento de 9,57% (ABIHPEC, 2010; FLOR et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2008; MAIER; KORTING, 2005; SHEU et al., 2003; WOLF et al., 2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SOL

O sol é a estrela mais próxima da Terra. Trata-se de uma enorme esfera de gás incandescente que gera energia por meio de reações termo-nucleares em seu núcleo. É composto por aproximadamente 92% de hidrogênio e 8% de hélio e outros elementos, como oxigênio, carbono e nitrogênio. Esses elementos apresentam-se ionizados, devido às altas temperaturas. Seu nascimento ocorreu há aproximadamente 4,6 bilhões de anos e sua morte ocorrerá em, no mínimo, 5 bilhões de anos. O sol apresenta combustível nuclear suficiente para manter-se ativo durante esse período, após o mesmo, o sol crescerá e se tornará uma estrela gigante vermelha, posteriormente se tornará uma anã branca e na sua fase final, uma anã preta. As **Figuras 1 e 2** ilustram imagens em três dimensões do sol obtidas pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) (FILHO; SARAIVA, 2009; NASA, 2009 b; SILVA, 2006).

Figura 1 – Imagem total 3D do sol (NASA, 2009)

Figura 2 - Imagem parcial 3D do sol (NASA, 2009)

A partir de 1980, com o advento dos satélites, o conhecimento sobre essa estrela aumentou de maneira considerável. Seu diâmetro é aproximadamente 1.390.000 km, valor que equivale a 109 diâmetros da Terra. Seu volume é 1.300.000 maior que o volume da Terra, atingindo um valor inimaginável de $1,406 \times 10^{18} \text{ km}^3$. Sua massa é aproximadamente $1,989 \times 10^{30} \text{ kg}$, o que corresponde a 300.000 vezes a massa da Terra. Seu interior apresenta temperaturas elevadíssimas, variando na faixa de $7,0 \times 10^6 \text{ °C}$ ($12,6 \times 10^6 \text{ °F}$) a $15 \times 10^6 \text{ °C}$ ($27 \times 10^6 \text{ °F}$) (FILHO; SARAIVA, 2009; NASA, 2009; SILVA, 2006).

A luz solar foi pesquisada ao longo dos séculos por diferentes cientistas. Em 1704, Isaac Newton publicou importante material sobre a luz solar, o *Opticks*, revelando os resultados de suas experiências de decomposição da luz solar utilizando um prisma. Ele

demonstrou que a luz visível do sol é uma mistura de um espectro contínuo de cores, que se estende do violeta ao vermelho. Em 1800, Willian Herschel descobriu que as cores do espectro contínuo da luz solar produziam temperaturas distintas e que as mesmas aumentavam na progressão da cor azul à vermelha. Além disso, ele observou que a temperatura produzida na região invisível além do vermelho era mais elevada, Herschel descobriu o infravermelho (NASA, 2009; SILVA 2006).

Johann Wihelm Ritter, ao ouvir sobre os trabalhos de Herschel, interessou-se por estudar a outra extremidade do espectro contínuo de cores, a região do violeta. Ritter acreditava na existência de uma radiação invisível além do violeta. Com seus conhecimentos químicos, ele provou sua teoria demonstrando que a região além do violeta era capaz de decompor cloreto de prata a prata mais rapidamente que a região do visível. Rittler descobriu o ultravioleta (UV). No início do século XIX, Thomas Young reforçou a teoria proposta em 1690 por Christiaan Huygens. Ele demonstrou, por meio de importantes experimentos, as propriedades de onda da luz. Posteriormente, em 1905, Einstein provou que a luz também apresentava propriedades de partículas (NASA, 2009).

No século XIX, James Clerk Maxwell introduziu o conceito de onda eletromagnética. Ele estudou o comportamento de campos elétricos e magnéticos e suas interações, concluindo que a oscilação de cargas elétricas produzia um campo eletromagnético. Adicionalmente, concluiu que este fenômeno eletromagnético apresentava propriedades de onda. Ele propôs que a luz solar era uma onda eletromagnética e que a porção visível correspondia a uma pequena parte de um espectro de radiação eletromagnética. Em 1886, Heinrich Hertz provou a teoria de Maxwell, conseguindo transmitir ondas de rádio para um receptor através do ar. Posteriormente, Guglielmo Marconi viu uma aplicação para os experimentos de Hertz, a telegrafia sem fios. Seus estudos foram base para o desenvolvimento de rádios sem fio e radares. Na mesma época, Willian Carl Roentgen descobriu um outro tipo de emissão eletromagnética, os raios X (NASA, 2009; SILVA, 2006).

Na atualidade, sabe-se que o espectro eletromagnético abrange um intervalo amplo de comprimentos de onda, desde 10^{-6} nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) até 100 km. Apresenta-se dividido em faixas, porém podem ocorrer sobreposições entre as mesmas, uma vez que existem dificuldades na determinação dos limites exatos entre elas. O sol emite radiação ao longo de todo o espectro eletromagnético, desde quilométricas ondas de rádio até os energéticos raios X e gama abrangendo o ultravioleta, visível, infravermelho e microondas. Grande parte desta radiação emitida é atenuada ou desviada pelas camadas atmosféricas da Terra, entretanto três radiações, denominadas não-ionizantes, conseguem atingir a superfície da mesma.

As radiações ultravioleta (UV) (100-400 nm), visível (400-800 nm) e infravermelha (> 800 nm) irradiam a superfície da Terra e se distribuem em: 56% de infra-vermelho, 39% de luz visível e 5% de radiação ultravioleta. A radiação UV contribui com região restrita do espectro da radiação eletromagnética e é subdividida, tradicionalmente, em: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVA, por sua vez, é classificada em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (320- 340 nm) (GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007; SANTOS, 2007; SILVA, 2006; SVOBODOVA et al., 2006). A **Figura 3** representa o espectro eletromagnético dividido em suas principais faixas.

Figura 3 – Espectro de radiação eletromagnética (CED/UFSC, 2010)

2.2 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Ao atingir a pele desprotegida, e de ação cumulativa, a radiação UV provoca um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas. Pode ocorrer formação de espécies reativas de oxigênio, alterações histoquímicas de diferentes gravidades, espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermoepidérmica (GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007; PATHAK, 1997; SGARBI et al., 2007; WILKINSON; MOORE, 1990).

Diversas moléculas na pele podem absorver a radiação UV e passar por alterações químicas devido a esse efeito. O DNA é uma das principais moléculas que absorvem a radiação UV. Ele pode sofrer mutações que, posteriormente, podem resultar em transformações malignas da célula. A radiação UV pode ativar componentes do sistema imune cutâneo gerando resposta inflamatória por distintos mecanismos, tais como: ativação direta de queratinócitos e outras células que liberam mediadores inflamatórios e redistribuição

e liberação de autoantígenos sequestrados de células danificadas pela radiação UV (MAVERAKIS et al., 2010)

Além do DNA, outros cromóforos absorvem a radiação UV na pele, como: melanina, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano, ácido urocânico, entre outros; gerando reações fotoquímicas diferentes e interações secundárias, com a participação de espécies reativas do oxigênio, que resultam em efeitos prejudiciais quando da exposição em excesso (GONZÁLEZ et al., 2008).

A radiação UV absorvida pelo DNA provoca modificações fotoquímicas nas pirimidinas, resultando em dímeros de ciclobutano e demais subprodutos que são reparados, fisiologicamente, por enzimas específicas, como ABC excinuclease, DNA polimerase I e DNA ligase, que participam do sistema de reparo do DNA. Esse sistema é eficaz, entretanto, o excesso de exposição solar pode tornar a reparação menos eficiente. Assim, o uso de protetores solares é fundamental para diminuir os efeitos danosos da radiação UV sobre o material genético. As reações fotoquímicas apresentam efeitos importantes sobre a pele humana, dependendo do comprimento de onda (λ) e da quantidade de energia. A epiderme e a derme apresentam alterações químicas e histológicas após exposição solar persistente, o que favorece o surgimento acelerado de rugas, aspereza, ressecamento, telangiectasias, pigmentação irregular, imunossupressão e lesões, que podem ser benignas, pré-malignas ou malignas (GONZÁLEZ et al., 2008; NELSON; COX, 2006; SGARBI et al., 2007).

A radiação UV afeta os olhos e, a cada ano, aproximadamente 3 milhões de pessoas sofrem de perda da visão devido aos danos relacionados à radiação UV, tais como fotoconjuntivites e cataratas (GONZÁLEZ et al., 2008).

Sabe-se que a radiação UV apresenta efeitos benéficos para a saúde. Ela estimula a produção da vitamina D₃ (colecalfiferol), envolvida no metabolismo ósseo e no funcionamento do sistema imunológico, e é utilizada no tratamento de doenças de pele como psoríase e vitiligo. A exposição regular do paciente à radiação UV caracteriza a fototerapia, que pode ser usada em conjunto com alguns medicamentos que aumentam a sensibilidade do paciente à radiação, promovendo melhora no quadro de determinadas doenças dermatológicas (GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007; PATHAK, 1997; SGARBI et al., 2007; WILKINSON; MOORE, 1990).

Associam-se à radiação UVA os efeitos do envelhecimento precoce da pele. Ela possui λ superior (> 320 nm) e quantidade de energia inferior à radiação UVB. Este intervalo de λ favorece sua penetração através da derme, afetando negativamente a elasticidade natural da pele e agravando fotodermatoses, como o lupo eritematoso e a erupção polimorfa à luz

solar. A radiação UVA também provoca redução na quantidade de células de Langerhans e aumento na quantidade de células inflamatórias presentes na derme (PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Danos ao DNA, geração de inflamação e carcinogênese são características associadas à radiação UVB. Confrontando-se com a radiação UVA, esta apresenta comprimento de onda inferior e maior quantidade de energia. A radiação UVB interage diretamente com o DNA produzindo mutações nos dímeros de pirimidina que estão associadas ao câncer de pele não-melanoma (carcinoma de células basais e de células escamosas). Pode exercer papel relevante em algumas fotodermatoses, como na erupção polimorfa à luz solar e na urticária solar, já que estas são sensíveis à luz visível e à radiação UV (BARON et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007; SGARBI et al., 2007).

2.2.1 DANOS DIRETOS AO DNA

Os efeitos da radiação UVB sobre o DNA estão relacionados com a formação de fotoprodutos mutagênicos ou lesões. Ela atua em pirimidinas adjacentes formando dímeros entre elas. Estes se classificam em dois tipos principais: dímeros de pirimidina ciclobutanos (CPDs) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Os CPDs formam-se entre os átomos de carbono 4 (C-4) e 5 (C-5) de quaisquer duas pirimidinas adjacentes, da mesma forma, 6-4PPs são formados entre duas pirimidinas adjacentes, frequentemente entre timina-citosina (TC) ou citosina-citosina (CC). A **Figura 4**, adaptada de Ichihashi e colaboradores, 2003, ilustra a formação de CPDs e 6-4PPs (ICHIHASHI et al., 2003; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; TRAUTINGER, 2001).

Figura 4 – Formação de CPDs e 6-4PPs entre pirimidinas adjacentes (ICHIHASHI et al., 2003)

Os CPDs e 6-PPs são fotoprodutos potencialmente mutagênicos. CPDs são estáveis após exposição adicional de radiação UV. O mesmo comportamento não é observado nos 6-4PPs. Quando expostos, adicionalmente, à radiação UVB e à λ menores UVA, convertem-se em novas estruturas bicíclicas. A taxa de formação de CPDs é três vezes maior que a de 6-4PPs. Calcula-se que o número de CPDs formados em uma célula basal da epiderme humana após exposição solar de, aproximadamente, 60 minutos ao meio-dia no verão de Kobe (Japão) seja de 100.000 CPDs por célula. Atribui-se aos CPDs o papel de maiores contribuintes para mutações em mamíferos, a reparação dos mesmos ocorre numa velocidade menor que a de 6-4PPs, em células de mamíferos. Atualmente, 90% dos 6-4PPs são reparados três horas após a irradiação (ICHIHASHI et al., 2003; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; TRAUTINGER, 2001).

As células dos mamíferos apresentam vários sistemas de reparo ao DNA, como o direto, que ocorre por excisão de base e por excisão de nucleotídeos. De acordo com a lesão primária, uma ou mais vias de reparo são ativadas para remoção da mesma. A ausência de um reparo efetivo de CPDs e 6-4PPs pode conduzir a mutações nas sequências do DNA. Essas mutações caracterizam-se por alterações de citosina por timina, como segue: (timina-citosina) TC $\rightarrow$ TT (timina-timina) e (citosina-citosina) CC $\rightarrow$ TT (timina-timina). Este tipo de mutação é próprio da radiação UV e representa a assinatura ou marca da mesma (ICHIHASHI et al., 2003; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2003; TRAUTINGER, 2001).

2.2.2 DANOS AO DNA POR MEIO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A radiação UV promove geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por fotosensibilização de cromóforos intracelulares, além de provocar diminuição de enzimas antioxidantes. A absorção de fótons por moléculas endógenas fotosensibilizantes produz reações subsequentes com o oxigênio, gerando diferentes ERO, tais como: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). As ERO fazem parte do metabolismo celular e muitas reações envolvendo a formação das mesmas, por subtração de um elétron de oxigênio molecular, ocorrem nas mitocôndrias, estando relacionadas com produção de energia. As enzimas celulares colaboram para manter mínima a taxa de danos oxidativos à célula. O aumento de espécies reativas de oxigênio pode alterar a homeostase do estado redox celular, provocando estresse oxidativo. Alterações funcionais e estruturais de genes e proteínas são observadas após o aumento de ERO, assim como peroxidação lipídica em membranas e desordens inflamatórias (PINNELL, 2003; RITTIÉ & FISHER, 2002; SANTOS, 2007; TRAUTINGER, 2001).

A vida curta da maioria das ERO faz com que as mesmas danifiquem estruturas próximas aos seus sítios de formação. Danos ao DNA representam a consequência mais drástica das reações oxidativas induzidas pela radiação UV, sendo a base guanina fortemente danificada pelas ERO. Ocorre a formação de 8- hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) e outros produtos em estresse oxidativo, após exposição à radiação UVA e UVB. Considera-se a 8-OHdG como marca do estresse oxidativo. A formação destes produtos pode conduzir à mutagênese. A **Figura 5** ilustra as principais lesões ao DNA causadas por danos oxidativos (ICHIHASHI et al., 2003; TRAUTINGER, 2001).

Figura 5 - Lesões ao DNA provocadas por danos oxidativos (ICHIHASHI et al., 2003)

2.2.3 IMUNOSSUPRESSÃO

O sistema imune reconhece substâncias potencialmente danosas e responde a elas por diferentes mecanismos. As células de Langerhans e os queratinócitos são a primeira linha de defesa ativada após danos à pele por trauma externo. As primeiras comunicam-se com os linfócitos T e os queratinócitos produzem diversas citocinas que participam do reconhecimento imune na pele. Observa-se que a radiação UV promove uma série de efeitos sobre o sistema imune, como a depleção da resposta imune celular na hipersensibilidade de contato, depleção das reações de hipersensibilidade retardada, alteração da secreção de citocinas e na disposição de linfócitos e indução de células T supressoras e T auxiliares secretoras de IL-4, entre outros. A imunossupressão possui papel importante no desenvolvimento da fotocarcinogênese. Este fato pode ser observado em pacientes submetidos

a terapias imunossupressoras, como a que utiliza agentes quimioterápicos. Relata-se que pacientes com transplante renal apresentam risco sete vezes maior de desenvolver câncer de pele (CESTARI, 1994; ITO et al., 2003; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; YOUNG, 2003).

Outros estudos demonstraram a relação entre imunossupressão induzida pela radiação UV e o desenvolvimento de câncer de pele, como descrito no trabalho de Fisher e Kripke de 1977. Os autores verificaram que os tumores cutâneos de ratos, desenvolvidos por exposição prolongada à radiação UVB, foram rejeitados quando transplantados para ratos saudáveis, porém, permaneceram em desenvolvimento quando transplantados para ratos pré-expostos à radiação UVB (FISHER; KRIPKE, 1977; ICHIHASHI et al., 2003).

2.2.4 FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO

A principal causa do envelhecimento extrínseco, ou seja, o fotoenvelhecimento cutâneo, é gerada por exposição crônica ao sol. Este é um processo distinto do envelhecimento intrínseco com mudanças clínicas, histológicas e bioquímicas próprias, embora algumas características sejam comuns aos dois processos. A formação de rugas é o resultado da diminuição da síntese de moléculas da matriz extracelular na derme e do aumento na remodelação da matriz por endopeptidases específicas (metaloproteinases de matriz) e por proteases (BERNEBURG; KRUTMANN, 2000; WATSON & GRIFFITHS, 2005).

O fotoenvelhecimento da pele é um processo biológico complexo que afeta várias camadas da mesma, percebe-se que o tecido conjuntivo da derme é o mais danificado pela exposição solar crônica. A pele fotoenvelhecida pode apresentar epiderme hipertrófica ou atrófica. Ocorre aumento da espessura da camada basal, alteração das fibras elásticas, elastose e substituição de fibras de colágeno maduras por colágeno com aparência basofílica distinta, ou seja, degeneração basofílica (BERNEBURG; KRUTMANN, 2000, SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al., 2000).

A radiação UVB atinge apenas a epiderme. A radiação UVA afeta a epiderme e a derme. A diferença na penetração das radiações está relacionada com seus comprimentos de onda. A radiação UVB apresenta λ menor que a UVA, assim não consegue atuar sobre a derme. As células da epiderme, queratinócitos, são atingidas por radiação UVB e UVA, enquanto que os fibroblastos, presentes na derme, são afetados somente pela radiação UVA. A radiação UVA atua indiretamente por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que provocam diversos danos, como lipoperoxidação lipídica, ativação de fatores de

transcrição e danos ao DNA. A radiação UVB também gera ERO, mas seu principal mecanismo de ação é a interação direta com o DNA gerando danos ao mesmo (BERNEBURG; KRUTMANN, 2000).

Os fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B induzidos pela radiação UV na epiderme e ERO induzem a expressão de metaloproteinasas de matriz (MMPs). Estas são enzimas envolvidas no metabolismo dos tecidos que se apresentam divididas em pelo menos 28 tipos, e que exercem importante papel na degradação de componentes da matriz extracelular e na ativação de citocinas. MMP-1 degrada colágeno tipo I, II e III e MMP-9 colágeno tipo IV, V e gelatina, sendo ambas denominadas gelatinases. As ERO também induzem mutações no DNA mitocondrial. Pesquisas recentes investigaram o papel do DNA mitocondrial no fotoenvelhecimento e percebeu-se que peles fotoenvelhecidas apresentaram frequência de mutação maior no DNA mitocondrial do que pele protegidas da exposição solar. Essas mutações podem estar relacionadas com o aumento da expressão de MMP-1, entretanto são necessários estudos adicionais para compreensão do relacionamento de mutações no DNA mitocondrial com o fotoenvelhecimento. A **Figura 6** sintetiza a ação da radiação UVA e UVB no fotoenvelhecimento cutâneo (BERNEBURG; KRUTMANN, 2000; ONOUEA et al., 2003).

Figura 6 – Ação da radiação UVA e UVB no fotoenvelhecimento cutâneo (BERNEBURG; KRUTMANN, 2000)

2.3 LUZ VISÍVEL E INFRAVERMELHO

Os efeitos danosos da luz solar sobre a pele humana não podem ser atribuídos somente a valores de comprimento de onda isolados, mas à interação entre os diferentes intervalos que compreendem a luz visível, a radiação UV e a infravermelha (RI) (CHO et al., 2009).

A radiação infravermelha (RI) pode transmitir energia na forma de calor, elevando a temperatura da pele. A pele humana exposta diretamente a RI pode ter sua temperatura elevada para mais de 40 °C devido à conversão da RI em calor. A exposição crônica ao calor pode gerar alterações na pele humana e provocar doenças como o eritema *ab igne*, caracterizado por eritema reticulado, hiperpigmentação, descamação fina, atrofia epidérmica e telangiectasias (CHO et al., 2009; WEBER et al., 2005).

A luz visível e a radiação infravermelha próxima podem induzir pigmentação. Um estudo *in vivo* foi realizado para determinar as mudanças de coloração que ocorrem durante a irradiação. Utilizou-se uma fonte de luz policromática de 390 a 1700 nm que simulava o espectro solar, porém sem a região da radiação UV e verificou-se que a pigmentação ocorria mesmo sem a presença da radiação UV. Outros estudos demonstraram que a exposição da pele normal à luz visível pode resultar na indução de pigmentação imediata (*Immediate Pigment Darkening* - IPD), eritema imediato e bronzeamento tardio (*Delayed Tanning* – DT). A luz visível também contribui com a produção de radicais livres e, assim, induz danos ao DNA indiretamente (MAHMOUD et al., 2008).

Cho e colaboradores, 2009, estudaram outros efeitos da luz visível e da RI presentes na luz solar, sobre a pele humana. Eles verificaram que, em adição à radiação UV, a luz visível, a RI e a energia gerada em forma de calor induziram expressão de metaloproteinase da matriz MMP-1 após exposição de pele humana a luz solar natural. A IR e a luz visível, também, aumentaram a expressão de MMP-9 e diminuíram a síntese de pró-colágeno tipo I. Segundo Boyce, 2010, a luz visível e o infravermelho próximo, de 400 a 1400 nm, podem provocar efeitos danosos também nos olhos, danificando a retina por aquecimento do tecido. Tais danos são denominados lesões coriorretinianas (BOYCE, 2010; CHO et al., 2009; EGEBLAD; WERB, 2002).

2.4 FOTOPROTEÇÃO

Segundo González e colaboradores, 2008, fotoproteção é um elemento profilático e terapêutico frente aos efeitos danosos da radiação UV. A abordagem é realizada por meio do uso de protetores solares, vestimentas protetoras e exposição restrita à luz solar. A primeira linha de defesa contra estes efeitos nocivos envolve a utilização dos fotoprotetores, também

denominados protetores solares. Eles podem ser compostos de vários filtros UV, incluindo filtros inorgânicos e orgânicos. Os filtros inorgânicos são bloqueadores físicos e os orgânicos são absorvedores químicos. A eficácia destes pode ser determinada por metodologias *in vitro* e *in vivo* por meio da obtenção do valor do fator de proteção solar (FPS) e está relacionada com a radiação UVB (FLOR et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2008; MAIER; KORTING, 2005; SHEU et al., 2003; WOLF et al., 2001).

2.4.1 FOTOPROTEÇÃO AMBIENTAL

Diversos fatores ambientais influenciam a intensidade da radiação UV que atinge a superfície terrestre. Níveis de ozônio, altura e cobertura das nuvens, poluentes ambientais e estação do ano são alguns exemplos destes fatores. A camada de ozônio absorve 100% da radiação UVC, 90% da radiação UVB e praticamente não absorve a radiação UVA e a radiação que não é absorvida pode, em contato com a água no estado líquido, penetrar na mesma com taxa de 80%. A água não reflete a radiação UV permitindo, assim, a penetração da mesma. Em demais condições, a radiação UV pode ser refletida. A neve e a areia permitem que a radiação UVB seja refletida e a neve pode gerar taxa de reflexão da radiação UVB de 85% (PALM; O' DONOGHUE, 2007).

O ozônio (O_3) é uma molécula capaz de realizar a fotoabsorção da radiação UV. Ele está presente na estratosfera e sua concentração varia naturalmente de acordo com a temperatura, tempo, latitude e altitude. A partir da década de 70, o nível de ozônio na estratosfera começou a diminuir anualmente, sendo mais marcante no hemisfério sul. Este fato ocorreu, principalmente, devido ao uso de substâncias capazes de danificar esta camada, como os clorofluorcarbonos presentes em aerossóis. Tais substâncias sofrem dissociação fotolítica ao atingir a estratosfera, liberando átomos de cloro que reagem com a molécula de ozônio e resultam em oxigênio e monóxido de cloro (BARRETO et al., 2009; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

A diminuição do nível de ozônio provoca aumento na quantidade de radiação UV que atinge a Terra. Estima-se que para cada 1% de redução, ocorre aumento de 1 a 2% na quantidade de radiação UVB que atinge a superfície terrestre. Relacionando este fato com o fator de amplificação biológico (aumento da incidência de câncer de pele em função do aumento da radiação UVB), verifica-se que para cada 1% de diminuição do nível de ozônio, o risco quantitativo de desenvolver câncer de pele aumenta de 3 a 4,6% para carcinoma espinocelular; e 1,7 a 2,7% para o basocelular. Observou-se, nos últimos anos, a estabilização nos níveis de ozônio na estratosfera, provavelmente devido às medidas adotadas por alguns

países, visando à redução da emissão de substâncias capazes de danificar a camada de ozônio (CLARKE, 2006; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

2.4.2 FOTOPROTEÇÃO POR VESTIMENTAS E ACESSÓRIOS

Vestimentas, óculos e chapéus são abordagens facilmente disponíveis e eficazes na defesa do organismo contra os efeitos nocivos da radiação UV. A Academia Americana de Dermatologia recomenda o uso de roupas apropriadas e óculos escuros para exposição prolongada ao sol, porém alguns tipos de tecido não proporcionam proteção suficiente (BARON et al., 2008; GAMBICHLER et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Diversos fatores influenciam a capacidade fotoprotetora dos tecidos. Em geral, aqueles fabricados com fibras firmemente tecidas, mais rígidos e espessos e, também, os mais escuros protegem melhor o corpo do que aqueles produzidos com características contrárias. Assim, a rigidez, a cor, a espessura e o peso dos tecidos influenciam a capacidade de fotoproteção dos mesmos (LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007; RAMIREZ; SCHNEIDER, 2003).

O Fator de Proteção Ultravioleta (FPU) avalia o grau de proteção das vestimentas. É semelhante ao Fator de Proteção Solar (FPS) aplicado aos protetores solares, entretanto, supostamente representa a proteção tanto contra a radiação UVA como contra a radiação UVB, característica inexistente no FPS que representa apenas proteção UVB (BARON et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

O FPU relaciona o tempo de exposição segura ao sol com a proteção e o tempo de exposição sem proteção. Assim, pode-se determinar a proteção que as vestimentas provêm de fato. Trata-se de metodologia *in vitro* relacionada com a avaliação da transmissão da radiação UV através dos tecidos. Este fator varia de acordo com o tipo, cor, textura, rigidez e umidade dos tecidos e também com os métodos envolvidos na confecção de vestimentas e acessórios a partir destes materiais. Segundo o Comitê Europeu de Padronização, o valor de FPU deve ser maior que 40 e a taxa de transmissão de UVA deve ser inferior a 5% para que o tecido apresente ação fotoprotetora adequada. No entanto, o padrão australiano preconiza valor de FPU superior a 15 (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007; RAMIREZ; SCHNEIDER, 2003).

Atualmente, surgiram novos tecidos que possuem capacidade de proteção solar elevada, inclusive, alguns apresentam partículas de dióxido de titânio dispersas entre suas fibras, permitindo proteção combinada UVA e UVB. A incorporação de partículas de filtros

solares inorgânicos promove aumento no valor do FPU. Tecidos clássicos, como o algodão, podem igualmente ter seu valor de FPU elevado com a incorporação de filtros solares. Um exemplo é o uso de Rit SunGuard[®], produto utilizado na lavagem de roupas, capaz de fornecer o filtro Tinosorb[®] FD (UVA e UVB), contido no mesmo, aos tecidos. Este procedimento promove aumento no valor do FPU dos mesmos. Verificou-se aumento no FPU de camisas de algodão lavadas uma única vez com o produto e aumento superior com lavagens sucessivas (BARON et al., 2008).

Além das vestimentas, outros acessórios são igualmente importantes para a fotoproteção como óculos escuros, luvas, bonés e chapéus. Os chapéus são úteis para a proteção do couro cabeludo, orelha, cabelo, olhos, testa e pescoço, além de prover sombra para o rosto, que pode proteger as bochechas, o nariz e o queixo. A eficácia da proteção de um chapéu ou boné está relacionada com o tamanho da borda dos mesmos, bem como o material utilizado para sua confecção. Chapéu com borda larga reduz a superfície ocular exposta à radiação UV em 50%. E aquele com borda de pelo menos 4 cm protege a parte posterior do pescoço. As luvas são úteis para a prevenção dos sinais de fotoenvelhecimento das mãos, como as manchas na superfície das mesmas (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007; SHEEDY; EDLICH, 2004).

Os óculos escuros previnem os diversos danos oculares provocados pela radiação UV, como cataratas, fotoconjuntivites e perda progressiva da visão. A proteção exercida deve abranger a radiação UV e a visível e deve cobrir todo o campo lateral da visão. Alguns fatores influenciam a proteção dos mesmos: tamanho, forma, capacidade de bloqueio da radiação ultravioleta e reflexão do verso da lente (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Aconselha-se que os óculos escuros possuam lentes com proteção lateral, coloração cinza ou próxima do neutro, boa qualidade óptica e transmitância do visível adequada para o conforto visual. A FDA (The Food and Drug Administration) definiu parâmetros para os óculos escuros, como a permissividade que deve ser menor que 0,001% para comprimentos de onda entre 200 e 320 nm e menor que 0,01% para comprimentos de onda entre 320 e 400 nm. A Academia Americana de Oftalmologia recomenda que os óculos filtrem 99% da radiação UV e que as lentes não transmitam mais do que 1% da radiação UVA e UVB (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007; SHEEDY; EDLICH, 2004).

2.4.3 FOTOPROTETORES

A utilização de protetores solares, ou seja, produtos fotoprotetores, é a principal abordagem cosmética contra os efeitos nocivos da radiação UV. Estudos diversos evidenciam que o uso adequado e regular de fotoprotetores reduz o número de casos de queratose actínica, carcinoma de células escamosas e atenua o desenvolvimento de novos nevus em crianças. Adicionalmente, o uso regular de fotoprotetores evita o envelhecimento precoce da pele (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Os protetores solares são preparações cosméticas que possuem formas de apresentação diversas. Podem ser encontrados como loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos e hidroalcoólicos, emulsões óleo em água (O/A), emulsões água em óleo (A/O), bastões e aerossóis, entre outras. As loções hidroalcoólicas, geralmente, apresentam reduzida proteção com formação de filme protetor irregular e podem provocar o ressecamento da pele, os óleos apresentam proteção superior às loções hidroalcoólicas, mas não atingem valor de FPS alto. Os géis oleosos apresentam composição oleaginosa gelificada com proteção superior aos óleos fluidos e as emulsões são as formas de apresentação com maior proteção. Os bastões são utilizados em formulações labiais e os aerossóis nas capilares ou corporais, por exemplo.

Os protetores contêm filtros solares que são moléculas ou complexos moleculares que podem absorver, refletir ou dispersar a radiação UV. Os primeiros foram comercializados a partir de 1928. Muito diferente das formulações atuais, o primeiro fotoprotetor era composto de uma combinação de salicilato e cinamato de benzila. Na Segunda Guerra Mundial, soldados alocados em climas tropicais, com a finalidade de evitarem queimaduras solares, utilizavam petrolato veterinário vermelho, PABA (ácido 4-aminobenzóico) e ácidos para-dimetilaminobenzóicos (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Na década de 1940, a FDA começou a regulamentar o desenvolvimento de fotoprotetores. Atualmente, este órgão regulamenta o uso dos filtros solares, o **Quadro 1** descreve, de acordo com a Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI) e com a Nomenclatura Química, os filtros aprovados para o uso nos EUA (BARON et al., 2008; BRASIL, 2006; GONZÁLEZ et al., 2008; INVENTÁRIO DE COSMÉTICOS DA UNIÃO EUROPÉIA, 2009; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Quadro 1-Lista de filtros solares aprovados pela FDA (BARON et al., 2008)

Filtros Solares		
Orgânicos		Inorgânicos
UVA INCI/Química	UVB INCI/Química	UVA/UVB INCI/Química
1-(4-TERT-BUTYLPHENYL)-3-(4-METHOXYPHENYL) PROPANE-1,3 DIONE/ Avobenzona	PABA/ Ácido 4 - aminobenzóico	TITANIUM DIOXIDE/ Dióxido de titânio
MENTHYL ANTHRANILATE/ Antranilato de mentila	OCTYL (ou ETHYLHEXYL) DIMETHYL PABA/ 4 - Dimetil-aminobenzoato de 2 - etilhexila	ZINC OXIDE/ Óxido de zinco
BENZOPHENONE-8/ 2,2'-dihidroxi-4 -metoxibenzofenona	HOMOSALATE/ Salicilato de homomentila	
BENZOPHENONE-3/ 2 – Hidroxi – 4 – metoxibenzofenona (oxibenzona)	ETHYLHEXYL SALICYLATE/ Salicilato de 2 - etilhexila	
BENZOPHENONE-4/ Ácido 2 - hidroxi- 4 - metoxibenzofenona - 5 - sulfônico e seu sal sódico	TEA-SALICYLATE/ Salicilato de trietanolamina	
TEREPHTHALYLIDENE DICAMPHOR SULFONIC ACID/ 3,3' - (1,4 - fenilenodimetileno)bis (ácido 7,7 - dimetil - 2 - oxo - biciclo - (2.2.1) 1 - heptilmetano sulfônico e seus sais	CINOXATE/ 4 - Metoxicinamato de 2 - etoxietila	
	OCTYL METHOXYCINNAMATE/ 4 – Metoxicinamato de 2 - etilhexila	
	OCTOCRYLENE/ 2 - Ciano - 3,3' - difenilacrilato de 2 - etilhexila	
	PHENYLBENZIMIDAZOLE SULFONIC ACID/ Ácido 2 - fenilbenzimidazol - 5 - sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina	

A Comunidade Européia permite a utilização de 27 diferentes filtros UV em formulações cosméticas e a Austrália, 28. Estes números contrastam com o **Quadro 1** que disponibiliza número de filtros aprovados inferior aos da Europa e Austrália. A partir de 1978, o FDA permitiu somente a adição de 3 novos filtros UV à lista. O processo de aprovação

regulatória de novos filtros nos EUA é moroso porque os mesmos são tratados como produtos OTC (venda sem prescrição médica). No entanto, na Europa e demais localidades, o processo de aprovação regulatória é mais acelerado, uma vez que os filtros solares são considerados pelas agências regulatórias como cosméticos. Na década de 1970, o PABA tornou-se o principal composto ativo em fotoprotetores comercializados com eficácia comprovada. Nas duas próximas décadas, a atenção se voltou para a formulação dos fotoprotetores cujo objetivo era elevar o FPS daqueles disponíveis no mercado, por meio da adição de novos filtros solares. Atualmente, diante dos danos que a radiação UVA provoca, o desenvolvimento de fotoprotetores visa à obtenção de produtos com proteção UVA e UVB, considerados de amplo espectro (BARON et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

2.4.3.1 EFICÁCIA

A eficácia fotoprotetora pode ser determinada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. O Fator de Proteção Solar (FPS), que indica a proteção contra a radiação UVB, pode ser definido como o quociente entre a dose eritematogênica mínima (DEM) na pele protegida com o fotoprotetor em análise e a DEM na pele ausente de proteção. O DEM é a quantidade de energia efetiva, expressa em Joules/cm², requerida para a produção da primeira reação eritematogênica perceptível e com bordas claramente definidas, identificadas por profissional habilitado e treinado (SHEU et al., 2003; WOLF et al., 2001).

A **Equação 1** determina matematicamente o valor de FPS. Para tal, é preconizado no Brasil, o emprego de metodologia *in vivo* que atenda a *Federal Register* – Norma FDA – *Department of health and Human Services Wednesday May 12, 1993 - Sunscreen Drug Product for Over the Counter Human Use; Final Monograph; Final Rule; Subparte D Testing Procedure*, seção 352.70 a 352.73. ou a Norma Colipa- *Colipa Sun Protection Factor Test Method- The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association* ref. 94/289 October 1994, de acordo com resolução RDC no 237/02 de 22 de agosto de 2002 (BRASIL, 2002).

$$\text{FPS} = \frac{\text{DME (pele protegida)}}{\text{DME (pele desprotegida)}}$$

Equação 1 – Determinação do Fator de Proteção Solar; onde: DME é a dose mínima da radiação capaz de formar o eritema mínimo.

Ensaio *in vitro* alternativos foram desenvolvidos, como os espectrofotométricos, e baseiam-se na análise do espectro de absorção ou de transmissão da radiação UV de soluções diluídas dos fotoprotetores em solvente adequado (etanol absoluto, por exemplo) ou na determinação do espectro de transmissão ou reflexão obtido em espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (FPS espectrofotométrico por meio de filme). Neste caso, não existe a necessidade da obtenção de soluções das amostras e filtros inorgânicos podem ser avaliados (DIFFEY, 1997; MANSUR et al., 1986; SAYRE et al., 1980).

A compreensão do mecanismo de atuação dos espectrofotômetros de reflectância com esfera de integração, como o Labsphere® UV-2000S, exige a revisão de alguns conceitos. Sabe-se que diversas formulações fotoprotetoras se apresentam como materiais translúcidos que dispersam luz incidente. Quando um raio de luz incidente atinge uma amostra com essas características, o mesmo é, frequentemente, espalhado. A luz que não foi transmitida na amostra é refletida ou absorvida. A intensidade da radiação, nesse tipo de amostra, é mais forte na proximidade da direção regular de transmissão como indicado na Figura 7. As amostras com características mais opacas apresentam um padrão de intensidade praticamente uniforme com distribuição hemisférica (SPRINGSTEEN et al., 1999).

Figura 7 – Dispersão da luz incidente em amostra de fotoprotetor translúcido (SPRINGSTEEN et al., 1999).

A razão entre o total de luz transmitida e o total de luz incidente é conhecida como transmitância sendo mensurada quantitativamente. A transmitância hemisférica é calculada utilizando uma esfera de integração que reúne a luz espalhada em todos os ângulos. As paredes internas dessa esfera são cobertas por material branco com alta capacidade de reflexão (**Figura 8**). Um sistema com fonte de iluminação, esfera de integração e fotodetector está esquematizada na **Figura 9**.

Figura 8 – Esfera de integração com suas paredes revestidas por material branco com alto índice de reflexão (LABSPHERE, 2010)

Figura 9 – Trajeto da luz incidente registrado por esfera de integração – Geometria normal/hemisférica ou difusa ($0^\circ/d$) (SPRINGSTEEN et al., 1999).

Nesse esquema, a luz emitida pela lâmpada, após ser colimada (seus raios tornaram-se paralelos), atinge a superfície da amostra com incidência normal. A iluminação interna produzida na esfera integrada é captada pelo fotodetector indicando a quantidade de luz transmitida através da amostra. Esse sistema é conhecido como geometria normal/hemisférica referente à condição iluminação/detecção e é abreviado como ($0^\circ/h$) ou geometria difusa ($0^\circ/d$). Segundo o princípio de reciprocidade de Helmholtz, a perda de fluxo de luz dentro do sistema não será alterada se a direção de viagem da luz for reversa. Assim, o resultado não será alterado se a geometria de iluminação e detecção for alternada. Esse princípio é largamente utilizado pela engenharia ótica, em cálculos de medidas de luz, e empregado na construção do Labsphere UV-2000S. A inversão da fonte de luz e do foto-detector no sistema representado na **Figura 9** caracteriza a geometria difusa/normal ($d/0^\circ$) esquematizada na **Figura 10** (OLIVEIRA, 2006; SPRINGSTEEN et al., 1999).

Figura 10 – Configuração iluminação/detecção ($d/0^\circ$) empregada no Labsphere UV-2000S (SPRINGSTEEN et al., 1999)

Essa geometria ótica de iluminação difusa, empregada no Labsphere UV-2000S, pode gerar questionamentos em relação à produção de diferentes resultados de medidas comparados com aqueles gerados pela iluminação colimada, uma vez que o número de raios incidentes de diferentes ângulos transmitidos através da amostra é maior. O sistema de detecção colimada com iluminação hemisférica aceita apenas os raios incidentes que são recíprocos ao padrão de radiação produzida por um feixe incidente colimado garantindo, assim, a equivalência dos resultados obtidos (OLIVEIRA, 2006; SPRINGSTEEN et al., 1999).

O equipamento apresenta uma lâmpada de xenônio pulsada dentro da esfera de integração que fornece energia suficiente para o intervalo de comprimento de onda de 250 a 400 nm, permitindo a obtenção de espectros completos. A esfera de integração coleta a luz transmitida em todas as direções, após a mesma ter atravessado um substrato contendo a amostra em avaliação. A medida de referência das análises é realizada com a gravação do fluxo de luz incidente sem a presença da amostra. O valor de FPS é fornecido diretamente pelo *software* do equipamento que executa o cálculo do mesmo de acordo com a **Equação 2** (OLIVEIRA, 2006; SPRINGSTEEN et al., 1999).

$$FPS = \frac{\int_{280nm}^{400nm} E\lambda \cdot S\lambda \cdot d\lambda}{\int_{280nm}^{400nm} E\lambda \cdot S\lambda \cdot T\lambda \cdot d\lambda}$$

Equação 2 – Cálculo do FPS executado pelo *software* do equipamento Labsphere® UV-2000S; onde $E\lambda$ é a efetividade espectral eritematosa; $S\lambda$ a irradiância solar espectral e $T\lambda$ a transmitância espectral da amostra (SPRINGSTEEN et al., 1999).

Além dos métodos para determinação da proteção relacionada à radiação UVB, existem aqueles específicos para a avaliação da proteção UVA, como o caso do cálculo de FPA-PPD (*Persistent Pigment Darkening*) que se baseia na resposta da pigmentação persistente frente à radiação UVA. Trata-se de um método *in vivo* que avalia a resposta da pigmentação da pele após a exposição à radiação UVA de 2 a 4 horas. Outro método *in vivo* para avaliação da proteção UVA envolve o cálculo de IPD (*Immediate Pigment Darkening*), isto é, o escurecimento transitório da pele após a exposição à radiação UVA (ROUTABOUL; DENIS, 1999; WENDEL et al., 2001).

O FDA propôs a inclusão de um sistema de classificação da taxa de proteção UVA. Este sistema é gradual e utiliza estrelas para classificar o grau de proteção. Assim, a proteção UVA é classificada em baixa, média, alta ou muito alta de acordo com o número de estrelas. A baixa proteção contra a radiação UVA é representada por uma estrela; média proteção por duas estrelas, alta proteção por três e proteção muita alta por quatro. Este sistema de classificação depende de resultados *in vitro* e *in vivo* de testes para proteção UVA (BISSONNETTE, 2008).

De acordo com o FDA, dois testes são necessários para avaliar a proteção UVA, um envolve a capacidade do protetor solar em reduzir a penetração da radiação UVA e o outro determina a capacidade do produto em prevenir o bronzeamento. O teste que indicar o valor mais baixo de proteção UVA do produto será responsável pela determinação do número de estrelas correspondente ao produto analisado. Dessa forma, o consumidor pode obter, além da informação sobre proteção UVB do produto, determinada pelo valor do FPS, a indicação da proteção UVA, de acordo com a escala gradual de estrelas (BISSONNETTE, 2008).

A resposta à PPD (*Persistent Pigment Darkening*) foi selecionada para o desenvolvimento de um protocolo padrão *in vivo*. Os resultados obtidos demonstraram reprodutibilidade para ampla faixa de produtos e níveis de proteção UVA. Em 1996, a Associação Japonesa da Indústria de Cosméticos adotou o método PPD como oficial na avaliação da eficácia UVA em fotoprotetores. Em 2001, a Coreia seguiu o exemplo e em seguida, no ano de 2007, a China também adotou o método como padrão (MOYAL, 2010).

A Comissão Européia recomendou a utilização do método em 2006 e o FDA, recentemente, propôs uma emenda sobre o método na monografia dos fotoprotetores. Atualmente, o método está em processo de padronização pela Organização Internacional para Padronização (ISO) (MOYAL, 2010).

No Brasil ainda não existe uma metodologia padronizada para determinação da proteção UVA. A Resolução da ANVISA 237, de 22 de agosto de 2002, somente menciona

que a quantificação da proteção UVA deverá ser realizada por meio de metodologias reconhecidas devidamente validadas (BRASIL, 2002).

2.4.3.2 FILTROS INORGÂNICOS

Óxido de zinco, dióxido de titânio, óxido de ferro, petrolato veterinário vermelho, talco, calamina e caulim são exemplos desta classe de filtros solares capazes de refletir e dispersar as radiações UV e visível por meio de uma barreira opaca formada pelo filme de partículas sobre a pele. Dependendo do tamanho da partícula, a proteção pode ocorrer não apenas pela reflexão, como também pela absorção da radiação. Os bloqueadores inorgânicos apresentam relativa estabilidade, não reagem com filtros orgânicos e, geralmente, são mais seguros clinicamente, sendo considerados de baixa toxicidade, estáveis e a primeira escolha para fotoprotetores destinados à pacientes com histórico de alergia. Entretanto, sob o ponto de vista da Ciência Cosmética, podem possuir inconvenientes, como: desenvolvimento de coloração opaca esbranquiçada sobre a pele após aplicação, favorecimento da comedogênese e transferência para vestimentas, com consequente comprometimento da eficácia fotoprotetora (GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

O aprimoramento dos fotoprotetores com filtros inorgânicos ocorreu no início da década de 1990, quando foram elaboradas formas de apresentação micronizadas do dióxido de titânio e do óxido de zinco. O desenvolvimento farmacêutico/cosmético também foi responsável pelas formas encapsuladas dos mesmos, por meio da utilização de polímeros. Atualmente, existe no mercado dióxido de titânio micronizado (T-lite[®] SF-S) e pigmentos inorgânicos de óxido de zinco micronizado (Z-Cote[®] HP-1) para proteção UV de amplo espectro. O tamanho original das partículas correspondia ao intervalo entre 100 e 300 nm. Com a micronização das mesmas, foi reduzido para 10 a 50 nm, correspondente a 50-90% do tamanho original. Como consequência, os fotoprotetores contendo filtros inorgânicos obtiveram aceitabilidade superior junto ao público, pois possibilitou o desenvolvimento de formulações que, após a aplicação, tornavam-se transparentes. Apesar da redução no tamanho das partículas, estes permaneceram com elevada proteção contra a radiação UV e significativa proteção UVA (BARON et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Dióxido de titânio e óxido de zinco apresentam características semelhantes e exercem proteção frente à radiação UVA. Entretanto, o óxido de zinco é mais eficiente em relação à esta proteção. Ambos não apresentam propriedades irritantes relevantes e, nem tampouco,

potencial de sensibilização quando em contato com a pele. Estudos *in vivo* e *in vitro* não evidenciaram a penetração do dióxido de titânio, no entanto, em relação ao óxido de zinco, pesquisas indicaram sua limitada penetração através da pele. As formas micronizadas do dióxido de titânio e do óxido de zinco podem sofrer reações fotoquímicas que comprometem sua eficácia, favorecendo danos ao material genético ou alterando a homeostase celular. O revestimento das partículas com dimeticone ou sílica promove a estabilidade das mesmas, reduzindo tais inconvenientes (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

Atualmente, novos avanços surgem para elevar a qualidade dos fotoprotetores inorgânicos, como, por exemplo, seu encapsulamento com cera de carnaúba. Esta contém cinamatos que, em conjunto com o dióxido de titânio, gera uma dispersão estável, com viscosidade adequada e com significativo aumento tanto do valor de FPS quanto da proteção UVA (GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

2.4.3.3 FILTROS ORGÂNICOS

Os filtros orgânicos são moléculas capazes de absorver radiação UV e de transformá-la em radiações energéticas inócuas ao ser humano. A **Figura 11** e a **Figura 12** representam o espectro de absorção de dois filtros orgânicos.

Figura 11 Espectro de absorção do filtro *p*-metoxicinamato de 2 etilhexila em etanol (FLOR et al., 2007)

Figura 12 Espectro de absorção do filtro 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano -1,2-diona, em etanol (FLOR et al., 2007)

Essencialmente, são compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos e, geralmente, possuem um grupo doador de elétrons como, por exemplo, uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático. Quanto à solubilidade, podem ser hidro ou lipossolúveis. O mecanismo de ação dos filtros orgânicos envolve a absorção da radiação UV e, em seguida, a excitação do orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) para o orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia). Tais moléculas, ao retornarem aos seus estados fundamentais, liberam o excesso de energia absorvida na forma, por exemplo, de calor (FLOR et al., 2007; MAIER; KORTING, 2005).

Estas moléculas são divididas em filtros UVA, que oferecem proteção frente à radiação UVA, filtros UVB, que exercem proteção frente à radiação UVB, e filtros de amplo espectro, que promovem proteção contra radiação UVA e UVB. Os filtros UVB são efetivos, podendo filtrar até 90% da radiação UVB e são utilizados amplamente há décadas; no entanto, os filtros UVA e os de amplo espectro são resultado de pesquisas recentes. Atualmente, produtos diversos utilizam combinação de diferentes filtros visando à obtenção da proteção de amplo espectro. A eficácia dos filtros orgânicos está diretamente relacionada com a estabilidade fotoquímica, com a dispersão e dissolução facilitada e permanente no veículo e com a resistência ao enxágue. Devem ser atóxicos e não causar irritação ou alergia (GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

FILTROS UVB

Os filtros UVB absorvem aproximadamente 90% da radiação de λ entre 290 e 320 nm. O PABA (ácido 4-aminobenzóico) foi o primeiro filtro UV utilizado e um dos primeiros aprovados pelo FDA, as reações fotoalérgicas ocasionadas por ele ocorrem em mais de 4 % da população. A partir da década de 1980 surgiram os produtos fotoprotetores livres de PABA. Foram introduzidos no mercado seus ésteres, que apresentavam como vantagens, a redução na alergenicidade e reatividade. O único éster aprovado pela FDA é o padimato O ou octil dimetil PABA (4-dimetil-aminobenzoato de 2-etilhexila), utilizado mais atualmente em produtos para proteção capilar e em conjunto com outros filtros, visando o aumento do FPS dos produtos fotoprotetores (GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Os cinamatos são os filtros UVB mais populares na Europa e nos EUA, entretanto, apresentam substantividade reduzida, sendo muitas vezes combinados com demais filtros. Apresentam potencial inferior de causar irritabilidade à pele. O 4-metoxicinamato de 2-etilhexila é um exemplo deste grupo de filtros UVB sendo o mais potente e capaz de absorver radiação de λ entre 270 e 328 nm. Estudos evidenciam que o processo de nanoencapsulação deste em poli-D,L-lactídeo-co-glicolídeo resultou na diminuição da fotodegradação (GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Os salicilatos são compostos aromáticos estáveis, seguros, insolúveis em água e apresentam substantividade elevada. Este grupo de compostos é utilizado como filtro solar há décadas e também como solventes para filtros solares pouco solúveis, como as benzofenonas. Pode-se citar como exemplo o salicilato de 2-etilhexila, de homomentila e de trietanolamina. O primeiro e o último estão associados com a fotoindução de reações cutâneas, fato que não ocorre com o salicilato de homomentila. Os salicilatos apresentam proteção UVB no intervalo de 290 a 315 nm sendo o de trietanolamina o mais usado em produtos para proteção capilar (GONZÁLEZ et al., 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

FILTROS UVA

Os principais filtros orgânicos UVA presentes nos fotoprotetores incluem as benzofenonas (principalmente oxibenzona), avobenzona, ácido tereftalideno dicânfora sulfônico, drometrizol trisiloxano, metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol e bis-etilexiloxifenol-metoxi-fenil triazina. Segundo Baron e colaboradores, 2008, o FDA aprovou, recentemente, o uso do ácido tereftalideno dicânfora sulfônico. Entretanto, o metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol e bis-etilexiloxifenol-metoxi-fenil triazina, ainda, não foram

aprovados por este órgão. Classifica-se o antranilato de mentila como filtro UVA, mas o mesmo é raramente utilizado (BARON et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008).

As benzofenonas são cetonas aromáticas e a FDA aprovou o uso da oxibenzona (benzofenona-3) no início da década de 1980. Este filtro absorve radiação no intervalo de comprimento de onda de 270 a 350 nm, abrangendo radiação UVB e UVA2. As benzofenonas, como classe, são consideradas filtros solares alergênicos. Apresentam baixa substantividade e a incidência de dermatite de contato e de reações fotótóxicas é alta (PALM; O' DONOGHUE, 2007).

No final da década de 1980 e início da década de 1990 introduziu-se, no mercado, a avobenzona. Este filtro UVA revolucionou a proteção contra a radiação UVA. Foi o primeiro a apresentar proteção UVA-I, abrangendo o intervalo de comprimento de onda de 310 a 400 nm. Ela apresenta significativa degradação frente à exposição à luz. Apenas 60 minutos de exposição à radiação UV reduz a efetividade do produto de 50 a 90%; assim torna-se necessária a fotoestabilização das formulações. Geralmente, adiciona-se um filtro solar com boa proteção UVB, como o salicilato de homomentila (BARON et al., 2008; BISSONNETTE, 2008; PALM & O' DONOGHUE, 2007).

Pesquisas recentes visam o desenvolvimento de novos veículos para a avobenzona contendo estabilizantes mais efetivos. As indústrias investem no desenvolvimento de formulações finais, envolvendo, por exemplo, combinações da avobenzona com octocrileno (2-ciano-3,3'-difetilacrilato de 2-etilexila). A adição do bis-etilexiloxifenol-metoxi-fenil triazina fotoestabiliza a avobenzona. HelioplexTM, produto comercial da Neutrogena[®] (divisão da Johnson & Johnson), apresenta avobenzona fotoestável por meio da combinação de dietilhexil 2,6-naftalato e oxibenzona (BARON et al., 2008; BISSONNETTE, 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

O ácido tereftalideno dicânfora sulfônico foi aprovado pela FDA em 2006. Este filtro foi desenvolvido pela L'Oréal[®] e patentado em 1982. Trata-se de um filtro orgânico fotoestável que absorve intervalo de comprimento de onda entre 290 e 390 nm, com pico de absorção máxima em 345 nm. Quando o mesmo é combinado com avobenzona ocorre aumento da proteção UVA. Estudos *in vivo* demonstraram proteção contra o fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de fotodermatoses. AntheliosTM SX, AntheliosTM e AntheliosTM SX 40 são exemplos de produtos contendo ácido tereftalideno dicânfora sulfônico comercializados pela La Roche Posay, divisão da L'Oréal[®] (BARON et al., 2008; BISSONNETTE, 2008; PALM; O' DONOGHUE, 2007).

Outro filtro orgânico introduzido no mercado foi o drometrizol trisiloxano. Em 2006, este filtro foi introduzido no Canadá, entretanto, ainda não foi aprovado pelo FDA. O drometrizol trisiloxano absorve radiação UVB e UVA-II e em combinação com ácido tereftálico dicâfora sulfônico apresenta elevação na capacidade da proteção UVA. Este filtro está disponível no mercado global por meio de diversos fotoprotetores da L'Oréal®, como: Anthelios™, Ombrelle™, Vichy™ e Biotherm™ (BISSONNETTE, 2008; GONZÁLEZ et al., 2008).

O bis-etilexiloxifenol-metoxi-fenil triazina e o metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol são filtros orgânicos ainda não aprovados pelo FDA, sendo de amplo espectro e comercializados em fotoprotetores da Johnson & Johnson como o Minesol® FPS 60. O bis-etilexiloxifenol-metoxi-fenil triazina eleva a fotoestabilidade da avobenzona e, tanto este como o metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol, atuam como compostos ativos na prevenção do fotoenvelhecimento (BISSONNETTE, 2008; GONZÁLEZ et al., 2008).

2.4.4 ANTIOXIDANTES

“Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato”. Podem agir evitando a formação de radicais livres, reparando os danos gerados por eles ou seqüestrando os mesmos. Muitos produtos cosméticos presentes no mercado apresentam antioxidantes incorporados, visando combater os sinais de envelhecimento da pele. Atualmente, diversos trabalhos investigam a ação dos antioxidantes na fotoproteção. Alguns estudos avaliam a ação dos mesmos na prevenção da formação de eritema cutâneo por meio da determinação do valor de FPS e outros analisam seus efeitos protetores frente aos danos moleculares gerados por estresse oxidativo induzido pela radiação UV (GÁLVEZ, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; WANG et al., 2010).

Resultados destes trabalhos indicaram que a vitamina C apresenta importante ação sobre a peroxidação lipídica e previne eritema cutâneo fotoinduzido quando incorporada em formulações tópicas. Em associação com a vitamina E, eleva a eficácia fotoprotetora da mesma. Matsui e colaboradores, 2009, avaliaram o efeito da vitamina C, vitamina E, cafeína e óleo essencial de camomila em fotoprotetores com FPS 25. Não foi verificada diferença significativa entre fotoprotetores com e sem adição destes antioxidantes quanto à redução do número de células de Langerhans, porém em relação à redução da expressão de MMP-1

houve diferença. Fotoprotetores com antioxidantes apresentaram maior redução na expressão de MMP-1 (GÁLVEZ, 2010; MATSUI et al., 2009).

Os polifenóis são componentes naturais de plantas que estão distribuídos em frutos, vegetais, sementes, casca de árvores e flores. Eles apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomodulatórias. São explorados como agentes quimiopreventivos em diversas doenças de pele, inclusive no câncer de pele. A quimioprevenção é um meio de controle do câncer baseado no uso de substâncias naturais ou sintéticas específicas que podem suprimir, retardar ou retroceder o processo de carcinogênese. Estudos demonstraram a eficácia de polifenóis naturais no combate à inflamação, estresse oxidativo, danos ao DNA e supressão da resposta imune induzidos pela radiação UV. Esses efeitos protetores contribuem para a ação anti-fotocarcinogênica dos mesmos (NICHOLS & KATIYAR, 2010).

A maioria dos polifenóis naturais são pigmentos amarelos, vermelhos ou roxos que podem absorver radiação UV. Assim, quando aplicados topicamente podem prevenir a penetração da radiação na pele. Eles podem absorver em toda região da radiação UVB e, em parte, da radiação UVA e UVC, atuando como um filtro solar. O chá verde (*Camelia sinensis*) é uma planta rica em polifenóis. Seu principal antioxidante é o epigallocatequina-3-galato. Estudos demonstraram que o chá verde apresentou capacidade fotoprotetora retardando o eritema cutâneo gerado pela radiação UVB. O extrato de chá verde diminuiu a expressão de p53 e queratinócitos apoptóticos, em humanos, induzidos pela radiação UVB (GÁLVEZ, 2010; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

2.4.5 CONTROVÉRSIAS SOBRE OS FOTOPROTETORES

Os protetores solares apresentam diversos benefícios à saúde, entretanto, existem controvérsias e desafios relacionados com a eficácia e segurança do uso dos mesmos (GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007)

2.4.5.1 REAÇÕES ADVERSAS CUTÂNEAS

Segundo González e colaboradores, 2008, a exposição da população aos filtros orgânicos aumentou após a inclusão frequente dos mesmos em diversos produtos cosméticos. Um estudo realizado com 603 voluntários australianos demonstrou que 18,9% dos indivíduos que utilizaram fotoprotetores de amplo espectro com FPS 15 ou superior, por um período de tempo de 7 meses, apresentaram sinais de irritação à pele, embora reações alérgicas aos filtros solares não foram encontradas.

As reações alérgicas aos filtros solares, dermatites de contato e de fotocontato alérgicas são raras. Fotoalergias por contato, geralmente, ocorrem devido à presença de benzofenona-3 (oxibenzona), principal responsável pela origem das mesmas. O PABA, o amil dimetil PABA e a benzofenona-10, conhecidos fotoalergênicos, não são mais utilizados, colaborando, assim, com a redução dos casos de irritação à pele por uso contínuo de fotoprotetores (FOLEY et al., 1993; GONZÁLEZ et al., 2008; LAUTENSCHLAGER et al., 2007).

2.4.5.2 ABSORÇÃO SISTÊMICA

Filtros UV, como as benzofenonas e o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila podem ser detectados no plasma e na urina de indivíduos que fizeram uso tópico dos mesmos. Entretanto, a maioria dos estudos relacionados com este fato foram conduzidos com formulações fotoprotetoras possuindo concentração elevada dos mesmos, diferente da encontrada em produtos comercializados. A ANVISA regulamenta, no Brasil, a utilização e concentração dos filtros solares em formulações fotoprotetoras. A Resolução 47 de 2006 relaciona os filtros solares permitidos e a concentração máxima dos mesmos. A concentração máxima permitida para benzofenona-8 (2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona) é 3,0% e para a benzofenona-3 (oxibenzona) e para o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila, 10%. Dessa maneira, as pesquisas sobre a absorção sistêmica de filtros solares devem utilizar formulações com a concentração máxima permitida pelos órgãos oficiais responsáveis (BISSONNETTE, 2008; BRASIL 2006; GONZÁLEZ et al, 2008).

Os fatores envolvidos na absorção sistêmica e na toxicidade crônica de filtros UV são intensamente debatidos, mas torna-se necessária a realização de pesquisas com os fotoprotetores presentes no mercado para avaliar o grau de absorção dos filtros UV e as conseqüências decorrentes (BISSONNETTE, 2008; GONZÁLEZ et al, 2008).

2.4.5.3 SÍNTESE DE VITAMINA D (CALCIFEROL)

A radiação ultravioleta é necessária para a síntese da vitamina D (calciferol), realizada na presença de radiação UVB. Os fotoprotetores geralmente apresentam efetiva proteção UVB. Poucos estudos relacionando o papel da vitamina D, a exposição solar e a prevenção de câncer foram realizados. Tornam-se necessárias pesquisas neste âmbito e também relacionadas com esta vitamina administrada oralmente e a sua síntese, seguida da exposição solar. Estudos relacionados com a quantidade ideal da vitamina D necessária para os efeitos benéficos da mesma também são importantes (BISSONNETTE, 2008).

Em 2007, a Sociedade Canadense de Câncer emitiu declaração recomendando que adultos canadenses considerem a ingestão diária de 1000 IU de vitamina D, baseada em evidências que sugeriram que a vitamina D poderia reduzir o risco de câncer de mama, próstata e colo retal. Os médicos deveriam individualizar a proteção solar, avaliando, em cada caso, a necessidade ou não da suplementação de vitamina D oral e também do grau de fotoproteção indicada para cada paciente (BISSONNETTE, 2008).

2.4.5.4 NANOPARTÍCULAS

Nos últimos anos, verificou-se o uso crescente de nanomateriais em componentes eletrônicos, preparações antifúngicas, antimicrobianas, cosméticos, entre outros. Nanopartículas são partículas únicas com diâmetro abaixo de 100 nm que representam um subgrupo dos nanomateriais, seus aglomerados podem apresentar tamanhos superiores a 100 nm. Nanopartículas insolúveis com diâmetro entre 50 e 200 nm, representadas principalmente por dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO), são utilizadas em fotoprotetores. A reflexão da radiação UV pelo TiO_2 é mais eficiente em partícula com tamanho entre 60 e 120 nm. O ZnO é, geralmente, utilizado em partícula com tamanho entre 30 e 200 nm. O uso dessas nanopartículas em fotoprotetores melhorou a aparência esbranquiçada dos fotoprotetores tradicionais e criou um veículo mais transparente, menos viscoso e com melhor espalhabilidade sobre a pele, o que melhorou a aceitabilidade do mesmo por parte dos consumidores (NEWMAN et al., 2009; NOHYNEK et al., 2008).

Muitos toxicologistas creditam os riscos das nanopartículas à inalação das mesmas por meio da poluição e do aquecimento de alimentos, com consequente deposição e inflamação no trato respiratório, entretanto, o potencial danoso da aplicação de nanopartículas na epiderme não pode ser ignorado. Este efeito é resultado do tamanho das mesmas, da habilidade de escapar dos mecanismos de defesa imunológica e de formar complexos com proteínas, e principalmente, da capacidade de induzir a formação de radicais livres (NEWMAN et al., 2009).

Alguns trabalhos de revisão sugeriram um potencial de penetração na pele humana das nanopartículas aplicadas topicamente, com produção de risco à saúde sistêmica. Também, sugeriram que estas podem penetrar na pele e serem distribuídas por todo o corpo pelo sistema circulatório. A penetração de materiais no estrato córneo é limitada pelo tamanho molecular. O espaço intercelular entre as células do estrato córneo é aproximadamente 100 nm^3 e pode ser ampliado com aplicação tópica de diversos produtos, fato que motiva as discussões sobre a penetração das nanopartículas no estrato córneo. Um trabalho

desenvolvido por Filipe e colaboradores, 2009, avaliou a localização e a possibilidade de penetração de nanopartículas, dispersas em 3 fotoprotetores, na pele normal e alterada. Os autores verificaram que os níveis de nanopartículas de TiO_2 e ZnO eram inexistentes ou muito baixos para detecção nas camadas da epiderme viável abaixo do estrato córneo. Este resultado não pode ser estendido a outros fotoprotetores, uma vez que diferentes formulações podem apresentar propriedades distintas (FILIPE et al., 2009; NEWMAN et al., 2009; NOHYNEK et al., 2008).

Novos estudos devem ser realizados para determinar a segurança de nanopartículas de TiO_2 e ZnO em fotoprotetores. Além da avaliação da penetração cutânea, ensaios da geração de espécies reativas de oxigênio frente à exposição das nanopartículas à radiação UV e, conseqüente, penetração das ERO geradas no estrato córneo, devem ser realizados.

2.4.6 FOTOPROTEÇÃO SISTÊMICA

A fotoproteção sistêmica é uma linha de defesa frente aos efeitos nocivos da radiação UV que desperta crescente interesse no meio científico. Diversos compostos foram estudados quanto à capacidade fotoprotetora após administração oral. Agentes botânicos que possuem propriedade anti-inflamatória, imunomoduladora e antioxidante fazem parte do grupo de compostos mais promissores que podem atenuar os danos gerados pelo excesso de exposição à radiação UV (JEON et al., 2009)

Como representantes deste grupo pode-se citar os carotenóides e os polifenóis. Os primeiros são pigmentos capazes de proteger as plantas contra o estresse oxidativo gerado pela radiação UV. Estudos em humanos dos efeitos fotoprotetores após administração oral de β -caroteno são controversos e alguns demonstraram fotoproteção moderada após ingestão de β -caroteno e outros, não obtiveram o mesmo resultado, apresentando resposta negativa. A eficácia do β -caroteno na fotoproteção sistêmica depende da duração do tratamento antes da exposição solar e da dose administrada. Nos estudos com respostas positivas, a dose administrada foi maior que 20 mg por dia durante um período mínimo de 10 semanas. O uso de altas doses de β -caroteno promove debates sobre a segurança deste procedimento (STHAL; SIES, 2007).

Os polifenóis do chá verde administrados oralmente são capazes de inibir a expressão de metaloproteinases diminuindo a degradação de colágeno da pele de ratos. A administração oral de chá verde e de chá preto no mesmo modelo animal diminui a indução de tumores de pele por exposição crônica à radiação UVB (GONZÁLEZ; GILABERTE, 2010; ROSEN, 2003).

Estudos envolvendo a planta *Polypodium leucotomos*, rica em compostos fenólicos e com propriedades anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica, indicaram que a mesma foi capaz de reduzir o eritema com preservação da morfologia das células de Langerhans e diminuição dos danos histológicos da pele. O extrato obtido da planta apresentou intensa propriedade fotoprotetora, quando aplicado topicamente ou administrado oralmente. Estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo o extrato indicaram que o mesmo apresentou capacidade de inibição da peroxidação lipídica e aumento da sobrevivência de queratinócitos humanos expostos à radiação UV (GOMBAU et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2010; SWINDELS; RHODES, 2004).

Muitos dos compostos estudados quanto às propriedades de fotoproteção sistêmica foram amplamente utilizados em formulações tópicas destinadas ao combate do envelhecimento precoce da pele. A aplicação destes compostos como fotoprotetores orais tem por objetivo elevar o índice antioxidante sistêmico, auxiliando na prevenção dos efeitos danosos da radiação UV. A fotoproteção sistêmica é complementar aquela exercida pelo uso tópico de fotoprotetores. Ela aumenta a proteção basal e contribui com prolongada defesa frente aos danos da radiação UV (GONZÁLEZ; GILABERTE, 2010; STAHL; SIES, 2007).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS estimado), por espectrofotometria de reflectância difusa e análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur), de seis extratos glicólicos (chá verde, erva mate, ginko, menta, própolis e romã) de uso cosmético, incorporados em formulações fotoprotetoras (emulsões O/A).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos / Acessórios

- Balança analítica *Sartorius* (BL - 210S) – Sartorius;
- Balanças semi-analíticas *Mettler* (P - 120) – Mettler – e *Scientech* (SA210) – Quimis;
- Banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner*[®] - Unique – Modelo 1600^a;
- Câmera digital PowerShot A470 Canon – 7.1 Megapixels;
- Destilador de água (106) – Fabbe;
- Espectrofotômetro UV-1203 UV/Vis Shimadzu com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm - Beckman Coulter;

- Peagômetro *Digimed* (DM 20) – Digimed;
- Espectrofotômetro de reflectância difusa com esfera integrada - Labsphere® - UV – 2000S
- Placas de PMMA (50 x 50 mm) - HelioScreen HD Plates
- Seringas descartáveis de 3 mL
- Luvas cirúrgicas

4.1.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes possuíam grau de pureza analítico (PA)

- Água destilada;
- Álcool isopropílico (Synth) – LabSynth;
- Solução tampão pH 4 (3,95 - 4,05) – Synth
- Solução tampão pH 7 (6,95 - 7,05) - Synth

4.1.3 Matérias-primas

- Extratos comerciais glicólicos não padronizados, fornecidos pela indústria brasileira A. Optou-se por não revelar o nome da empresa visando evitar *marketing* da mesma nesse estudo acadêmico:

- Chá verde (*C. sinensis*), INCI: *Camellia sinensis leaf extract*;
Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;
- Erva-mate (*I. paraguariensis*), INCI: *Ilex paraguariensis leaf extract*;
Parte utilizada no preparo do extrato: Folha
- Ginko (*G. biloba*), INCI: *Ginkgo biloba leaf extract*;
Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;
- Menta (*M. piperita*), INCI: *Mentha piperita leaf extract*;
Parte utilizada no preparo do extrato: Folha;
- Própolis, INCI: *Propolis extract*;
Parte utilizada no preparo do extrato: Substância resinosa;
- Romã (*P. granatum*), INCI: *Punica granatum fruit extract*;
Parte utilizada no preparo do extrato: Fruto
- Álcoois graxos e éster de ácidos graxos de sorbitano polietoxilados – (INCI: Emulsifying Wax NF) – Croda;
- Triglicérides do ácido cáprico/caprílico – (INCI: Caprylic/Capric Triglyceride) – Croda;
- Propilenoglicol – (INCI: Propylene Glycol) – LabSynth;
- Butilhidroxitolueno – (INCI: BHT) – Henrifarma;
- Edetato dissódico – (INCI: Disodium EDTA) - Chemyunion;

- Alquil parabenos e fenoxietanol - (INCI: Phenoxyethanol & Methylparaben & Ethylparaben & Propylparaben & Butylparaben & Isobutylparaben) – Croda
- Bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina - (INCI: Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine) – Basf

4. 2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento das formulações

O desenvolvimento das formulações envolveu a elaboração de 21 emulsões óleo em água (O/A) estáveis, macroscopicamente, durante o período de análise das mesmas. Optou-se pelo desenvolvimento deste tipo de preparação porque a mesma promove a maior proteção solar possível devido ao melhor desempenho do filme formado sobre a pele. A escolha da apresentação óleo em água (O/A) ocorreu devido ao fato da mesma ser considerada o veículo mais adequado e utilizado para o preparo de fotoprotetores (MUNDSTOCK; FRASSON, 2005).

As matérias-primas utilizadas no preparo das emulsões encontram-se dispostas no **Quadro 2** que indica a porcentagem e a fase correspondente de incorporação das mesmas nas emulsões, além de seus nomes comerciais, químicos e a nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*). O **Quadro 3** resume as funções cosméticas, ou seja, o estudo crítico dessas matérias-primas.

Após a seleção dos componentes das emulsões, procedeu-se com o preparo das mesmas. Os componentes foram separados de acordo com as seguintes propriedades: temperatura de fusão, suscetibilidade à oxidação, à evaporação ou degradação e solubilidade em água ou óleo. Cera auto-emulsionante não-iônica, bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, BHT e triglicérides do ácido cáprico/caprílico constituíram a fase oleosa caracterizada pela presença de componentes lipossolúveis. Propilenoglicol, EDTA dissódico e água destilada formaram a fase aquosa constituída por componentes hidrossolúveis e passíveis de aquecimento. A mistura de alquil parabenos e fenoxietanol e os extratos glicólicos foram incorporados às emulsões durante seu período de resfriamento com temperaturas inferiores a 40 °C.

Os componentes da fase aquosa foram pesados em balança semi-analítica e transferidos para béqueres de 250 mL. As matérias-primas da fase oleosa foram igualmente pesadas em balança semi-analítica, com exceção do bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina que foi pesado em balança analítica, e transferidas para recipientes de aço inox. As duas fases foram aquecidas, individualmente, em bico de bunsen até a temperatura de 70 °C controlada

com o auxílio de um termômetro. Em seguida, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa em forma de fio constante e sob agitação manual permanente, que perdurou até a formação da emulsão final. Após o resfriamento das emulsões até a temperatura de 35 °C, incorporaram-se, sob agitação manual constante, a mistura de alquil parabenos e fenoxietanol e os extratos glicólicos. Ajustou-se o valor de pH das formulações para $6,0 \pm 1,0$ com adição de trietanolamina ou solução de ácido cítrico 10,0% p/p e as mesmas foram envasadas e rotuladas permanecendo em repouso por 48 horas antes das análises *in vitro* da determinação do FPS (LACHMAN et al., 2001).

As 21 emulsões desenvolvidas, com suas composições quali e quantitativas (% p/p), encontram-se reunidas no **Quadro 4**. As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à *formulação base* (sem adição do filtro solar e dos extratos glicólicos), *formulação base aditivada com 2,5 % do filtro solar* e *formulação base aditivada com 5,0 % do filtro solar*. As formulações **B**, **B1**, **B2**, são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p do extrato glicólico de chá verde. O mesmo procedimento foi adotado para os demais extratos glicólicos, assim, os grupos de formulações (**C**, **C1** e **C2**), (**D**, **D1** e **D2**), (**E**, **E1** e **E2**), (**F**, **F1** e **F2**) e (**G**, **G1** e **G2**) representam, respectivamente, formulações aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de erva-mate, ginko, menta, própolis e romã. O preparo das emulsões foi realizado em triplicata. As mesmas foram fotografadas, após 48 horas de repouso, tempo necessário para a finalização do processo de emulsificação, por câmera digital PowerShot A470 Canon sob iluminação da capela de exaustão do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia da Universidade de São Paulo.

Quadro 2 - Matérias-primas empregadas no desenvolvimento das emulsões (CIBA, 2002; CRODA, 2010)

Componentes utilizados no preparo das emulsões				
<i>Nomenclatura comercial</i>	<i>Nomenclatura química/ Nome científico ou descrição</i>	<i>Nomenclatura INCI</i>	<i>Fase da emulsão</i>	<i>Proporção %p/p</i>
Polawax [®] NF	Álcoois graxos e éster de ácidos graxos de sorbitano polietoxilados	<i>Emulsifying Wax NF</i>	Oleosa	10,0
Crodamol [®] GTCC	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	<i>Caprylic/Capric Triglyceride</i>	Oleosa	10,0
-----	Propilenoglicol	<i>Propylene Glycol</i>	Aquosa	5,0
-----	Butilhidroxitolueno	<i>BHT</i>	Oleosa	0,2
Uniquelan [®] NA2S	Edetato dissódico	<i>Disodium EDTA</i>	Aquosa	0,1
Phenova [®]	Alquil parabenos e fenoxietanol	<i>Phenoxyethanol & Methylparaben & Ethylparaben & Propylparaben & Butylparaben & Isobutylparaben</i>	Final do processo	0,5
Escalol [®] S ou Tinosorb [®] S	2,4 - Bis - {2-etil-hexiloxi) - 2 - hidroxil] - fenil} 6 - (4-metoxifenil) - (1,3,5) -triazina	<i>Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine</i>	Oleosa	Zero, 2,5 ou 5,0
Extrato glicólico de chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Camellia sinensis leaf extract</i>	Final do processo	Zero ou 10,0
Extrato glicólico de erva-mate	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	<i>Ilex paraguariensis leaf extract</i>	Final do processo	Zero ou 10,0
Extrato glicólico gínco	<i>Ginkgo biloba</i> L.	<i>Ginkgo biloba leaf extract</i>	Final do processo	Zero ou 10,0
Extrato glicólico de menta	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Mentha piperita leaf extract</i>	Final do processo	Zero ou 10,0
Extrato glicólico de própolis	Propolis	<i>Propolis extract</i>	Final do processo	Zero ou 10,0
Extrato glicólico de romã	<i>Punica granatum</i> L.	<i>Punica granatum leaf extract</i>	Final do processo	Zero ou 10,0
-----	Água destilada	<i>Aqua</i>	Aquosa	100,0 (q.s.p)

Legenda: INCI : *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

Quadro 3 - Estudo crítico das matérias-primas empregadas no desenvolvimento das emulsões (CIBA, 2002; CRODA, 2010)

Matérias-primas utilizadas nas emulsões	
<i>Nomenclatura comercial/ química ou descrição</i>	<i>Estudo crítico (atribuído pelos fornecedores)</i>
Polawax [®] NF	Cera auto-emulsionante não-iônica
Crodamol [®] GTCC	Emoliente, solvente de princípios ativos
Propilenoglicol	Umectante
Butilhidroxitolueno	Antioxidante
Uniquelan [®] NA2S	Quelante e sequestrante de metais
Phenova [®]	Conservante
Escalol [®] S ou Tinosorb [®] S	Absorvedor UVA/UVB de amplo espectro
Extrato glicólico de chá verde	Ação estimulante, adstringente, antioxidante e antibacteriana
Extrato glicólico de erva-mate	Ação refrescante e antioxidante
Extrato glicólico de ginko	Ação estimulante da circulação periférica, protetora contra radicais livres, reestruturante e anti-inflamatória.
Extrato glicólico de menta	Ação antisséptica, adstringente, refrescante, estimulante da circulação periférica, ligeiramente anestésica.
Extrato glicólico de própolis	Ação cicatrizante, antiinflamatória, bactericida e protetora e regeneradora de tecidos
Extrato glicólico de romã	Ação antioxidante, adstringente e antisséptica
Água destilada	Veículo

Quadro 4 – Composição quali e quantitativa (% p/p) das emulsões desenvolvidas

Componentes	Emulsões desenvolvidas														
	A	A1	A2	B	B1	B2	C	C1	C2	D	D1	D2	E	E1	E2
Nomenclatura comercial/ química ou descrição	Composição qualitativa e quantitativa (% p/p)														
Polawax [®] NF	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Crodamol [®] GTCC	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
ButilHidroxiTolueno	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Uniquelan [®] NA2S	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Phenova [®]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Escalol [®] S ou Tinosorb [®] S	----	2,5	5,0	----	2,5	5,0	----	2,5	5,0	----	2,5	5,0	----	2,5	5,0
Extrato glicólico de chá verde	----	----	----	10,0	10,0	10,0	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Extrato glicólico de erva-mate	----	----	----	----	----	10,0	10,0	10,0	10,0	----	----	----	----	----	----
Extrato glicólico de ginkgo	----	----	----	----	----	----	----	----	----	10,0	10,0	10,0	----	----	----
Extrato glicólico de menta	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	10,0	10,0	10,0
Extrato glicólico de própolis	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Extrato glicólico de romã	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Água destilada q.s.p	100,0														

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** representam, respectivamente, formulação base (sem adição de filtro solar e de extratos glicólicos), formulação base aditivada com 2,5 % p/p e 5,0 % p/p de filtro solar. As tríades de formulação (**B**, **B1** e **B2**), (**C**, **C1** e **C2**), (**D**, **D1** e **D2**), (**E**, **E1** e **E2**), (**F**, **F1** e **F2**) e (**G**, **G1** e **G2**) são idênticos à tríade (**A**, **A1** e **A2**), porém aditivadas, respectivamente, por extrato glicólico de chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã.

4.2.2 Análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur)

Após 48 horas do preparo das emulsões, iniciaram-se os ensaios, em triplicata, para a determinação do FPS das mesmas. Diferentes solventes foram testados com o objetivo de solubilizar totalmente as amostras das emulsões. O álcool isopropílico P.A apresentou a melhor performance, sendo escolhido para a realização das análises. Pesaram-se, exatamente cerca de, 0,25 g das amostras das emulsões em balões volumétricos de 50,0 mL contendo 25,0 mL de álcool isopropílico P.A e, em seguida, os balões foram submetidos à sonicação por 10 minutos em banho ultrassônico para completa solubilização das amostras. O volume dos balões foi completado com o álcool isopropílico P.A e 1,0 mL de cada volume final foi transferido para balões de 25,0 mL que tiveram seus volumes ajustados com álcool isopropílico, resultando em soluções de concentração 0,2 mg/mL. Realizaram-se as leituras espectrofotométricas das soluções no intervalo de comprimento de onda de 290 a 320 nm a cada 5 nm e a média dos valores de absorbância obtidos (n=3) foi utilizada para o cálculo do FPS, de acordo com a **Equação 3** (MANSUR et al., 1986).

$$\text{FPS} = \frac{\sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{abs}(\lambda)}{290}$$

Equação 3 – Cálculo do FPS pelo método de soluções diluídas (método de Mansur). *Onde* **FC** = fator de correção; **EE** = efeito eritemogênico da radiação no comprimento de onda (λ); **I**: Intensidade do sol no comprimento de onda (λ); **Abs**: leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda (λ) (MANSUR et al., 1986).

A ponderação matemática empregada no cálculo do FPS está apresentada no **Quadro 5**. O fator de correção (FC) foi determinado, experimentalmente, utilizando 3 formulações fotoprotetoras comerciais de FPS 4, 15 e 30. O mesmo procedimento realizado com as amostras das emulsões foi adotado para a determinação do fator de correção. O valor médio da absorbância obtida, o valor de FPS declarado no rótulo e as ponderações matemáticas expressas no **Quadro 5** foram substituídos na **Equação 3** gerando o valor do fator de correção. O cálculo do FPS das emulsões desenvolvidas foi calculado com o auxílio da **Equação 3**, os valores médios das absorbâncias obtidos entre 290 e 320 nm foram multiplicados por suas respectivas ponderações matemáticas expressas no **Quadro 5** e somados. O valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção resultando no valor final do FPS.

Quadro 5 - Ponderação adotada no cálculo do FPS por espectrofotometria (SAYRE et al., 1979).

Comprimento de onda (λ) (nm)	EE (λ) x I (λ) (normalizado) Valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0864
320	0,0180
Total	1,000

Legenda: **EE** = efeito eritemogênico da radiação no comprimento de onda (λ); **I**: Intensidade do sol no comprimento de onda (λ)

4.2.3 Análise por espectrofotometria de refletância difusa

Além do método de análise espectrofotométrica de soluções diluídas, outro método, *in vitro*, envolvendo a utilização de espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração tem sido empregado na determinação do FPS. As emulsões desenvolvidas foram analisadas por este método e os resultados obtidos comparados com os da análise espectrofotométrica de soluções diluídas. O Analisador de Transmitância Ultravioleta Labsphere® UV-2000S, fabricado por Labsphere Inc., EUA foi utilizado na realização dos ensaios.

Os ensaios de determinação do FPS por meio desse equipamento foram realizados, em duplicata, em sala com controle de temperatura e umidade. Os substratos empregados nas análises foram placas de poli(metacrilato de metila) PMMA (50 x 50 mm) - HelioScreen HD Plates indicadas na **Figura 13** com as letras **A**, **B**, **C**, **D** e **E**. As análises foram realizadas baseadas na metodologia de *Boot Star Rating* que preconiza a utilização de 1,0 mg/cm² de amostra para a realização do ensaio. Pesaram-se exatamente cerca de 25 mg das amostras das emulsões, em seringas descartáveis pré-saturadas com as mesmas, utilizando balança analítica (LABSPHERE, 2010).

A aplicação das amostras sobre as placas de PMMA foi realizada, cuidadosamente, com a inserção de pequenas gotas das emulsões, geradas pela seringa descartável, dispostas paralelamente no substrato como indicado pela letra **B** da **Figura 13**. As amostras foram espalhadas com o dedo indicador, devidamente protegido, durante, aproximadamente, 15

segundos por meio de movimentos circulares, horizontais e verticais visando à formação de uma camada uniforme sobre as placas. Ao término da espalhabilidade, as amostras permaneceram em repouso, protegidas da luz, por 15 minutos. A **Figura 13** representa nas letras **B**, **C** e **D** o processo de espalhamento das amostras sobre as placas. A letra **E** indica a aparência da placa seca após 15 minutos de repouso ao abrigo da luz.

Placas de PMMA sem aplicação de amostra foram utilizadas para determinação do espectro de referência que foi empregado como branco do sistema antes das leituras das placas, preparadas com as amostras, pelo Analisador de Transmitância Ultravioleta Labsphere® UV-2000S representado na **Figura 13** pelas letras **F**, **G** e **H**. As placas de PMMA foram, cuidadosamente, inseridas no compartimento do equipamento, destacado na **Figura 13** - letra **G**, destinado à análise das mesmas. A lâmpada de xenônio pulsada do equipamento forneceu energia na faixa de comprimento de onda de 250 a 400 nm sobre as placas em análise, conforme representação da letra **H** na **Figura 13**. Esse procedimento foi realizado em réplicas de 9 para cada amostra em 9 pontos distintos das placas de PMMA demonstrados na letra **I** da **Figura 13**. A média dos 9 espectros de absorção utilizada na determinação do FPS foi calculada automaticamente pelo *Software* do equipamento, que forneceu, também, valores da razão UVA/UVB e comprimento de onda crítico (λ crítico).

4.2.4 Análise estatística dos ensaios realizados

A análise estatística dos resultados obtidos em cada ensaio citado anteriormente foi realizada no Excel 2000 e no programa STATISTICA Release 7.0. A média, o desvio padrão, a análise de variância (ANOVA *one-way*) e, quando apropriado, o teste de Tukey foram as ferramentas utilizadas para determinação de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras das emulsões desenvolvidas, considerando $n = 3$ e $p \leq 0,05$ para os resultados obtidos pelo método de Mansur e $n = 2$ e $p \leq 0,05$ para os do Labsphere® UV-2000S.

Figura 13 - Etapas envolvidas no preparo das placas de PMMA e análise das mesmas em espectrofotômetro de reflectância difusa (LABSPHERE, 2010)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento das formulações

Emulsões são definidas, do ponto de vista físico-químico, como uma mistura termodinamicamente instável de dois líquidos praticamente imiscíveis. De acordo com a definição farmacêutica, emulsões são mistura de dois líquidos imiscíveis que apresenta uma estabilidade aceitável, quando deixada, em prateleira, em um recipiente à temperatura ambiente. O preparo de emulsões consiste, basicamente, na mistura de uma fase oleosa e de uma aquosa na presença de um tensoativo. Em diversos casos, aquece-se, separadamente, as fases até as mesmas atingirem a faixa de temperatura entre 70 e 80 °C e verte-se a fase aquosa sobre a oleosa em forma de fio com agitação constante mecânica ou manual (LACHMAN et al, 2001).

As matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das 21 emulsões O/A foram selecionadas em função de suas características. A cera auto-emulsionante não-iônica Polawax[®] NF foi escolhida devido às suas propriedades, pois a mesma apresenta estabilidade em meios ácidos e básicos na faixa de pH de 3 a 13, sendo compatível com sistemas aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Optou-se por utilizar 10,0 % p/p da cera porque, nessa proporção, a mesma promove maior estabilidade e consistência nas formulações. A escolha dessa cera proporcionou menor custo à formulação final. Escolheu-se o bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina (Escalol[®] S) como filtro solar das emulsões por ser tratar de um filtro fotoestável e de amplo espectro que apresenta proteção UVA e efeito sinérgico com filtros UVB, promovendo aumento no valor do FPS. Sua molécula, representada na **Figura 14**, apresenta dois picos de absorção na região do UV, um na faixa da radiação UVA e outro na UVB caracterizando seu amplo espectro de ação. Seus dois substituintes etilhexil, indicados na **Figura 14**, favorecem a solubilidade desse filtro em óleos. A 25 °C, o mesmo apresenta insolubilidade em água. A **Figura 15** representa o comportamento desse filtro na região ultravioleta do espectro. Observam-se dois comprimentos de onda máximos em 310 e 340 nm, correspondentes a ação do filtro na região UVB e UVA, respectivamente. O bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina apresenta comprimento de onda crítico de 373 nm e razão UVA/UVB de 0,73. De acordo com literatura técnica do produto, o limite de uso razoável do mesmo em emulsões O/A é de 5 a 6% p/p, assim, adotou-se, nesse trabalho, o valor de 5,0% p/p desse filtro para a concentração máxima utilizada e metade desse valor (2,5% p/p), como valor mínimo (CIBA, 2002; CRODA, 2010).

Figura 14 – Fórmula estrutural bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina (CIBA, 2002)

Figura 15 – Comportamento do bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina na região ultravioleta do espectro (CIBA, 2002)

O triglicérides do ácido cáprico/caprílico foi selecionado como componente das emulsões porque o Escalol® S é solúvel no mesmo, diversos testes foram realizados para a determinação da sua concentração ideal nas formulações. O valor de 10,0% p/p foi capaz de solubilizar a concentração máxima do filtro sendo, portanto, escolhido para a elaboração das formulações (CIBA, 2002; CRODA, 2010).

Os outros componentes das emulsões, propilenoglicol, BHT, EDTA dissódico e a mistura de alquil parabenos e fenoxietanol foram escolhidos de acordo com suas respectivas funções, umectante, antioxidante da fase oleosa, quelante/sequestrante de metais e conservante de amplo espectro com atuação sobre bactérias Gram+, Gram-, fungos e leveduras. Os extratos glicólicos foram adicionados, em emulsões específicas, na proporção de 10,0% p/p que é a proporção máxima indicada nos laudos técnicos dos extratos glicólicos de chá verde, erva-mate, ginkgo, própolis e romã.

As Tabelas **1, 2, 3, 4, 5 e 6** apresentam as fotos das 21 emulsões desenvolvidas com as matérias-primas citadas, após 48 horas de preparo. Essas tabelas comparam, individualmente, a tríade de formulações sem adição de extratos glicólicos (**A, A1 e A2**) com as tríades aditivadas de extratos glicólicos, avaliando a influência desses extratos nas características organolépticas das formulações.

A **Tabela 1** comparou as características físicas das formulações **A, A1 e A2**, respectivamente, formulação base, base mais 2,5% p/p de filtro solar e base mais 5,0% p/p de filtro solar, com as das formulações **B, B1 e B2**, respectivamente idênticas às formulações **A, A1 e A2**, porém aditivadas com extrato glicólico de chá verde. As **Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6** compararam as características físicas, individualmente e respectivamente, da tríade (**A, A1 e A2**) com as das tríades (**C, C1 e C2**), (**D, D1 e D2**), (**E, E1 e E2**), (**F, F1 e F2**) e (**G, G1 e G2**) aditivadas, respectivamente, por extrato glicólico de erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã.

Observou-se que a emulsão **A** apresentou coloração branca e as emulsões **A1 e A2** coloração amarela, com diferentes tonalidades, sendo a da primeira mais clara e a da segunda mais intensa. A coloração amarela foi provocada pela adição do filtro solar bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina e as diferenças de tonalidades por suas concentrações distintas, esse filtro solar é um pó amarelo capaz de modificar a coloração das emulsões. Verificou-se, de acordo com a **Tabela 1**, que a tríade (**B, B1 e B2**) apresentou coloração variando do bege ao amarelo. Comparando a formulação **B** com a **A**, que só diferiam em suas composições pela presença do extrato de chá verde na formulação **B**, notou-se que a primeira apresentou coloração bege atribuída à presença de 10,0% p/p do extrato de chá verde que apresenta coloração laranja amarelada. As formulações **B1 e B2** apresentaram tons de amarelo distintos das formulações **A1 e A2** devido à presença do extrato. O mesmo comportamento foi observado para as demais formulações com extratos glicólicos, a única diferença foi a tonalidade de amarelo adquirida pelas emulsões.

As tríades de formulações (**C, C1 e C2**), (**E, E1 e E2**) e (**G, G1 e G2**) apresentaram, de acordo com as **Tabelas 2, 4 e 6**, um tom de amarelo escuro relacionado com os extratos incorporados às mesmas. Os extratos de erva-mate, menta e romã incorporados, respectivamente, às essas tríades de formulações apresentam coloração escura variando do laranja ao marrom. Em contrapartida, as tríades (**D, D1 e D2**) e (**F, F1 e F2**), de acordo com as **Tabelas 3 e 5**, apresentaram colorações em tons de amarelo claro e médio devido à coloração mais clara (laranja e amarela) de seus extratos de ginkgo e própolis, respectivamente.

Tabela 1 - Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de chá verde

Aspecto físico das formulações					
Sem adição de extrato glicólico			Aditivadas com extrato glicólico de chá verde		
A	A1	A2	B	B1	B2

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à formulação base (sem adição de filtro solar ou extrato glicólico), base mais 2,5% p/p de filtro solar (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine - Escalol®S) e base mais 5,0% p/p do mesmo filtro. As formulações **B**, **B1** e **B2** são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de chá verde.

Tabela 2 - Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de erva-mate

Aspecto físico das formulações					
Sem adição de extrato glicólico			Aditivadas com extrato glicólico de erva-mate		
A	A1	A2	C	C1	C2

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à formulação base (sem adição de filtro solar ou extrato glicólico), base mais 2,5% p/p de filtro solar (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine - Escalol[®]S) e base mais 5,0% p/p do mesmo filtro. As formulações **C**, **C1** e **C2** são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de erva-mate.

Tabela 3 - Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de glicólico de ginkgo

Aspecto físico das formulações					
Sem adição de extrato glicólico		Aditivadas com extrato glicólico de ginkgo			
A	A1	A2	D	D1	D2

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à formulação base (sem adição de filtro solar ou extrato glicólico), base mais 2,5% p/p de filtro solar (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine - Escalol® S) e base mais 5,0% p/p do mesmo filtro. As formulações **D**, **D1** e **D2** são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de ginkgo.

Tabela 4 - Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de menta

Aspecto físico das formulações					
Sem adição de extrato glicólico			Aditivadas com extrato glicólico de menta		
A	A1	A2	E	E1	E2

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à formulação base (sem adição de filtro solar ou extrato glicólico), base mais 2,5% p/p de filtro solar (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine - Escalol[®]S) e base mais 5,0% p/p do mesmo filtro. As formulações **E**, **E1** e **E2** são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de menta

Tabela 5 - Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de própolis

Aspecto físico das formulações					
Sem adição de extrato glicólico		Aditivadas com extrato glicólico de própolis			
A	A1	A2	F	F1	F2

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à formulação base (sem adição de filtro solar ou extrato glicólico), base mais 2,5% p/p de filtro solar (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine - Escalol®S) e base mais 5,0% p/p do mesmo filtro. As formulações **F**, **F1** e **F2** são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de própolis

Tabela 6 - Avaliação comparativa das características físicas das emulsões sem adição de extratos e das aditivadas com extrato de romã

Aspecto físico das formulações				
Sem adição de extrato glicólico		Aditivadas com extrato glicólico de romã		
A	A1	A2	G	G1 G2

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** correspondem, respectivamente, à formulação base (sem adição de filtro solar ou extrato glicólico), base mais 2,5% p/p de filtro solar (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine - Escalol® S) e base mais 5,0% p/p do mesmo filtro. As formulações **G**, **G1** e **G2** são, respectivamente, idênticas às formulações **A**, **A1** e **A2**, porém aditivadas com 10,0% p/p de extrato glicólico de romã

5.2 Análise espectrofotométrica de soluções diluídas (método de Mansur)

A determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de formulações fotoprotetoras pode ser realizada por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*. No Brasil, preconiza-se a utilização de metodologia *in vivo* envolvendo voluntários sadios com distintos fototipos, técnica que envolve algumas desvantagens como tempo de execução prolongado e custo elevado, além da participação de voluntários. O método *in vitro* de análise espectrofotométrica de soluções diluídas desenvolvido por Sayre e colaboradores e adaptado por Mansur e colaboradores apresenta-se como alternativa para os métodos *in vivo* por ser eficaz, rápido, de baixo custo e apresentar boa correlação com os resultados *in vivo*. É utilizado, principalmente, para avaliação do FPS no desenvolvimento de formulações e no controle de qualidade de rotina, lote a lote (DUTRA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2004).

Os resultados obtidos, em triplicata, nas análises de determinação do FPS envolvendo o método de Mansur estão expressos na **Tabela 7** e na **Figura 16**. O cálculo do Fator de Proteção Solar (FPS) estimado e do fator de correção foi realizado utilizando a **Equação 3**.

O estudo estatístico das emulsões revelou, de acordo com a **Tabela 7**, a presença de três grupos estatisticamente distintos. As formulações **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** e **G**, respectivamente, base e bases aditivadas com extratos de: chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã apresentaram valores de FPS estimado estatisticamente iguais entre si, variando no intervalo de 0,23 a 0,37, e distintos das demais formulações. Os valores obtidos demonstraram que essas formulações não podem ser consideradas fotoprotetoras. Esse resultado era esperado devido à ausência de filtro solar na composição dessas formulações.

As formulações **A1**, **B1**, **C1**, **D1**, **E1**, **F1** e **G1** que continham 2,5% p/p do filtro bis-etilxiloxifenol metoxifenil triazina, respectivamente, com ausência de extrato glicólico (**A1**) e com os extratos de: chá verde (**B1**), erva-mate (**C1**), ginkgo (**D1**), menta (**E1**), própolis (**F1**) e romã (**G1**) apresentaram valores de FPS estimado estatisticamente iguais entre si e distintos dos valores das demais formulações. Os valores obtidos oscilaram na faixa de 3,57 a 4,07, esse aumento no valor de FPS em relação ao grupo anterior de formulações (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** e **G**) ocorreu devido à presença do filtro solar na proporção de 2,5% p/p nessas formulações. Nenhum dos extratos glicólicos avaliados apresentou interação com o filtro solar na proporções utilizadas, elevando ou diminuindo o valor do FPS.

As formulações **A2**, **B2**, **C2**, **D2**, **E2**, **F2** e **G2** que continham 5,0% p/p do filtro bis-etilxiloxifenol metoxifenil triazina, respectivamente, com ausência de extrato glicólico (**A2**) e com a presença dos extratos de: chá verde (**B2**), erva-mate (**C2**), ginkgo (**D2**), menta (**E2**),

própolis (**F2**) e romã (**G2**) apresentaram valores de FPS estimado estatisticamente iguais entre si e distintos dos valores das demais formulações. Os valores obtidos oscilaram na faixa de 6,13 a 7,57, indicando uma elevação no valor de FPS quando comparado com os valores dos grupos de formulações (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** e **G**) e (**A1**, **B1**, **C1**, **D1**, **E1**, **F1** e **G1**). Esse aumento ocorreu devido à maior porcentagem do filtro solar (5% p/p) utilizada nessas formulações. Nenhum dos extratos glicólicos avaliados apresentou interação com o filtro solar nas proporções utilizadas, elevando ou diminuindo o valor de FPS.

A análise comparativa dos resultados das formulações que continham 2,5% p/p do filtro solar com aquelas que continham 5,0% p/p do mesmo revelaram que o valor de FPS das formulações com a máxima proporção do filtro foi, praticamente, o dobro do valor das formulações com a concentração mínima do filtro. Houve uma relação diretamente proporcional entre a proporção utilizada do filtro e o valor de FPS obtido, entretanto, a proporção utilizada dos extratos (10,0 % p/p) não alterou o valor do FPS.

Tabela 7 – Fator de Proteção Solar (FPS) estimado das formulações desenvolvidas determinado por análise espectrofotométrica de soluções diluídas

Formulação (Emulsão O/A)	FPS médio $\pm$ DV	Análise estatística (n=2; p<0,05)
A	0,23 $\pm$ 0,06	a
A1	3,57 $\pm$ 0,65	b
A2	7,53 $\pm$ 0,49	c
B	0,27 $\pm$ 0,06	a
B1	3,67 $\pm$ 0,15	b
B2	6,13 $\pm$ 1,22	c
C	0,27 $\pm$ 0,06	a
C1	3,80 $\pm$ 0,02	b
C2	7,10 $\pm$ 0,26	c
D	0,37 $\pm$ 0,06	a
D1	3,63 $\pm$ 0,15	b
D2	7,13 $\pm$ 0,59	c
E	0,23 $\pm$ 0,06	a
E1	4,07 $\pm$ 0,81	b
E2	7,57 $\pm$ 0,29	c
F	0,30 $\pm$ 0,00	a
F1	3,77 $\pm$ 0,29	b
F2	6,80 $\pm$ 0,85	c
G	0,27 $\pm$ 0,06	a
G1	3,67 $\pm$ 0,40	b
G2	7,03 $\pm$ 0,65	c

Legenda: DV= Desvio padrão; As formulações **A**, **A1** e **A2** representam, respectivamente, formulação base (sem adição de filtro solar e de extratos glicólicos), formulação base aditivada com 2,5 % p/p de filtro solar e formulação base aditivada com 5,0 % p/p de filtro solar. As tríades de formulação (**B**, **B1** e **B2**), (**C**, **C1** e **C2**), (**D**, **D1** e **D2**), (**E**, **E1** e **E2**), (**F**, **F1** e **F2**) e (**G**, **G1** e **G2**) são idênticas à tríade (**A**, **A1** e **A2**), porém aditivadas, respectivamente, por 10,0 % p/p de extrato glicólico de chá verde, erva-mate, ginko, menta, própolis e romã. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos (n=3; p<0,05)

Figura 16 – Análise comparativa do Fator de Proteção Solar (FPS) das formulações desenvolvidas (emulsões) analisadas pelo método de Mansur

Legenda: As formulações A, A1 e A2 representam, respectivamente, formulação base (sem adição de filtro solar e de extratos glicólicos), formulação base aditivada com 2,5 % p/p de filtro solar e formulação base aditivada com 5,0 % p/p de filtro solar. As triades de formulação (B, B1 e B2), (C, C1 e C2), (D, D1 e D2), (E, E1 e E2), (F, F1 e F2) e (G, G1 e G2) são idênticas à triade (A, A1 e A2), porém aditivadas, respectivamente, por 10,0 % p/p de extrato glicólico de chá verde, erva-mate, ginko, menta, própolis e romã. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos

5.3 Análise por espectrofotometria de refletância difusa

Os resultados obtidos nas análises, em duplicata, realizadas empregando o Labsphere® UV-2000S estão expressos na **Tabela 8** e na **Figura 17**. O valor de FPS estimado, o comprimento de onda crítico (nm) e a razão UVA/UVB estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Fator de Proteção Solar (FPS) estimado das formulações (emulsões) desenvolvidas determinado por análise espectrofotometria de refletância difusa

Formulação (Emulsão O/A)	FPS médio ± Desvio padrão	Análise estatística FPS (n=2; p<0,05)	(λc) crítico (nm) médio ± Desvio padrão	Razão média UVA/UVB ± Desvio padrão
A	1,0 ± 0,0	a	389,5 ± 6,3	0,9 ± 0,0
A1	4,0 ± 0,0	ab	370,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0
A2	6,5 ± 0,7	b	371,5 ± 0,7	0,8 ± 0,0
B	1,0 ± 0,0	a	387,5 ± 4,9	0,9 ± 0,0
B1	4,0 ± 1,4	ab	373,5 ± 2,1	0,8 ± 0,0
B2	6,7 ± 2,5	b	372,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0
C	1,0 ± 0,0	a	389,5 ± 6,3	0,9 ± 0,0
C1	3,0 ± 0,0	ab	371,0 ± 1,4	0,8 ± 0,0
C2	6,0 ± 1,4	b	373,0 ± 1,4	0,8 ± 0,0
D	1,0 ± 0,0	a	387,0 ± 5,6	0,9 ± 0,0
D1	3,5 ± 0,7	ab	372,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0
D2	6,3 ± 2,1	b	373,3 ± 0,7	0,8 ± 0,0
E	1,0 ± 0,0	a	388,0 ± 7,0	0,9 ± 0,0
E1	3,5 ± 0,7	ab	369,6 ± 0,7	0,8 ± 0,0
E2	7,0 ± 1,4	b	373,5 ± 0,7	0,8 ± 0,0
F	1,0 ± 0,0	a	387,5 ± 4,9	1,0 ± 0,0
F1	3,0 ± 0,0	ab	373,5 ± 0,7	0,8 ± 0,0
F2	7,0 ± 0,0	b	375,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0
G	1,0 ± 0,0	a	389,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0
G1	4,5 ± 0,7	ab	370,0 ± 1,4	0,7 ± 0,0
G2	5,5 ± 0,7	ab	373,0 ± 1,4	0,8 ± 0,0

Legenda: As formulações **A**, **A1** e **A2** representam, respectivamente, formulação base (sem adição de filtro solar e de extratos glicólicos), formulação base aditivada com 2,5 % p/p de filtro solar e formulação base aditivada com 5,0 % p/p de filtro solar. As tríades de formulação (**B**, **B1** e **B2**), (**C**, **C1** e **C2**), (**D**, **D1** e **D2**), (**E**, **E1** e **E2**), (**F**, **F1** e **F2**) e (**G**, **G1** e **G2**) são idênticas à tríade (**A**, **A1** e **A2**), porém aditivadas, respectivamente, por 10,0 % p/p de extrato glicólico de chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos

Figura 17 – Análise comparativa do Fator de Proteção Solar (FPS) das formulações (emulsões) analisadas por espectrofotometria de refletância difusa

Legenda: As formulações A, A1 e A2 representam, respectivamente, formulação base (sem adição de filtro solar e de extratos glicólicos), formulação base aditivada com 2,5 % p/p de filtro solar e formulação base aditivada com 5,0 % p/p de filtro solar. As tríades de formulação (B, B1 e B2), (C, C1 e C2), (D, D1 e D2), (E, E1 e E2), (F, F1 e F2) e (G, G1 e G2) são idênticas à tríade (A, A1 e A2), porém aditivadas, respectivamente, por 10,0 % p/p de extrato glicólico de chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente distintos

De maneira semelhante aos resultados obtidos com o método de Mansur, aqueles gerados pela determinação do FPS utilizando o espectrofotômetro de reflectância difusa (Labsphere® UV 2000 S) demonstraram, de acordo com o estudo estatístico descrito na **Tabela 8**, a presença de três grupos estatisticamente distintos. As formulações **A, B, C, D, E, F e G**, respectivamente, base e bases aditivadas com extratos de: chá verde, erva-mate, ginko, menta, própolis e romã apresentaram resultados estatisticamente iguais entre si ($FPS = 1$), porém distintos das demais formulações. Normalmente, o equipamento Labsphere® UV 2000 S gera valor de FPS igual a 1 em formulações sem filtro solar, indicando a ausência de fotoproteção das mesmas.

As formulações **A2, B2, C2, D2, E2, e F2** que continham 5,0% p/p do filtro bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, respectivamente, com ausência de extrato glicólico e com a presença dos extratos de: chá verde (**B2**), erva-mate (**C2**), ginko (**D2**), menta (**E2**) e própolis (**F2**) apresentaram valores de FPS estatisticamente iguais entre si e distintos dos valores das demais formulações. Os valores obtidos oscilaram na faixa de 6,0 a 7,0, indicando elevação do valor de FPS quando comparado com as demais formulações. Esse aumento ocorreu devido à porcentagem do filtro solar (5% p/p) utilizada nessas formulações. O FPS da formulação **G2** (5,5) que apresentava 5,0 % p/p do filtro solar e extrato de romã foi estatisticamente igual aos valores das formulações **A2, B2, C2, D2, E2, e F2** e das formulações **A, B, C, D, E, F e G**, pertencendo, estatisticamente, a esses dois grupos.

O mesmo comportamento estatístico da formulação **G2** foi observado nas formulações **A1, B1, C1, D1, E1, F1 e G1** que continham 2,5% p/p do filtro bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, respectivamente, com ausência de extrato glicólico e com extratos de: chá verde (**B1**), erva-mate (**C1**), ginko (**D1**), menta (**E1**), própolis (**F1**) e romã (**G1**). Os valores de FPS dessas formulações foram estatisticamente iguais entre si, representados no intervalo de 3 a 4,5. De maneira geral e em concordância com os resultados de FPS obtidos pelo método de Mansur, nenhum dos extratos glicólicos analisados apresentou sinergismo com o filtro solar nas proporções em que o mesmo foi utilizado, sendo os valores de FPS obtidos decorrentes, apenas, da presença do filtro solar e de sua proporção.

A **Tabela 8** apresenta os valores da razão UVA/UVB e o comprimento de onda crítico (λ_c) das formulações analisadas. Esses parâmetros foram determinados automaticamente pelo *software* do equipamento. A razão UVA/UVB é definida como a razão da absorbância UVA média pela absorbância UVB média. Defini-se comprimento de onda crítico (λ_c) como o comprimento de onda no qual a absorbância somada atinge 90 % da absorbância total. Ele é considerado como uma medida de quão ampla é a proteção solar fornecida pelo produto

(Oliveira, 2006). De acordo com a literatura técnica do filtro solar bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, o comprimento de onda crítico do mesmo é 373 nm e a razão UVA/UVB é 0,73. Observou-se, de acordo com a **Tabela 8**, que o comprimento de onda crítico das formulações que continham o filtro solar (**A1**, **A2**, **B1**, **B2**, **C1**, **C2**, **D1**, **D2**, **E1**, **E2**, **F1**, **F2**, **G1** e **G2**) variou no intervalo de 369,6 a 375 nm, evidenciando coerência entre esse resultado e o valor descrito na literatura técnica do filtro. A presença de extratos glicólicos não interferiu de maneira significativa no comprimento de onda crítico do filtro solar. O comprimento de onda crítico das formulações que não apresentavam o filtro solar em sua constituição, mas continham os extratos glicólicos (**B**, **C**, **D**, **E**, **F**, e **G**) variou no intervalo de 387 a 389,5 nm. Esses resultados poderiam sugerir que os extratos glicólicos isolados apresentavam proteção solar mais ampla, entretanto, não se pôde atribuir a maior amplitude de ação à presença dos extratos porque a formulação base sem extrato glicólico e sem filtro (**A**) também apresentou λ_c alto, no valor de 389,5 nm.

A razão UVA/UVB, indicada na **Tabela 8**, das formulações que continham o filtro solar (**A1**, **A2**, **B1**, **B2**, **C1**, **C2**, **D1**, **D2**, **E1**, **E2**, **F1**, **F2**, **G1** e **G2**) variou no intervalo de 0,7 a 0,8, indicando coerência com o valor descrito na literatura técnica do filtro (0,73). Observou-se que a adição de extratos glicólicos não alterou o comportamento do filtro. A razão UVA/UVB das formulações aditivadas com os extratos e sem filtro solar (**B**, **C**, **D**, **E**, **F**, e **G**) variou no intervalo de 0,9 a 1,1. Esse aumento poderia indicar uma maior proteção UVA dos extratos glicólicos, entretanto, não se pôde atribuir o aumento da razão UVA/UVB à presença dos extratos glicólicos porque a formulação base sem extrato glicólico e sem filtro (**A**) também apresentou razão UVA/UVB elevada (0,9).

Os resultados do valor de FPS obtidos pelo método de Mansur foram comparados com os resultados gerados pelo Labsphere® UV 2000 S. Utilizou-se o teste t de Student pareado ($p < 0,05$) para verificar diferenças estatisticamente significativas entre os resultados. A análise comparativa dos resultados está expressa na **Tabela 9**. Observou-se que os resultados gerados pela metodologia de Mansur foram semelhantes aos resultados obtidos no ensaio envolvendo o Labsphere® UV 2000 S. Os valores de FPS determinados pelo método de Mansur foram estatisticamente iguais aos valores de FPS determinados pelo Labsphere® UV em todas as formulações desenvolvidas, exceto nas formulações **C1** e **F1**. Foi possível observar, por meio de ambas as metodologias, que os extratos glicólicos de chá verde, erva-mate, ginko, menta, própolis e romã não alteraram o valor de FPS das formulações preparadas com o filtro solar bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina.

Tabela 9 – Análise comparativa dos valores de FPS determinados por Mansur e por Labsphere® UV-2000S

Formulação (Emulsão O/A)	FPS ± DV MANSUR	FPS ± DV LABSPHERE	Teste T de Student
A	0,23 ± 0,06	1,0 ± 0,0	
A1	3,57 ± 0,65	4,0 ± 0,0	
A2	7,53 ± 0,49	6,5 ± 0,7	
B	0,27 ± 0,06	1,0 ± 0,0	
B1	3,67 ± 0,15	4,0 ± 1,4	
B2	6,13 ± 1,22	6,7 ± 2,5	
C	0,27 ± 0,06	1,0 ± 0,0	
C1	3,80 ± 0,02	3,0 ± 0,0	*
C2	7,10 ± 0,26	6,0 ± 1,4	
D	0,37 ± 0,06	1,0 ± 0,0	
D1	3,63 ± 0,15	3,5 ± 0,7	
D2	7,13 ± 0,59	6,3 ± 2,1	
E	0,23 ± 0,06	1,0 ± 0,0	
E1	4,07 ± 0,81	3,5 ± 0,7	
E2	7,57 ± 0,29	7,0 ± 1,4	
F	0,30 ± 0,00	1,0 ± 0,0	
F1	3,77 ± 0,29	3,0 ± 0,0	*
F2	6,80 ± 0,85	7,0 ± 0,0	
G	0,27 ± 0,06	1,0 ± 0,0	
G1	3,67 ± 0,40	4,5 ± 0,7	
G2	7,03 ± 0,65	5,5 ± 0,7	

Legenda: FPS = Fator de Proteção Solar; DV = Desvio padrão. As formulações **A**, **A1** e **A2** representam, respectivamente, formulação base (sem adição de filtro solar e de extratos glicólicos), formulação base aditivada com 2,5 % p/p de filtro solar e formulação base aditivada com 5,0 % p/p de filtro solar. As tríades de formulação (**B**, **B1** e **B2**), (**C**, **C1** e **C2**), (**D**, **D1** e **D2**), (**E**, **E1** e **E2**), (**F**, **F1** e **F2**) e (**G**, **G1** e **G2**) são idênticas à tríade (**A**, **A1** e **A2**), porém aditivadas, respectivamente, por 10,0 % p/p de extrato glicólico de chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã. O símbolo (*) indica diferenças estatisticamente significativas entre os resultados de Mansur e Labsphere

Inúmeros trabalhos investigam as propriedades fotoprotetoras atribuídas aos extratos vegetais. Dal'Belo, 2009, avaliou a eficácia fotoprotetora de formulações contendo extratos de chá verde (*C. sinensis*) e/ou gínco (*G. biloba*). A autora realizou ensaios *in vivo* submetendo camundongos à radiação UV. As formulações contendo um dos extratos citados ou a mistura deles foram aplicadas no dorso do animal antes da exposição à radiação UV. Diversos parâmetros foram utilizados na avaliação pré-clínica da eficácia fotoprotetora: índice de eritema, contagem de células de queimadura solar (CQS), espessura da epiderme viável, e perda transepidérmica de água (TEWL), visando avaliar a integridade da função barreira da pele. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato de gínco apresentou efeito mais pronunciado na proteção contra a formação de eritema e na proteção da barreira cutânea e o extrato de chá verde apresentou efeito mais pronunciado na proteção dos queratinócitos. Ambos os extratos reduziram a espessura da epiderme viável (DAL'BELO, 2008).

Silva, 2009, avaliou a capacidade protetora dos extratos de chá verde (*C. sinensis*) e erva-mate (*I. paraguariensis*) contra os efeitos induzidos pela radiação UV sobre fibroblastos. Células McCoy (fibroblastos de camundongos) foram incubadas a 37 °C com adição ou não dos extratos de chá verde e erva-mate. Após cerca de 24 horas, elas foram irradiadas com radiação UVA/UVB em simulador específico. Em seguida, foram incubadas novamente a 37 °C por 24 horas. Após tripnização, avaliou-se a viabilidade das células. Observou-se que o extrato de chá verde inibiu a ação deletéria da radiação UV sobre os fibroblastos. A presença do extrato permitiu maior recuperação de células quando comparado com células irradiadas e não tratadas com o extrato. Assim, um efeito citoprotetor e estimulante da proliferação foi associado ao extrato de chá-verde. O extrato de erva-mate não demonstrou eficiência na proteção dos fibroblastos frente aos danos da radiação UV (SILVA, 2009).

Fonseca e colaboradores, 2011, estudaram a ação de extrato de própolis brasileiro no estresse oxidativo gerado pela radiação UV. Os autores realizaram ensaios *in vivo* para avaliar o efeito protetor do extrato contra o estresse oxidativo gerado pela radiação UVB. O experimento consistiu na aplicação tópica ou não de extratos de própolis verde e marrom em dorso de camundongos submetidos à radiação UV. O nível de glutathione foi mensurado durante o ensaio. Observou-se depleção de glutathione na pele dos camundongos submetidos à radiação. Os extratos de própolis promoveram recuperação de 14 % no nível de glutathione, após irradiação. Nascimento e colaboradores, 2009, avaliaram a eficácia fotoprotetora *in vitro* da própolis. Os autores determinaram o Fator de Proteção Solar (FPS) de formulações fotoprotetoras aditivadas ou não de extratos etanólicos e glicólicos de própolis. Os resultados obtidos indicaram sinergismo entre os extratos de própolis e os filtros solares utilizados (ácido

2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico e ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico). O valor de FPS das formulações aditivadas com extratos apresentou aumento significativo em relação ao FPS das formulações sem adição de extrato (FONSECA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2009).

Resultado diferente foi observado no presente trabalho, o extrato comercial glicólico de própolis não alterou o valor de FPS das formulações preparadas com o filtro solar bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina. Diversos fatores podem estar relacionados com a diferença observada. Sabe-se que a própolis pode apresentar variações em sua composição química, de acordo com sua origem geográfica. Os extratos de própolis usados nas pesquisas eram provenientes de diferentes locais. As formulações estudadas eram distintas, assim como os filtros solares. Esses fatores podem ter influenciado os comportamentos distintos observados nas pesquisas.

Pacheco-Palencia e colaboradores, 2008, investigaram a capacidade protetora de extrato de romã (*P. granatum*) frente aos danos da radiação UVA e UVB em fibroblastos de pele humana. Os autores observaram que o extrato de romã reduziu o número de células mortas, após exposição da cultura de fibroblastos à radiação UV. Essa exposição induziu o aumento de espécies reativas de oxigênio, a redução das mesmas ocorreu na presença do extrato de romã (PACHECO-PALENCIA et al. 2008).

Apesar de dados da literatura demonstrarem propriedades fotoprotetoras associadas aos extratos estudados nessa pesquisa, não se observou sinergismo entre os extratos de chá verde, erva-mate, ginkgo, menta, própolis e romã e o filtro solar bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina. Segundo Matsui e colaboradores, 2009, o fator de proteção solar (FPS) pode não refletir as propriedades de fotoproteção de extratos vegetais, substâncias antioxidantes e enzimas reparadoras de DNA. O extrato de chá verde não apresenta FPS elevado, porém, é capaz de proteger os danos ao DNA induzidos pela radiação UV, reduzindo o estresse oxidativo. A determinação do FPS é baseada na formação de eritema, entretanto, uma cascata de outras reações ocorre quando a pele humana é exposta à radiação UV. Diversos danos são gerados como os danos oxidativos ao DNA, a formação de dímeros de pirimidina, os danos ao DNA mitocondrial, a liberação de citocinas pró inflamatórias e imunossupressivas, a isomerização do ácido trans-urocânico para cis-urocânico (imunossupressor) e as mutações no gene p53. Dessa forma, os agentes de fotoproteção que não atuam, convencionalmente, como filtros orgânicos (químicos) ou inorgânicos (físicos) devem ser avaliados, adicionalmente, quanto à capacidade de reduzirem os danos citados anteriormente (MATSUI et al., 2009).

Embora os resultados de determinação do valor de FPS por duas metodologias distintas não tenham demonstrado propriedades fotoprotetoras nos extratos glicólicos avaliados, é um equívoco afirmar que os mesmos não possuem ação fotoprotetora, já que testes envolvendo cascatas de reações adicionais à formação de eritema não foram realizados.

6. CONCLUSÕES

As metodologias empregadas para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de formulações fotoprotetoras contendo ou não extratos glicólicos de chá verde, erva-mate, ginko, menta, própolis e romã apresentaram resultados semelhantes que demonstraram a ausência de sinergismo entre os extratos glicólicos avaliados e o filtro solar de amplo espectro bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina (Escalol[®] S) nas proporções utilizadas. O valor do FPS foi proporcional à quantidade de filtro utilizado nos resultados gerados pelo método de Mansur. Formulações com ou sem adição dos extratos glicólicos e com 2,5% p/p do filtro solar apresentaram FPS variando no intervalo de 3,57 a 4,07; enquanto que, aquelas que continham 5,0% p/p do filtro aditivadas ou não de extrato glicólico apresentaram FPS variando na faixa de 6,13 a 7,57. Os resultados gerados pelo espectrofotômetro de reflectância difusa indicaram FPS variando no intervalo de 6,0 a 7,0 para as formulações com 5,0% p/p de filtro aditivadas ou não de extrato glicólico. FPS variando no intervalo de 3,0 a 4,5 foi observado nas formulações que continham 2,5% p/p do filtro solar com ou sem adição dos extratos.

7. REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – **Anuário 2009**. Disponível em: < <http://www.abihpec.org.br>>. Acesso em: 26 jul. 2010.

BARRETO, LV.; SILVA, J.; FREITAS, ACS.; FERRAZ, JVB. A camada de ozônio e as substâncias que a destroem. Goiânia: **Enciclopédia Biosfera N.06**; Disponível em:<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2008B/a%20camada%20ozonio.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2009.

BARON, ED.; KIRKLAND, EB.; DOMINGO, DS. Advances in photoprotection. **Dermatology Nursing**. v.20, n.4, p.265-272, 2008.

BERNEBURG, M.; PLETTENBERG, H.; KRUTMANN, J. Photoaging of human skin **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v.16, p. 239–244, 2000.

BISSONNETTE, R. Update on sunscreens. **Skin Therapy Letter** v. 13, n. 6, p. 5-7, 2008.

BOYCE, PR. The impact of light in buildings on human health. **Indoor Built Environ.** v.19, p. 8-20, 2010.

BRASIL. Resolução R.E. n.47, de 16 de agosto de 2006. **Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.** Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word=Filtros%20ultravioletas>>. Acesso em: 07 jan. 2009.

BRASIL. Resolução R.E. n.237, de 22 de agosto de 2002. **Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos.** Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18298&word>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

CED/UFSC Centro de Ciências da Educação. Universidade Federal de Santa Catarina. **O espectro eletromagnético.** Disponível em: <http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/63_lampadas/incand/img/espectro_eletromagnetico.jpg>. Acesso em: 05 nov. 2010.

CESTARI, T.F. Influência da radiação ultravioleta nas infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 69, n. 2, p. 126-131, 1994.

CHO, S.; SHIN, MH.; KIM, YK., et al. Effects of Infrared Radiation and Heat on Human Skin Aging *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v.14, p.15-19, 2009.

CIBA SPECIALTY CHEMICALS. Ciba® Tinosorb S®. The highly efficient broad-spectrum UV absorber, 2002. 24 p.

CLARKE, FS. Consideraciones sobre la capa de ozono y su relación com el câncer de piel. **Revista Médica de Chile**, v.134, p.1185-1190, 2006.

COSTA F.B.; WEBER M.B. Avaliação dos hábitos de exposição ao sol e de fotoproteção dos universitários da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 79, n. 2, p. 149-155, 2004.

CRODA'S TECHNICAL DATA ON POLAWAX NF. Disponível em: <http://www.lotioncrafter.com/reference/tech_data_polawax.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2010. DIFFEY, B.L. Indices of Protection from in Vitro Assay of Sunscreens. In: _____ Lowe NJ, Shaath MA, Pathak MA. **Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects.** New York: Marcel Dekker, p.589-600, 1997.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*.** Ribeirão Preto, 2008. 176p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo].

DUTRA, E.A.; COSTA, E.; OLIVEIRA, D.A.G.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO M.I.R.M. Determination of sun protector factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 381-384, 2004.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, n. 3, p.161-174, 2002.

FILHO, K.S.O.; SARAIVA, M.F.O. Astronomia e astrofísica. **O sol – a nossa estrela**. Disponível em:< <http://astro.if.ufrgs.br/esol/esol.htm>>. Acesso em: 27 jul. 2009.

FILIPE, P., SILVA, JN., SILVA, R., *et al.* Stratum Corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZNO nanoparticle percutaneous absorption. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, p. 266-275, 2009.

FISHER, M.S., KRIPKE, M.L. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.4, p.1688-92, 1977.

FLOR, J., DAVOLOS, MR., CORRÊA MA. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FOLEY, P., NIXON R., MARKS R. et al. The frequency of reactions to sunscreens: results of a longitudinal population-based study on the regular use of sunscreens in Australia, **British Journal of Dermatology**, v. 128, p. 512–518, 1993.

FONSECA Y.M.; MARQUELE-OLIVEIRA F.; VICENTINI F.T.M.C, FURTADO N.A.J.C.; SOUSA J.P.B.; VALIMY.M.L.; FONSECA M.J.V. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, art. n.863917, 2011.

GÁLVEZ, MV. Antioxidantes en fotoprotección, realmente funcionan? **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 101, n. 3, p. 197-200, 2010.

GAMBICHLER T, LAPERRE J, HOFFMANN K. The european standard for sun-protective clothing: EN 13758. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology** 20, n. 2, p. 125-30, 2006.

GOMBAU, L., GARCÍA F., LAHOZ A., et al. *Polypodium leucotomos* extract: Antioxidant activity and disposition. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 4, p. 464-471, 2006.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614-26, 2008.

GÓNZALEZ, S, GILABERTE, Y. Fotoprotección oral. **Piel** ,v. 25, n. 4, p. 179-80, 2010.

GONZALEZ, S., GILABERTE, Y., PHILIPS, N. Mechanistic insights in the use of a *Polypodium leucotomos* extract as an oral and topical photoprotective agent. **Photochemical Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 559-563, 2010.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clavendon Press, 1985. p. 12

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A. et al. UV-induced skin damage **Toxicology**, v.189, p.21-39, 2003.

INVENTÁRIO DE COSMÉTICOS DA UNIÃO EUROPÉIA. **Cosmetic Ingredients and Substances**. Disponível em: < <http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/cosing>>. Acesso em: 17 mai 2009.

ITO, T., SEO, N., YAGITA, H., TSUJIMURA, K., TAKIGAWA, M., TOKURA, Y. Alterations of immune functions in barrier disrupted skin by UVB irradiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, p. 151-159, 2003.

JEON, HY., KIM, JK., KIM, WG., LEE, SJ. Effects of oral epigallocatechin gallate supplementation on the minimal erythema dose and UV-induced skin damage. **Skin Pharmacology Physiology**, v. 22, n.3, p.137-141, 2009.

LABSPHERE. Spectroscopy – UV-2000S. Disponível em: <<http://www.labsphere.com/productdetail.aspx?id=930&catid=>> Acesso em 09 nov. 2010.

LACHAMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. II volume, Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1517 p.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, HC.; PITTELKOW, MR. Photoprotection. **Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 528-537, 2007.

MAHMOUD, BH.; HEXSEL, CL.; HAMZAVI, IH.; LIM, HW. Effects of visible light on skin. **Photochemistry Photobiology**, v.84, n. 2, p. 450-62, 2008.

MAIER, T., KORTING, HC. Sunscreens - which and what for? **Skin Pharmacology Physiology**, v. 8, n. 6, p. 253-62, 2005.

MANSUR, J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A.; Azulay R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 61, n. 4, p. 121-124, 1986.

MATSUI, MS.; HSIA, A.; MILLER, JD.; HANNEMAN, K.; SCULL, H.; COOPER, KD.; BARON, E. Non-Sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. v.14, n. 1, p. 56-59, 2009.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, p.298–308, 2004.

MAVERAKIS, E., MIYAMURA, Y., BOWEN, M.P., CORREA, G., ONO, Y., GOODARZI H. Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**, v.34, n. 3, p.J247-J257, 2010.

MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 81-87, 2002.

MOYAL, D. UVA protection labeling and *in vitro* testing methods. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.9, n. 4, p. 516-23, 2010.

MUNDSTOCK, M.H.; FRASSON A.P.Z. Avaliação da estabilidade físico-química de bloqueadores solares FPS 30. **Revista Contexto & Saúde**, v. 5, n. 8, p. 57-66, 2005.

NASA - *National Aeronautics and Space Administration*. Disponível em: < <http://www.nasa.gov>> Acesso em: 27 jul. 2009.

NASA- *National Aeronautics and Space Administration*. The Amazing Structure of the Sun. Disponível em: < <http://son.nasa.gov/tass/content/structure.htm> > Acesso em: 27 jul. 2009. (b)

NASCIMENTO, C.S.; NUNES L.C.C; LIMA A.A.N; JÚNIOR S.G; NETO P.J.R. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p.334-339, 2009.

NELSON, DL., COX, MM. Metabolismo do DNA. In:_____ **Princípios de Bioquímica do Lehninger**. São Paulo: Sarvier, p. 940-984, 2006.

NEWMAN, MD.; STOTLAND, M.; ELLIS, JI. The safety of nanosized particles in titanium dioxide and zinc oxide based sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n.4, p. 685-692, 2009.

NICHOLS, JA.; KATYAR, SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.

NOHYNEK, GJ.; DUFOUR, EK.; ROBERTS, MS. Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? **Skin Pharmacology Physiology**, v. 21, n. 3; p. 136-49, 2008.

OLIVEIRA, S.L. **Revisão do Fator de Proteção Solar de formulações cosméticas – Estudo de otimização de protocolo utilizando a técnica fotoacústica**. São José dos Campos. 2006. 115p. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Universidade do Vale do Paraíba]

ONOE, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEMOTO, Y.; SASAKI, I.; SHINKAI, H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation **Journal of Dermatological Science**, v. 33, n.2, p. 105 -111, 2003.

PACHECO-PALENCIA L.A.; NORATTO G.; HINGORANI L.; TALCOTT S.T.; MERTENS-TALCOTT S.U. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet irradiated human skin fibroblasts. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.56, p. 8434-8441, 2008.

PALM, MD.; O'DONOGHUE, MN. Update on photoprotection. **Dermatological therapy**. v. 20, n. 5, p. 360-376, 2007.

PATHAK, MA. Photoprotection against harmful effects of solar UVB and UVA radiation: an update. In:_____ Lowe NJ, Shaath NA, Pathak MA. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker; p.59-79, 1997.

PINNELL, SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p.1-19, 2003.

RAMIREZ, R.; SCHNEIDER, J. Practical guide to sun protection. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, n. 1, p. 97-107, 2003.

RIBEIRO, R.P.; SANTOS, V.M.; MEDEIROS, E.C.; SILVA, V.A.; VOLPATO N.M.; GARCIA, S. Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 85-88, 2004.

RITTIÉ, L.; FISHER G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 4, p. 705–720, 2002.

ROSEN, CF., Topical and systemic photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 16, p.8-15, 2003.

ROUTABOUL, C., DENIS, A. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. **European Journal of Dermatology**, v.9, n.2, p. 95-99, 1999.

SANTOS, V.M.; **Preparação de filtros solares em nanosistema visando à maior ação protetora**. Rio de Janeiro. 2007. 106 p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio de Janeiro]

SAYRE, RM.; AGIN, PP; LEVEE, G.J.; MARLOWE, E. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v.29, n.3, p. 559-566, 1979.

SAYRE, RM., DESROCHERS, DL., MARLOW, E. Sunscreen testing methods: *in vitro* predictions of effectiveness. **Journal of Society of Cosmetic Chemists**, v.31, p.133-43, 1980.

SCHARFFETTER–KOCHANKE, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 7, p. 307–316, 2000.

SGARBI, FC., CARMO, ED., ROSA, LEB. Radiação ultravioleta e carcinogênese. **Revista de Ciências Médicas**, v.16, n.4-6, p. 245-250, 2007.

SHEEDY, JE; EDLICH, RF. Ultraviolet eye radiation: The problems and solutions. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2004.

SHEU, MT., LIN, CW., HUANG, MC., SHEN, CH., HO, HO. Correlation of *in vivo* and *in vitro* measurements of sun protection factor. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 2, p. 128-32, 2003.

SILVA, A.R. **Efeito de extratos vegetais com potencial antioxidante em fibroblastos submetidos à radiação UV**. Curitiba, 2009. 102p. [Dissertação de mestrado – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná].

SILVA, A.V.R. **Nossa estrela: O sol**. Editora Livraria da Física, 1ed. São Paulo, 2006. 194 p.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK. R.; FRAZIER, M. CARR, K.F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v. 380, v. 2-3, p. 155-164, 1999.

STAHL, W., SIES, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. **Mol. Biotechnology**, v. 37, n.1, p. 26-30, 2007.

SVOBODOVA, A., WALTEROVA, D., VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v.150, n.1, p.25-38, 2006.

SWINDELLS, K., RHODES, LE. Influence of oral antioxidants on ultraviolet radiation-induced skin damage in humans. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v. 20, n. 6; p. 297-304, 2004.

TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, n.7, p. 573-577, 2001.

WANG, SQ.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic Therapy**. v.23, n.1, p. 31-47, 2010.

WATSON, R.E.B.; GRIFFITHS, C.E.M. Pathogenic aspects of cutaneous photoaging **Journal of Dermatological Science.**, v.4, p. 230–236, 2005.

WEBER, MB.; PONZIO, HA.; COSTA, FB.; CAMINI L. Eritema *ab igne*: relato de um caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p.187-188, 2005.

WENDEL, V., KLETTE, E., GERS-BARLAG, H. A new *in-vitro* test method to assess the UVA protection performance of sun care products. **SÖFW**, v. 127, n.10, p. 12-31, 2001.

WILKINSON, JB., MOORE, R., **J. Cosmetologia de Harry**. Madrid: Díaz de Santos; 1990. 249-283 p.

WOLF, R., WOLF, D., MORGANTI, P., RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinical Dermatology** v. 19, n. 4, p. 452-459, 2001.

YOUNG, A.R. Are Broad-Spectrum Sunscreens Necessary for Immunoprotection? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n.4, p. ix-x, 2003.