



PODER EXECUTIVO  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICOS A PARTIR DE ATIVOS  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA

GEVERSON FAÇANHA DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química. Linha de pesquisa em Produtos Naturais e Biomoléculas – Doutorado em Química da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Manaus  
2016

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p Silva, Geverson Façanha da  
Pesquisa e Desenvolvimento de Cosméticos a Partir de Ativos  
Vegetais da Amazônia / Geverson Façanha da Silva. 2016  
169 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. Roberto Barbosa de Castilho  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Patrícia Melchionna Albuquerque  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. fitocosméticos. 2. citotoxicidade. 3. antioxidante. 4. fator de  
proteção solar. 5. antimicrobiano. I. Castilho, Dr. Roberto Barbosa  
de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

GEVERSON FAÇANHA DA SILVA

PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICOS A PARTIR DE ATIVOS  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química. Linha de pesquisa em Produtos Naturais e Biomoléculas – Doutorado em Química da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Orientador: Dr. Roberto Barbosa de Castilho - UFAM

Coorientadora: Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque - UEA

Manaus

2016

GEVERSON FAÇANHA DA SILVA

PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICOS A PARTIR DE ATIVOS  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química. Linha de pesquisa em Produtos Naturais e Biomoléculas – Doutorado em Química da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Banca Examinadora

---

Dr. Paulo Rogério da Costa Couceiro - UFAM

---

Dra. Cecilia Veronica Nunez - INPA

---

Dr. Sergio Duvoisin Junior - UEA

---

Dra. Thalita Pedroni Formariz Pilon - UNIARA

Pesquisadores Orientadores

---

Dr. Roberto Barbosa de Castilho - PPGQ/UFAM – Orientador

---

Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque – MBT/UEA – Coorientadora

Manaus, 14 de dezembro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais e avós  
que me apoiaram ao longo  
deste caminho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e capacidade que me dá para lutar e vencer todos os obstáculos e alcançar os meus objetivos.

A minha avó, dona Alexandrina, que me deu uma excelente criação formando meu caráter e personalidade me tornando um cidadão de bem.

Ao meu pai, seu Genésio, que sempre me incentivou a estudar e ir mais além.

A minha mãe, dona Raimunda, sempre torceu pela minha vitória e festejou minhas conquistas.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, Dr. Leandro Pocrifka que, com toda sua humildade, sempre esteve disposto a formar novos Mestres e Doutores com alta performance.

Ao curso de Engenharia Química pela infraestrutura tornando possível a realização do meu trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida e aos programas institucionais financiados por ela (Bionorte e Pró-Amazônia).

Ao meu orientador Dr. Roberto Barbosa de Castilho que acreditou no meu trabalho e na minha capacidade me incentivando a ir mais além.

À minha orientadora Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque que ao longo desses anos de trabalho tornou-se mais que uma mentora, tornou-se parte de minha família, acreditando em todas minhas ideias, enfrentando todos os desafios ao meu lado, sorrindo e chorando junto comigo, segurando minha mão me dando forças para levantar, para que um dia eu pudesse ser um verdadeiro Doutor.

Aos membros de minha banca: Dra. Thalita Pedroni Formariz Pilon coordenadora do curso de Farmácia do Centro Universitário de Araraquara – São Paulo por ter aceito o convite em contribuir com este trabalho; Dr. Paulo Rogério da Costa Couceiro da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) que desde a minha graduação, me proporciona valiosos ensinamentos; Dr. Sergio Duvoisin Júnior da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) que por sua obstinação proporcionou equipamentos para a realização de diversas atividades; em especial a Dra. Cecília Veronica Nunez do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), tem feito parte de todas as minhas bancas, qualificação e defesa de mestrado, qualificação e defesa de doutorado, e contribui ativamente com seu grande conhecimento, a qual tenho grande admiração por sua garra e trabalho desenvolvido.

A todos os meus colegas de laboratório, alunos e amigos, MSc. Andrea Fischborn, Dr. Rafael Lopes, MSc. Sthefanny Caroline, Técnica Adriana Rosa, Técnica Sarah Loiola, Engenheiros

Dayvison Coelho, Valeska Jezini, Layne Gontijo e os acadêmicos Larissa Ipuchima, Pedro Henrique, Edson Queiroz, Andressa Oliveira, André Monteiro, Gisella Pazuello, Camilla Rizzato, David Marlon, Hiran Gonçalves, Carol Abitbol, Anne Freire, Johmar Souza e Gabriel Assis, que me auxiliaram de forma direta ou indireta na execução das minhas atividades e pelos momentos de descontração, festas e muitos outros que ficarão na lembrança.

Agradeço também a todos os meus amigos que de algum modo fizeram parte da minha vida e contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Obrigado!

*“Cada um escolhe a sua felicidade!!!”*



## RESUMO

O estudo relacionado ao emprego de produtos naturais, como extratos vegetais e óleos essenciais, que apresentem atividades biológicas que possam ser usadas na indústria cosmética, vem aumentando intensamente. Pesquisas demonstram que várias plantas que fazem parte de nosso cotidiano têm apresentado grande potencial químico por seus efeitos farmacológicos, tais como atividade antimicrobiana, antioxidante, fotoprotetora e ainda podem apresentar baixa toxicidade. A Amazônia dispõe de uma rica biodiversidade que estimula a pesquisa de biomoléculas ativas que agreguem valor tecnológico ao serem incorporadas em fitocosméticos. No presente trabalho estudou-se a casca-preciosa (*Aniba canelilla*) visando a obtenção de fitocosméticos, obtendo-se óleos essenciais e extratos etanólicos de folhas e galhos finos que foram submetidos à partição líquido-líquido. Foram realizados ensaios de atividade antioxidante, pelo sequestro do radical livre DPPH e pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, de determinação do fator de proteção solar (FPS), pelo método espectrofotométrico de Mansur, de atividade antimicrobiana, por difusão em ágar e de citotoxicidade frente à *Artemia salina*. Os componentes ativos foram monitorados e separados por diferentes técnicas cromatográficas tais como, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna aberta (CCA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os óleos essenciais foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Os extratos ativos passaram por uma triagem fitoquímica e após a purificação dos extratos, as moléculas ativas foram elucidadas por espectrometria de massa (EM). Para a atividade antioxidante, os extratos ativos foram obtidos da fase hidroalcoólica de folhas e galhos, encontrando as moléculas ácido protocatecuico nas folhas e luteolina nos galhos. O FPS apresentou-se maior nos extratos da fase diclorometânica das folhas e dos galhos, encontrando-se as moléculas ativas ácido cinâmico nas folhas e ácido siríngico nos galhos. Para a atividade antimicrobiana, apenas os óleos essenciais de folhas e galhos foram ativos contra os fungos *Aspergillus brasiliensis*, *Didymella bryoniae* e *Candida albicans*, sendo que as bactérias avaliadas não foram inibidas. A atividade antifúngica foi atribuída a substância majoritária presente no óleo essencial de preciosa, o 1-nitro-2-feniletano, em uma possível ação sinérgica com o cariofileno. Os óleos essenciais de folhas e galhos, assim como a fase hidroalcoólica dos galhos apresentaram toxicidade contra a *Artemia salina*. Considerando as atividades encontradas, foram formulados: (i) uma emulsão antioxidante; (ii) uma emulsão fotoprotetora; e (iii) um sabonete líquido íntimo contra cândida. As formulações foram elaboradas e avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos e físico-químicos. Após serem submetidas aos testes de estabilidade preliminar notou-se que a emulsão antioxidante não deve ser submetida à temperaturas superiores a 40 °C pois a desestabiliza e provoca alterações de pH comprometendo a integridade da formulação. A emulsão fotoprotetora apresentou

pequenas variações, após ser submetida a mudanças bruscas de temperatura, e o sabonete líquido íntimo apresentou-se estável durante todas as análises. Assim, com este estudo verifica-se que os extratos e óleos essenciais de folhas e galhos finos de *A. canelilla* podem ser incorporados em cosméticos, agregando atividades biológicas aos mesmos. Estudos completos de desenvolvimento de formulações devem ser realizados, a fim de otimizar o preparo dos fitocosméticos e alcançar uma maior estabilidade físico-química. Estudos mais abrangentes de toxicidade também devem ser realizados, a fim de garantir a segurança dos produtos quando em contato com a pele.

**Palavras-chave:** fitocosméticos, produtos naturais, antioxidante, fator de proteção solar, antimicrobiano, citotoxicidade.

## ABSTRACT

The study regarding the employment of natural products, as plant extracts and essential oils, that present biological activities and can be used in the cosmetic industry, has increased intensely. Researches demonstrate that several plants that are part of our lives have presented a significant chemical potential due to their pharmacological effects, such as antimicrobial and antioxidant activities, and photoprotection effects, along with low toxicity. The Amazon has a rich biodiversity that stimulates the search for active biomolecules that add technological value when incorporated into phytocosmetics. In the present work, the plant casca-preciosa (*Aniba camelilla*) was studied, aiming the formulation of phytocosmetics, acquiring its essential oils and ethanolic extracts from leaves and branches, that were submitted to a liquid-liquid partition. Antioxidant activity was assessed by the free radical DPPH scavenging method, as well as by the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system. Solar protection factor (SPF) was evaluated through the spectrophotometric method described by Mansur. Antimicrobial activity was tested by agar diffusion method, and the cytotoxicity was assessed against *Artemia salina*. The active compounds were monitored and separated by different chromatographic techniques, such as thin layer chromatography (TLC), column chromatography (CC), and high efficiency liquid chromatography (HPLC). The essential oils were characterized by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The active extracts were submitted to a phytochemical screening, and after purification of the extracts, the active molecules were elucidated by mass spectrometry (MS). Concerning the antioxidant activity, the active molecules were obtained from the hydroalcoholic phase of leaves and branches, and characterized as protocatechuic acid in leaves and luteoline in the branches. The SPF was higher in the dichloromethane phase from leaves and branches, and the active molecules were characterized as cinnamic acid in leaves and syringic acid in the branches. Only the essential oils of leaves and branches were active against the fungi *Aspergillus brasiliensis*, *Didymella bryoniae* and *Candida albicans*. None of the tested bacteria was inhibited. The antifungal activity was probably due to the major component of the casca-preciosa essential oil, 1-nitro-2-phenylethane, acting synergistically with cariophyllene. The essential oils of leaves and branches, as well as the hydroalcoholic phase from the branches presented toxicity against *A. salina*. Considering the found biological activities, it was formulated: (i) an antioxidant emulsion; (ii) a photoprotecting emulsion; and (iii) an anticandida liquid soap. The formulations were elaborated and evaluated regarding its organoleptic and physical-chemical parameters. After being submitted to the preliminary stability tests, it was noticed that the antioxidant emulsion should not be submitted to temperatures above 40°C, since it leads to pH variations and instability, committing the integrity of the formulation. The photoprotecting emulsion presented minor variations, after being

submitted to abrupt changes of temperature, and the anticandida liquid soap was stable during all the analyses. Therefore, with this study it is verified that the extracts and essential oils of *A. canelilla* leaves and branches can be incorporated in cosmetics, adding biological activities to them. Further studies regarding the development of formulations should be accomplished, in order to optimize the preparation of the phytocosmetic, and to reach a better physical-chemistry stability. Toxicity studies should also be accomplished, in order to guarantee the safety of the products when in contact with the skin.

**Key-words:** phytocosmetics, natural products, antioxidant, solar protection factor, antimicrobial, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas e flores de <i>Aniba canelilla</i> (casca-preciosa).....	34
Figura 2 - Estrutura química do composto majoritário do óleo essencial de <i>Aniba canelilla</i> . .....	34
Figura 3 - Estrutura química de constituintes do óleo essencial de <i>Aniba canelilla</i> . .....	35
Figura 4 - Estrutura química de componentes espessantes utilizados em formulações cosméticas. .....	36
Figura 5 - Estrutura química de um surfactante aniônico utilizado em formulações cosméticas como agente perolizante. ....	37
Figura 6 - Estrutura química dos conservantes parabenos utilizados em formulações cosméticas. .....	37
Figura 7 - Estrutura química do agente quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético). .....	38
Figura 8 - Estrutura química de agentes refrescantes utilizados em cosméticos.....	39
Figura 9 - Estrutura química do componente utilizado como corretor de pH ácido cítrico. ....	40
Figura 10 - Estrutura das micelas, formadas pela associação de moléculas de surfactantes. ....	42
Figura 11 - Estrutura química do surfactante aniônico lauril éter sulfato de sódio. ....	43
Figura 12 - Estrutura química do surfactante não iônico dietanolamida de ácido graxo de coco. .	43
Figura 13 - Estrutura química geral do trimetilamônio quaternário.....	44
Figura 14 - Estrutura química do surfactante anfótero betaínico.....	45
Figura 15 - Classificação das emulsões de acordo com a natureza das fases dispersa e interna.....	46
Figura 16 - Fotomicrografia de uma emulsão múltipla. ....	47
Figura 17 - Anatomia da pele.....	48
Figura 18 - Camadas que compõe a epiderme. ....	50
Figura 19 - Estruturas químicas de mono e sesquiterpenos com ação antifúngica. ....	55

Figura 20 - Estrutura química geral de um flavonóide e um diterpeno.....	57
Figura 21 - Curva analítica do ácido ascórbico utilizada para determinação da Concentração Eficiente (CE <sub>50</sub> ). As linhas tracejadas representam o limite de confiança em 95%.....	73
Figura 22 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para o extrato etanólico das folhas de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). .....	76
Figura 23 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase diclorometânica das folhas de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). ....	76
Figura 24 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hexânica das folhas de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). .....	77
Figura 25 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hidroalcoólica das folhas de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). .....	77
Figura 26 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para o extrato etanólico dos galhos de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). .....	78
Figura 27 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase diclorometânica dos galhos de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). ....	78
Figura 28 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hexânica dos galhos de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). .....	79
Figura 29 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hidroalcoólica dos galhos de <i>Aniba canelilla</i> submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). ....	79

Figura 30 - Gráfico de mortalidade das larvas de <i>Artemia salina</i> expostas aos extratos da fase hidroalcoólica de folhas (a) e de galhos (b) de <i>Aniba canelilla</i> . .....	82
Figura 31 - Cromatograma da fração F10 obtida da fase hidroalcoólica de folhas de <i>Aniba canelilla</i> . .....	85
Figura 32 - Espectro de íons totais em modo negativo do ácido protocatecuico obtido por espectrometria de massa da fração F10 obtido de folhas de <i>Aniba canelilla</i> . .....	86
Figura 33 - Espectro de íons totais em modo negativo da luteolina obtida por espectrometria de massa da amostra G2 obtido de galhos de <i>Aniba canelilla</i> . .....	87
Figura 34 - Mecanismo de reação para a formação dos íons fragmentos $^{1,3}A^-$ e $^{1,3}B^-$ para luteolina e via de fragmentação para flavonoides pelo rompimento de ligação no anel. ....	88
Figura 35 - Gráfico das análises de: a - densidade (g/mL) sem diferença estatística entre os grupos e b - análises de pH apresentando diferença estatística entre as formulações. ....	90
Figura 36 - Gráfico das análises de: a - condutividade elétrica ( $\mu S/cm$ ) sem diferença estatística entre as formulações e os grupos e b - espalhabilidade apresentando diferença estatística entre os grupos. ....	91
Figura 37 - Gráfico das análises de atividade antioxidante das formulações elaboradas com extratos hidroalcoólicos de folhas e galhos de <i>Aniba canelilla</i> . Controle: Sem antioxidante e BHT: Butilhidroxitolueno com EHF: Extrato Hidroalcoólico de Folhas e EHG: Extrato Hidroalcoólico de Galhos. ....	92
Figura 38 - Massas e rendimentos dos extratos etanólicos e partições líquido-líquido obtidos de folhas e galhos secos de <i>Aniba canelilla</i> . .....	103
Figura 39 - Espectros de absorção dos extratos, partições e óleos essenciais de folhas (a) e de galhos (b) de <i>Aniba canelilla</i> e de um protetor solar comercial. ....	105
Figura 40 - Cromatografia em camada delgada da fase diclorometano de folhas (1) e de galhos (2) de <i>Aniba canelilla</i> , utilizando diclorometano/acetato de etila (8:2) como fase móvel e sílica gel como fase estacionária, sob luz UV a 365 nm. ....	107

Figura 41 - Cromatografia em Camada Delgada após a Cromatografia em Coluna Aberta da partição diclorometano dos Galhos (Frações 27-37) eluídas com diclorometano e fase estacionária sílica-gel sob luz UV de 254 nm (a) e 365 nm (b). .....	107
Figura 42 - Cromatograma das frações G, G4, G5 e G6 obtidas da fase diclorometânica de galhos de <i>Aniba canelilla</i> . .....	108
Figura 43 - Espectro de íons totais em modo negativo do ácido cinâmico obtido por espectrometria de massa da amostra F13 (fração obtida da fase diclorometânica de folhas de <i>Aniba canelilla</i> ). .....	111
Figura 44 - Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra F13. 111	
Figura 45 - Espectro de íons totais em modo negativo do ácido siríngico obtido por espectrometria de massa da amostra G4 (fração obtida da fase diclorometânica de galhos de <i>Aniba canelilla</i> ). .....	112
Figura 46 - Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra G4. 112	
Figura 47 - Emulsões obtidas após 24 h de sua elaboração com extrato de <i>Aniba canelilla</i> (a); com benzofenona (c); e sem ativo fotoprotetor (c). .....	115
Figura 48 - Gráfico de mortalidade de <i>Artemia salina</i> exposta aos extratos etanólicos das folhas (a) e dos galhos (b) de <i>Aniba canelilla</i> . .....	134
Figura 49 - Gráfico de mortalidade de <i>Artemia salina</i> exposta às fases hexânicas das folhas (a) e dos galhos (b) de <i>Aniba canelilla</i> . .....	135
Figura 50 - Gráfico de mortalidade de <i>Artemia salina</i> exposta às fases hidroalcoólicas das folhas (a) e dos galhos (b) de <i>Aniba canelilla</i> . .....	135
Figura 51 - Gráfico de mortalidade de <i>Artemia salina</i> exposta aos óleos essenciais das folhas (a) e dos galhos (a) de <i>Aniba canelilla</i> . .....	136



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cosméticos elaborados a partir de extratos, óleos ou manteigas de espécies vegetais brasileiras. ....	31
Tabela 2 - Tipo, aparência da emulsão e tamanho da partícula da fase interna. ....	47
Tabela 3 - Classificação da proteção UVA em função do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ). ....	59
Tabela 4 - Atividade antioxidante expressa em porcentagem de inibição com os cálculos da concentração eficiente ( $CE_{50}$ ) expressa em $\mu\text{g/mL}$ para os extratos, partições e óleos essenciais de folhas e galhos dos períodos de cheia e seca. ....	72
Tabela 5 - Resultados da atividade antioxidante para os extratos e partições obtidos de folhas e galhos de <i>Aniba canelilla</i> no período da seca expressos em porcentagem de proteção do ácido linoléico (%P). ....	81
Tabela 6 – Atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) obtida para as frações reunidas, após separação por cromatografia em coluna aberta da fase hidroalcoólica das folhas de <i>Aniba canelilla</i> . ....	84
Tabela 7 – Atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) obtida para frações reunidas, após separação por Cromatografia em Coluna Aberta da fase hidroalcoólica dos galhos de <i>Aniba canelilla</i> . ....	85
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos analisados 24 horas após o preparo das formulações das emulsões, após o estresse térmico e ciclo gela-degela.....	89
Tabela 9 - Parâmetros in vivo para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS).....	97
Tabela 10 - Classificação em estrelas segundo a razão UVA/UVB.....	98
Tabela 11 - Composição das formulações de emulsões fotoprotetoras I, II e III.....	101
Tabela 12 - Valores de FPS e razão UVA/UVB calculados para padrões e para os extratos, partições e óleos essenciais de galhos e folhas de <i>Aniba canelilla</i> .....	104

Tabela 13 – Fator de Proteção Solar e razão UVA/UVB obtidos das frações reunidas, após separação por Cromatografia em Coluna Aberta da fase diclorometânica das folhas de <i>Aniba canelilla</i> . .....	109
Tabela 14 – Fator de Proteção Solar e razão UVA/UVB obtidos das frações reunidas, após separação por Cromatografia em Coluna Aberta da fase diclorometânica dos galhos de <i>Aniba canelilla</i> . .....	110
Tabela 15 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas após 24 h do preparo das emulsões. ....	115
Tabela 16 - Resultados obtidos das análises físico-químicas após a produção, teste estresse térmico, proteção contra a luz, ciclo gela-degela e exposto a luz solar.....	117
Tabela 17 - Atividade antimicrobiana de óleos essenciais, extratos e partições de folhas e galhos de <i>Aniba canelilla</i> obtida por difusão em ágar, expressa em média $\pm$ desvio-padrão da média do diâmetro do halo de inibição (mm).....	128
Tabela 18 - Análise fitoquímica dos extratos, partições e óleos essenciais de folhas e galhos de <i>Aniba canelilla</i> . ....	129
Tabela 19 - Composição química do óleo essencial de folhas e galhos de <i>Aniba canelilla</i> . ....	132
Tabela 20 - Concentração de letalidade média (CL <sub>50</sub> ) dos metabólitos de <i>Aniba canelilla</i> frente à <i>Artemia salina</i> . ....	134
Tabela 21 - Parâmetros físico-químicos das formulações de sabonetes líquidos.....	137
Tabela 22 - Parâmetros organolépticos observados nas formulações de sabonetes líquidos. ....	139

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 HISTÓRIA DOS COSMÉTICOS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2 O MERCADO DE COSMÉTICOS NO BRASIL</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3 FITOCOSMÉTICOS: PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL EM COSMÉTICOS</b> .....	<b>30</b>
2.3.1 EXTRATOS VEGETAIS .....	32
2.3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	32
<b>2.4 ESPÉCIES AMAZÔNICAS DE INTERESSE PARA USO EM COSMÉTICOS</b> .....	<b>33</b>
2.4.1 CASCA-PRECIOSA.....	33
<b>2.5 CONSTITUINTES COSMÉTICOS</b> .....	<b>36</b>
2.5.1 AGENTE ESPESANTE.....	36
2.5.2 AGENTE PEROLIZANTE.....	36
2.5.3 AGENTE CONSERVANTE.....	37
2.5.4 AGENTE QUELANTE.....	37
2.5.5 AGENTE EMOLIENTE .....	38
2.5.6 AGENTE REFRESCANTE .....	38
2.5.7 ADITIVOS .....	39
<b>2.6 PRODUTOS COSMÉTICOS</b> .....	<b>40</b>
2.6.1 SABONETE.....	40
2.6.2 EMULSÕES.....	45
<b>2.7 DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO COSMÉTICO</b> .....	<b>50</b>
2.7.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AVALIADOS EM COSMÉTICOS.....	51
<b>2.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE INTERESSE EM COSMÉTICOS</b> .....	<b>53</b>
2.8.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	54
2.8.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	56
2.8.3 FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR.....	57
2.8.4 CITOTOXICIDADE.....	59

<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>61</b>
<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>ANIBA CANELILLA</i>, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	63
3.2.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	64
3.2.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	67
3.2.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS E EXTRATOS DE <i>ANIBA CANELILLA</i> .....	67
3.2.5 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA (CCA) .....	68
3.2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	69
3.2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	69
3.2.7 PREPARO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS .....	69
3.2.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	70
3.2.9 TESTE DE EFICÁCIA (ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA EMULSÃO).....	71
3.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	71
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
3.3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL, EXTRATOS ETANÓLICOS E PARTIÇÕES.....	71
3.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO DPPH .....	71
3.3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO .....	75
3.3.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FASES ATIVAS .....	81
3.3.5 ANÁLISE QUALITATIVA DOS METABÓLITOS PRESENTES NAS FASES HIDROALCOÓLICAS DE FOLHAS E GALHOS DE <i>ANIBA CANELILLA</i> .....	83
3.3.6 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DA FASE HIDROALCOÓLICA.....	83
3.3.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	85
3.3.8 FORMULAÇÃO COSMÉTICA .....	89
3.3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FORMULAÇÕES .....	91
<b>3.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
 <b>CAPÍTULO 4.....</b>	 <b>93</b>
<b>AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>ANIBA CANELILLA</i>, ESTUDO QUÍMICO E INCORPORAÇÃO EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA.....</b>	<b>94</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>94</b>

<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>95</b>
4.2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	95
4.2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS .....	96
4.2.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	96
4.2.4 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) .....	96
4.2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE <i>ANIBA CANELILLA</i> ..	98
4.2.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	99
4.2.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA (CCA).....	100
4.2.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	100
4.2.9 ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	100
4.2.10 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COM ATIVIDADE FOTOPROTETORA.....	100
4.2.11 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	102
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
4.3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL, EXTRATOS E PARTIÇÕES DE <i>ANIBA CANELILLA</i>	103
4.3.2 ANÁLISE DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR .....	103
4.3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DOS METABÓLITOS DE <i>ANIBA CANELILLA</i> .....	106
4.3.4 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FASE DICLOROMETANO .....	106
4.3.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	111
4.3.6 ESTABILIDADE DAS EMULSÕES.....	114
<b>4.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>118</b>
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>119</b>
<b>DESENVOLVIMENTO DE UM SABONETE LÍQUIDO ÍNTIMO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>ANIBA CANELILLA</i>.....</b>	<b>120</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>120</b>
<b>5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
5.2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	121
5.2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	121
5.2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES .....	121
5.2.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	122
5.2.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	123
5.2.6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS CLASSES QUÍMICAS NOS EXTRATOS, PARTIÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	124
5.2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	125
5.2.8 FORMULAÇÃO DO SABONETE LÍQUIDO .....	125

5.2.9 TESTES DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO .....	125
5.2.10 TESTE DE EFICÁCIA (ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO SABONETE LÍQUIDO) .....	126
5.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	127
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>127</b>
5.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	127
5.3.2 ANÁLISE DAS CLASSES QUÍMICAS PRESENTES NOS EXTRATOS, PARTIÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	129
5.3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>ANIBA CANELILLA</i> .....	131
5.3.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	133
5.3.5 DESENVOLVIMENTO DO SABONETE LÍQUIDO ÍNTIMO.....	136
<b>5.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>140</b>
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>141</b>
6 CONCLUSÃO GERAL.....	142
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

# Capítulo 1

---

## Introdução

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Há milhares de anos, plantas e produtos naturais de origens diversas vêm sendo utilizados com finalidades medicinais. Inicialmente, o emprego de plantas dava-se na forma de tinturas, chás, cataplasmas e pós, entre outras formulações farmacêuticas (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Ao conhecimento tradicional agregou-se, posteriormente, uma base científica sólida, resultando no desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento de diferentes doenças humanas (LEE, 2004).

A Amazônia, detentora de grande quantidade de recursos naturais, pode ser fonte de estudos sobre matérias-primas para as indústrias de medicamentos e cosméticos, o que possibilitaria um maior desenvolvimento científico e econômico da região, e a implantação de novas indústrias para a obtenção de óleos essenciais e extratos (CARVALHO, 2015<sup>[GF1]</sup>). A região amazônica possui várias espécies vegetais que necessitam de uma maior investigação química e farmacológica para a otimização de seus potenciais biotecnológicos, promovendo assim o desenvolvimento de bioprodutos para a área médica e farmacêutica de forma sustentável (MAIA e ANDRADE, 2009).

Segundo Dweck (2009), as plantas produzem diversas substâncias ativas, seja para proteger seus frutos e folhas de pragas, suportar exposições diretas do sol, dentre muitas outras funções. Na maioria das vezes, estes ativos agem por meio de sinergismo com outros componentes. Tais componentes, para serem extraídos e utilizados em algum bioproduto, necessitam de métodos de extração e conservação adequados, bem como de adequado solo de cultivo, incidência solar, taxa de precipitação, entre outros fatores que interferem no metabolismo vegetal.

Algumas espécies, mesmo sem um profundo conhecimento científico, vêm sendo comercializadas em feiras regionais, com a planta seca e triturada em forma de sachês, pedaços das cascas do tronco ou folhas secas, como por exemplo, a casca-preciosa (*Aniba canelilla*), muito utilizada na medicina tradicional da região amazônica contra diversos males (SILVA, 1977; INTERAMINENSE et al., 2010). Segundo Lahlou *et al.* (2005), as cascas do caule de *A. canelilla* possuem um teor de óleo essencial de aproximadamente 1% do peso seco da planta, cujo constituinte principal é o 1-nitro-2-feniletano, responsável pelo cheiro conferido à espécie que se assemelha ao da canela. Nitroderivados encontrados em plantas são raros, e no caso do 1-nitro-2-feniletano, a biossíntese envolve a oxidação do aminoácido fenilalanina seguida por descarboxilação espontânea (SIQUEIRA *et al.* 2010).

Diversas atividades biológicas já foram descritas para os metabólitos de *A. canelilla*, tais como, vasorrelaxante (INTERAMINENSE *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2013; ARRUDA-BARBOSA



*et al.*, 2014), cardiovascular (LAHLOU, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2010; INTERAMINENSE *et al.*, 2011), antinociceptiva (LIMA *et al.*, 2009), antioxidante (SILVA *et al.*, 2007; MARTINS, 2016), antimicrobiana (SILVA, 2012), citotóxica (SILVA *et al.*, 2007), citoprotetora (COSKER *et al.*, 2014), anti-inflamatória (VALE *et al.*, 2013), inibitória da acetilcolinesterase (SILVA *et al.*, 2014), hipnótica, anticonvulsiva, ansiolítica (OYEMITAN *et al.*, 2013), fotoprotetora (MARTINS, 2016) e antiulcerogênica (DE BARROS, 2015).

Uma forma de agregar valor aos recursos naturais da Amazônia, por exemplo, envolve a transformação do material vegetal detentor de atividade biológica em um fitocosmético, que pode ser definido como um cosmético que contém ativo natural, seja um extrato, óleo fixo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto (ISAAC *et al.*, 2008).

A adição de extratos, ceras, óleos fixos e essenciais em produtos cosméticos agrega benefícios e valor comercial aos mesmos, pois devido à presença de metabólitos secundários como os fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros, confere-se uma série de atividades clínicas desejadas pela indústria cosmética, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antienvhecimento e fotoprotetora (MARTINS, 2016; GURIB-FAKIM, 2006). Seguindo esta tendência, surge a necessidade de estudos científicos que comprovem os efeitos benéficos desses componentes quando adicionados em diferentes formulações cosméticas, visando garantir sua eficácia e segurança (BALOGH, 2011). Da mesma forma, um fitocosmético ao ser formulado precisa de estudos de estabilidade física e química, pois a substituição de um ou mais componentes da formulação implica em mudanças das características físico-químicas da mistura final (BORELLA *et al.*, 2010).

O desenvolvimento científico e tecnológico ao longo dos anos promoveu um grande avanço na pesquisa de produtos naturais. Impulsionado principalmente pelo apelo que a biodiversidade exerce sobre as pessoas, nota-se um grande aumento no uso de produtos naturais em substituição aos derivados minerais e animais (FUNARI e FERRO, 2005). A vegetação amazônica, devido à sua rica biodiversidade e o grande potencial biotecnológico, pode ser usada para obtenção de fitocosméticos.

Sendo assim, o presente estudo pretende contribuir para viabilizar a utilização de óleos essenciais e extratos de uma espécie da Amazônia em formulações cosméticas, verificando o potencial biológico destes componentes e a aplicabilidade de interesse industrial da *Aniba canelilla* para subsidiar a elaboração de produtos fitocosméticos assegurando sua eficácia e qualidade.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial de extratos e óleos essenciais de *Aniba canelilla* detentores de atividade biológica para o desenvolvimento de fitocosméticos.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a atividade antioxidante de extratos e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* por reação direta e indireta;
2. Investigar o fator de proteção solar (FPS) dos extratos e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla*;
3. Avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana de extratos e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla*;
4. Mensurar a atividade citotóxica de extratos e óleos essenciais das amostras que apresentam atividade biológica de interesse;
5. Analisar qualitativamente os constituintes químicos de extratos e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla*;
6. Isolar as substâncias biologicamente ativas das amostras promissoras por técnicas cromatográficas nos extratos e óleos selecionados;
7. Caracterizar quimicamente as substâncias ativas;
8. Desenvolver produtos cosméticos a partir dos extratos e/ou óleos essenciais com a atividade biológica de interesse;

## Capítulo 2

---

### Revisão Teórica

## 2.1 HISTÓRIA DOS COSMÉTICOS

A palavra ‘cosmético’ origina da palavra grega *kosmetivós*, que significa “hábil em adornar”. Existem evidências arqueológicas do uso de cosméticos para embelezamento e higiene pessoal desde 4000 a.C. Os primeiros registros tratam dos egípcios, que pintavam os olhos com sais de antimônio para evitar a contemplação direta do deus Ra, representado pelo sol. Para proteger sua pele das altas temperaturas e secura do clima desértico da região, os egípcios recorriam à gordura animal e vegetal, cera de abelhas, mel e leite no preparo de cremes para a pele. No Egito Antigo as mulheres usavam pó de Kajal e outros pigmentos como maquiagem e banhavam-se com água de carbonato no rio Nilo. Cleópatra (69 a.C.), a última rainha do Egito que até a atualidade é lembrada como sinônimo de beleza, desfrutava de seus conhecidos banhos de leite de cabra e sua maquiagem (PANDOLFO, 2010).

Os primeiros povos a produzirem sabões foram os gregos, seguidos dos romanos, e eram preparados a partir de extratos vegetais do Mediterrâneo, como o azeite de oliva e o óleo de pinho, e também a partir de outros minerais alcalinos obtidos a partir da moagem de rochas. Atores do teatro romano, para compor seus personagens, eram grandes usuários de maquiagens produzidas com diversos tipos de óleos, pigmentos naturais, vegetais e minerais, porém, muitos pigmentos minerais continham chumbo ou mercúrio na sua composição levando vários atores à morte por intoxicação (GALEMBECK e CSORDAS, 2011).

Na época do Império Romano (150 a. C.), o médico Cláudio Galeno desenvolveu um produto a base de cera de abelhas e bórax que era conhecido como *Unguentum Refrigerans*, um creme frio (*cold cream*) que produzia uma sensação refrescante ao entrar em contato com a pele, liberando a fase interna aquosa, considerado o ponto de partida para a era galênica dos produtos químico-farmacêuticos. Mais tarde, o óleo de amêndoas substituiu o azeite e a incorporação de bórax contribuiu para a formação da emulsão, minimizando o tempo de processo. Estava aí a primeira base para sustentar os pigmentos de dióxido de titânio e facilitar a aplicação na face; nascia a base cremosa facial (PANDOLFO, 2010; GALEMBECK e CSORDAS, 2011).

Na Idade Moderna (séculos XVII e XVIII), era muito comum em Paris a venda de cosméticos, pomadas, azeites, águas aromáticas, sabonetes e outros artigos de beleza. Em 1725, Giovanni Maria Faria estabeleceu-se em Colônia, na Alemanha, onde criou a famosa água de colônia. Entretanto, foi a partir do século XX que surgiram as primeiras indústrias de cosméticos. Helena Rubinstein foi pioneira e revolucionou os conceitos de tratamentos de beleza tradicionais, criando, a partir de muita pesquisa, fórmulas inovadoras, consideradas milagrosas, para combater rugas e os efeitos do vento e do sol sobre a pele. Essas fórmulas seriam retomadas mais tarde por

toda a indústria cosmética mundial. Visionária, abriu em 1902 um instituto de beleza, associando pela primeira vez a dermatologia à cosmética (DE QUEIROZ *et al.*, 2013).

Durante os anos 1970 e 1980 os aparelhos de *laser* e os ácidos retinóico e glicólico começaram a ser empregados no tratamento de rugas e manchas, e os filtros solares tomaram espaço no mercado mundial e nacional. Já nos anos 1990 surgiram os cosméticos multifuncionais, como batons com protetor solar e hidratantes que previnem o envelhecimento. Com a entrada do século XXI, ficaram cada vez mais claros os benefícios dos cosméticos sobre a pele, cabelos e unhas. Surge, então, a denominação “cosmecêutico”, que remete a um produto de tecnologia mais avançada e consequente ação fisiológica comprovada. Atualmente as pesquisas avançam na direção da descoberta de matérias-primas cada vez mais eficazes, atuando na qualidade celular e no rejuvenescimento sem intervenção cirúrgica (SIMILI e SOUZA, 2015).

Nos últimos anos, os cosméticos com ingredientes naturais em sua formulação têm ampliado seu mercado, pois os consumidores estão mais adeptos da consciência ambiental e destacam o interesse pela flora brasileira. Em vista disso, várias espécies têm sido utilizadas para estudo de estabilidade física e química de formulações fitocosméticas, como as emulsões O/A desenvolvidas por Lima *et al.* (2008) contendo óleo de babaçu, cremes e géis contendo semente e extratos de uva (SOUZA e FERREIRA, 2010), extratos de catuaba e marapuama (VELASCO *et al.*, 2008), emulsões com óleo de andiroba (FERRARI *et al.*, 2007), dentre muitos outros.

A indústria de cosméticos moderna busca, então, receitas para o rejuvenescimento, hidratação e relaxamento da pele e do cabelo a partir de matérias primas da floresta amazônica, transformando óleos essenciais e extratos em géis, cremes, xampus, condicionadores, etc. (LEITE, 2009). Neste contexto, as plantas amazônicas ganham um destaque especial pois, com uma rica biodiversidade, a floresta possui plantas aromáticas, produtoras de óleos essenciais, que podem ser empregadas em diversas formulações.

## 2.2 O MERCADO DE COSMÉTICOS NO BRASIL

No Brasil, de acordo com a RDC N° 211, de 14 de julho de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cosméticos, produtos de higiene e perfumes “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”.

Portanto, o segmento de higiene pessoal é composto por sabonetes, xampus, condicionadores, desodorantes, produtos de higiene bucal e de barbear. Já o segmento de cosmético é composto por maquiagens, protetores e bronzeadores solares, produtos para o cabelo, cremes e loções para o rosto e corpo. Por fim, no segmento de perfumes estão os sais e óleos para banho, extratos e os perfumes. Há também um segmento voltado exclusivamente para produtos de higiene infantil, composto por talcos, sabonetes, xampus, entre outros artigos (CALIARI, 2002).

No Brasil, as grandes indústrias de cosméticos, como a Avon e a L'Oréal, só chegaram na década de 1950, devido a políticas de incentivo. Essas novas empresas lançaram a venda direta e os produtos de beleza para o público feminino (GALEMBECK e CSORDAS, 2011). Segundo Silva e Tobias (2007), a primeira fábrica nacional de cosméticos foi a Natura, fundada em 1969. Começou como uma pequena loja e um laboratório em São Paulo (SP), e com a ideia de incorporar a seus serviços uma abordagem personalizada, oferecendo produtos diferenciados para o clima úmido do País e para os vários tipos de peles locais. Além desse diferencial, a empresa passou a investir no sistema de vendas diretas, com vendas porta-a-porta, que permitia o contato direto e personalizado da empresa com seus clientes. A Natura é atualmente a maior empresa brasileira de cosméticos e mantém a liderança desde 2001, quando superou sua concorrente Avon (AYRES, 2016).

Outra importante fábrica brasileira é O Boticário, que teve sua origem em 1977, em Curitiba (PR), em uma pequena farmácia de manipulação chamada A Botica. Além do aviamento de receitas, uma linha própria de cosméticos naturais começou a ser desenvolvida, e seus primeiros produtos, xampus e cremes para cabelo, obtiveram enorme sucesso. Foi o primeiro passo para o surgimento de O Boticário. O passo seguinte foi a abertura de uma loja no aeroporto de Curitiba, em 1979, quando um número expressivo de pessoas teve a oportunidade de conhecer a nova e já ampliada linha de cosméticos naturais de O Boticário. Dessa forma, os passageiros, oriundos de diferentes cidades passaram a adquirir e divulgar seus produtos, bem como o pessoal de bordo das companhias aéreas, que se tornaram vendedores informais dos cosméticos em todo o Brasil (GRUPO O BOTICÁRIO, 2012).

Segundo a Associação Brasileira de Indústria de Higiene Pessoal e Cosméticos (ABIHPEC) o setor apresenta considerável crescimento no Brasil, sendo um dos que mais geram empregos diretos e indiretos no país. Até 2014, os índices da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos foram os mais vigorosos que o restante das indústrias. Em 2015, com o aumento do IPI em maio e com a recessão da economia, o setor retraiu quase 9% pela primeira vez nos últimos 23 anos. No entanto, o setor apresentou um crescimento médio deflacionado composto de 11,4%

nos últimos 20 anos, tendo passado de um faturamento *ex-factory*, líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 15,4 bilhões em 2005 para R\$ 42,6 bilhões em 2015 (ABIHPEC, 2016).

Vários fatores têm contribuído para este excelente crescimento do setor no país, dentre os quais destacam-se: (i) a participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho; (ii) o aumento da expectativa de vida, o que traz a necessidade de conservar uma impressão de juventude e cuidar de seu bem-estar; (iii) a utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento da produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor, que tem aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral; (iv) uma cultura cada vez mais voltada ao cuidado com a saúde e bem estar, que vem fazendo o público masculino incorporar o uso de produtos do setor.

Segundo o panorama da ABIHPEC (2016), existem no Brasil 2.613 empresas atuando no mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, sendo que 20 empresas de grande porte, com faturamento líquido de impostos acima dos R\$ 200 milhões, representam 75,0% do faturamento total. Em relação ao mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, conforme dados do Euromonitor de 2016, o Brasil ocupa a quarta posição, representando 7,1% do consumo mundial. É o segundo mercado em depilatórios, desodorantes, perfumes, produtos masculinos; o terceiro em higiene oral, produtos infantis, produtos para cabelos; quarto em produtos para o banho; quinto em maquiagem e oitavo em produtos para a pele.

### **2.3 FITOCOSMÉTICOS: PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL EM COSMÉTICOS**

A fitocosmética pode ser definida como o segmento da cosmetologia que se dedica ao estudo e aplicação das substâncias ativas extraídas de materiais vegetais, em proveito da higiene, da estética, da correção e da manutenção do estado normal e sadio da pele (ARAÚJO *et al.*, 2010).

O fitocosmético é uma preparação composta por substâncias de origem natural destinada a ser posta em contato com as diversas partes superficiais do corpo humano, designadamente epiderme, cabelo, unhas, lábios, dentes e mucosas bucais, com o objetivo de limpar, perfumar, proteger, modificar o aspecto ou conservar em bom estado e/ou corrigir os odores corporais (RUIVO, 2012).

De acordo com Maimom (2000), as indústrias europeia e americana se destacam em relação à utilização de produtos naturais em cosméticos e está dividida, basicamente, em dois grupos de empresas. O primeiro grupo é especializado em produtos naturais e nele estão as empresas que utilizam recursos naturais em suas linhas de produção, apresentado ainda forte apelo a ética ambiental em sua política institucional e de marketing. São citadas neste grupo as empresas

francesas Yves Rocher, Biotherm, Clarins e Ushua, as empresas americanas Aveda, Rose Brier, Mahogany, e a inglesa The Body Shop.

O segundo grupo é formado por empresas do ramo de cosméticos que, além de seus produtos tradicionais, buscam se diversificar adicionando aromas, corantes e vitaminas naturais, ou inserindo produtos naturais em suas plantas de fabricação. São exemplos de empresas deste grupo: L'Óreal, Esther Lauder, Clinique, Procter e Gamble e Unilever (MAIMOM, 2000).

Atualmente, a utilização direta das plantas na indústria de cosméticos está cada vez mais sendo substituída pela aplicação de seus extratos (CUNHA *et al.*, 2008). Isso ocorre por conta das desvantagens relacionadas ao primeiro processo. Com a utilização direta das plantas podem surgir problemas microbiológicos e a presença de grande quantidade de partículas sólidas nas formulações, além de exigir a utilização de grande quantidade de material vegetal para que a quantidade de substâncias ativas desejadas seja conseguida. Assim, a utilização de extratos e óleos purificados em formulações cosméticas é mais conveniente e segura (RUIVO, 2012) e tem orientado a elaboração de diversas formulações, como as apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Cosméticos elaborados a partir de extratos, óleos ou manteigas de espécies vegetais brasileiras.

Extratos/óleos	Cosmético	Referência
Extratos do bagaço de uva	Cremses e géis	Souza e Ferreira (2010)
Extrato de açaí	Crema fotoprotetor	Daher <i>et al.</i> (2014)
Óleo de melaleuca	Sabonete líquido íntimo	Garcia <i>et al.</i> (2009)
Extrato de pimenta malagueta	Xampú esfoliante	Scacheti <i>et al.</i> (2011)
Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	Filtro solar	Pinto <i>et al.</i> (2013)
Manteiga de manga	Filtro solar	Velasco <i>et al.</i> (2012)
Extrato de barbatimão-verdadeiro	Sabonete líquido	Souza <i>et al.</i> (2007)
Óleo de café verde	Filtro solar	Savian <i>et al.</i> (2011)
Óleo de copaiba e andiroba	Repelente de insetos	Oliveira (2008)
Extrato etanólico de goiaba	Crema antioxidante	Pietro <i>et al.</i> (2008)
Extrato seco de cacau	Crema hidratante	Silva <i>et al.</i> (2013)



### 2.3.1 EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos podem ser classificados quanto à sua consistência e em relação ao líquido extrator. Eles podem ser definidos como “preparações farmacêuticas sólidas obtidas pela concentração, até determinado grau, das soluções resultantes do esgotamento das substâncias medicamentosas por um dissolvente como água, álcool, éter, acetona, metanol, entre outros” (PRISTA *et al.*, 2008).

De modo geral, os extratos poderão constituir preparações extrativas de consistência líquida e concentrada, equivalentes no seu conteúdo em substâncias ativas aos compostos vegetais de onde são extraídos, de consistência semi-sólida com uma porcentagem de água entre 20-25%; de consistência sólida, suscetíveis de redução a pó, e cujo conteúdo em água está entre 2 e 5%, obtido a partir de partes vegetais geralmente secas (PRISTA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2008).

Previamente à sua incorporação em um cosmético, o material vegetal deve ser submetido a um processamento químico significativo (como a inativação de enzimas ou moagem) que interfere na sua atividade biológica, sendo que o fator mais importante se resume à fonte do material vegetal a ser extraído, uma vez que cada parte da planta contém inúmeras moléculas químicas diferentes (RUIVO, 2012). Além disso, os materiais indesejáveis podem ser eliminados após a extração (PRISTA *et al.*, 2008).

### 2.3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas de substâncias voláteis, com solubilidade baixa em água e solúveis em solventes orgânicos, geralmente odoríferas e líquidas a temperatura ambiente, com aparência de óleo. São chamados de essências por possuírem a volatilidade como principal característica, e em geral possuem o aroma agradável e intenso. São princípios imediatos de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies (SIMÕES e SPITZER, 1999).

Os óleos essenciais constituem, de uma maneira geral, uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos e álcoois, encontrados no tecido vivo de determinadas plantas, em geral concentrados na casca, nas flores, nas folhas, nos rizomas e nas sementes (ARAÚJO, 1995). Eles podem ser utilizados pelas indústrias farmacêuticas, como fragrância em cosméticos, perfumaria, sabonetes, aromatizantes de ambientes, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, como, por exemplo, detergentes, sabões, desinfetantes, plásticos, tintas, borrachas, repelentes de insetos, além de seu emprego como

intermediários sintéticos de perfumes (COSTA, 1994; WOOLF, 1999; MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001).

## 2.4 ESPÉCIES AMAZÔNICAS DE INTERESSE PARA USO EM COSMÉTICOS

Em seu estudo, Revilla (2000) descreve 72 plantas de interesse econômico, nativas ou aclimatadas na região amazônica, que poderiam ser manejadas de modo extrativo para atendimento nos segmentos fitoterápico, cosmético, complemento alimentar, corante, inseticida, repelente e fibras. De acordo com o autor, o número de espécies com potencial de mercado é superior ao apresentado, pois o referido estudo não considerou outras espécies de importância econômica, como cupuaçu, guaraná, buriti, etc., por serem plantas altamente pesquisadas.

No segmento de cosmético, Revilla (2000) cita especificamente as seguintes espécies com potencial de uso: amor crescido, andiroba, babaçu, babosa, castanha-do-pará, cipó-alho, cipó-cravo, copaíba, cumaru, mamona, mari, mulateiro, mulungu, murumuru, patauí, pau-rosa, pião roxo, piquiá, sacaca, sapucaia, tucumã e urucum.

O pau-rosa é um grande produtor de linalol em seu óleo essencial (PIMENTEL, 2015), que é conhecido mundialmente por compor grandes marcas da perfumaria fina como Channel n.5. Presente na mesma família (Lauraceae) e gênero (*Aniba*), a casca-preciosa possui um óleo essencial com um composto nitroderivado incomum em produtos naturais, que lhe confere um aroma característico lembrando o de canela, e juntamente com seus extratos possui um grande potencial para estudos científicos de aplicabilidade cosmética.

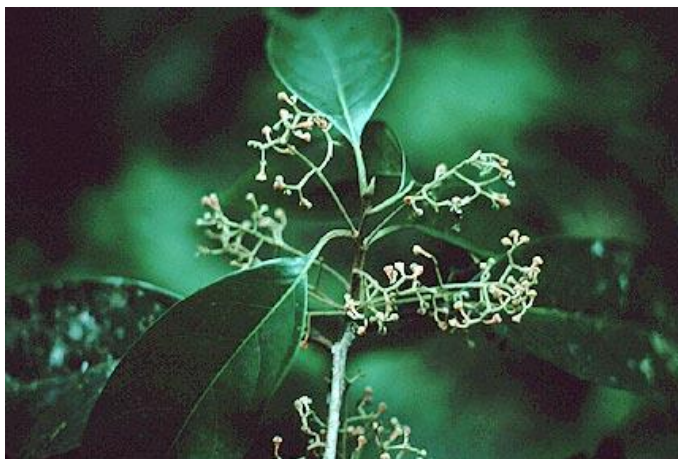
### 2.4.1 CASCA-PRECIOSA

A espécie *Aniba canelilla* (Figura 1) é nativa da região Amazônica, distribuindo-se amplamente nas matas pluviais do interior da Guiana Francesa no leste, ao longo do escudo das Guianas, atravessando Suriname, Venezuela e Colômbia até à Amazônia peruana. No Brasil, ocorre nos estados do Pará e Amazonas (LUPE, 2007). Seus sinônimos botânicos são *Aniba elliptica* A.C. Sm. e *Cryptocarya canelilla* Kunth. É popularmente conhecida como: casca-do-maranhão, canela-cheirosa, folha-preciosa, arapaima, amapaíama, pereiorá, pau-precioso, pau-rosa; *rosewood, brazilian rosewood* (inglês); *legno di rose; rosenholzbaum; bois de rose; palo de rosa* (MAIA *et al.*, 2000; MORS *et al.*, 2000).

Esta árvore fornece madeira de ótima qualidade, apropriada para mobiliário e construção civil (LUPE, 2007) e é enormemente utilizada na medicina popular contra artrite, esgotamento

nervoso (SILVA, 1977), é usada também como redutora da albumina no sangue, hidropsia, catarro crônico, sífilis, leucorréia, aerofagia, males do coração (INTERAMINENSE *et al.*, 2010), dor após extração de dentes (MORS *et al.*, 2000), anemia, anti-desentérico, anti-espasmódico e anti-inflamatório, digestivo, eupéptico, peitoral e estimulante (MAIA *et al.*, 2000), bem como resfriados, dor de cabeça e náuseas (SILVA, 1977; LUPE, 2007).

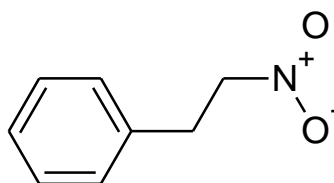
Figura 1 - Folhas e flores de *Aniba canelilla* (casca-preciosa).



Fonte: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com>.

Os óleos essenciais das folhas e galhos finos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) por Lima (2004) e por CG-EM e Microextração em Fase Sólida (HS-SPME) por Lupe (2007), identificando como composto majoritário o 1-nitro-2-feniletano (Figura 2), uma molécula rara em produtos naturais, derivada da fenilalanina.

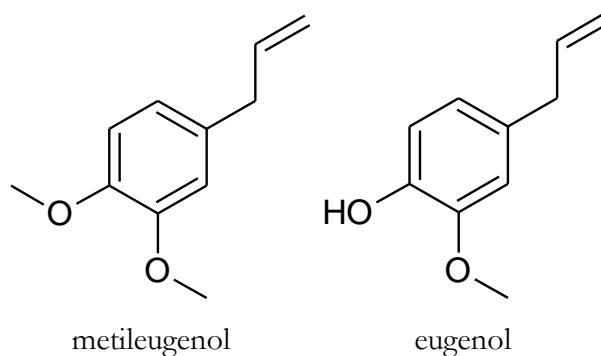
Figura 2 - Estrutura química do composto majoritário do óleo essencial de *Aniba canelilla*.



1-nitro-2-feniletano

Outras substâncias presentes no óleo essencial de *A. canelilla* são eugenol, metileugenol (Figura 3), anabasina, anibina e tanino (LORENZI e MATOS, 2002),  $\alpha$ - pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -sesquifelandreno, *p*-cimeno, linalol,  $\alpha$ -copaeno e espatulenol (MAIA *et al.*, 2000).

Figura 3 - Estrutura química de constituintes do óleo essencial de *Aniba canelilla*.



Em outro estudo foram identificados sesquiterpenos no óleo essencial das folhas, bem como a presença de moléculas precursoras da biossíntese de 1-nitro-2-feniletano como benzonitrila, benzoacetaldeído e benzoacetonitrila (MAIA *et al.*, 1996). O óleo essencial obtido das cascas do caule apresenta os alcalóides benziltetrahydroisoquinolina (LORENZI e MATOS, 2002), tetrahydroprotoberberina (TAVEIRA *et al.*, 2003), (R)-(+)-noranicanina, anicanina (OGER *et al.*, 1992), canelila, norcanelilena (LUPE, 2007), (-) norcanelilina, (+) canelilina e canelilinoxina (OGER *et al.* 1994).

Silva *et al.* (2007) verificaram a presença de substâncias fenólicas nos extratos metanólicos da casca e do tronco de *A. canelilla*. Relatam uma notável atividade antioxidante, atribuída a benziltetrahydroisoquinolina e a alcaloides tetrahydroprotoberberínicos, afirmando que os grupos N-H e as hidroxilas fenólicas existentes nestas estruturas contribuem para a eficiência antioxidante dos extratos.

Fonseca Jr. *et al.* (2015) relata a existência de substâncias fenólicas presentes nos extratos etanólicos de *A. canelilla* que possuem alto FPS que podem ser purificados e utilizados em fitocosméticos fotoprotetores. Silva *et al.* 2015 também relata que existem substâncias antioxidantes nos extratos etanólicos de *A. canelilla* que podem substituir antioxidantes sintéticos em formulações cosméticas.

Destaca-se ainda que não existem trabalhos utilizando *A. canelilla* em formulações cosméticas, além dos realizados por este grupo de pesquisa (SILVA, 2012, FAÇANHA E ALBUQUERQUE, 2014; REIS E SILVA, 2015; SILVA *et al.*, 2015; FONSECA Jr. *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2016).

## 2.5 CONSTITUENTES COSMÉTICOS

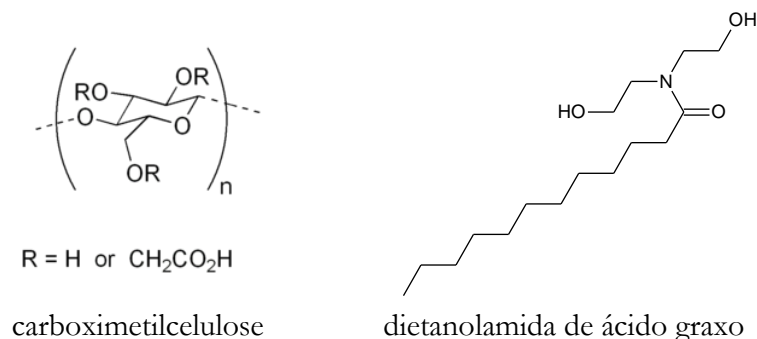
Os cosméticos possuem componentes básicos com diferentes propriedades funcionais e físico-químicas, que devem ser bem conhecidos a fim de possibilitar a preparação de formulações com qualidade e funcionalidades adequadas. No presente trabalho, foram elaborados sabonetes líquidos e emulsões, sendo seus principais componentes descritos a seguir.

### 2.5.1 AGENTE ESPESSANTE

Os agentes espessantes são normalmente utilizados na forma de sais, alginatos e alcanolamidas de ácidos graxos, que também apresentam poder reengordurante e estabilizador de espuma. Os agentes engordurantes como alcanolamidas, lanolina e derivados hidrossolúveis são doadores de viscosidade e espumacidade usados para se evitar a retirada excessiva de gordura pelo tensoativo (MOTTA, 2007; CALEFFI *et al.*, 2012).

Apesar de o poder espumante não ter nenhuma ligação com o poder de limpeza, os consumidores costumam levar em conta este fator na hora de escolher o produto. A formação de espuma depende do pH da solução, do conteúdo em eletrólitos e da dureza da água. É possível melhorar ou estabilizar o poder espumante de um xampu ou sabonete líquido, por exemplo, através da adição de vários componentes como carboximetilcelulose (Figura 4), fosfatos, alcanolamidas, etc (MOTTA, 2007; CALEFFI *et al.*, 2012).

Figura 4 - Estrutura química de componentes espessantes utilizados em formulações cosméticas.

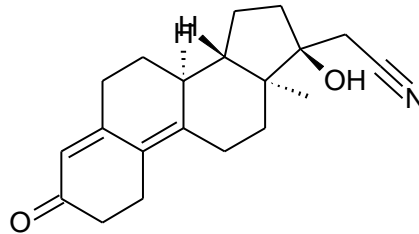


### 2.5.2 AGENTE PEROLIZANTE

Outro aspecto valorizado pelo consumidor é a aparência sedosa ou perolada de xampus e sabonetes líquidos. Como agentes perolantes são utilizados ésteres de ácidos graxos, sabões metálicos e certas alcanolamidas de ácidos graxos. O perolizante diestearato de etilenoglicol (Figura

5), tensoativo aniônico de limpeza suave, é utilizado para modificar a aparência do produto (MOTTA, 2007; CALEFFI *et al.*,2012).

Figura 5 - Estrutura química de um surfactante aniônico utilizado em formulações cosméticas como agente perolizante.

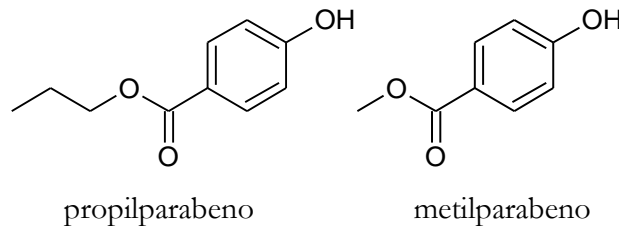


diestearato de etilenoglicol

### 2.5.3 AGENTE CONSERVANTE

Devido à presença de água e de componentes orgânicos, os cosméticos são susceptíveis a ataques de microrganismos que alteram a qualidade do produto, por isso são utilizados agentes conservantes como metilparabenos (Nipagin) e propilparabenos (Nipazol) (LIMA e COMARELLA, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura química dos conservantes parabenos utilizados em formulações cosméticas.



propilparabeno

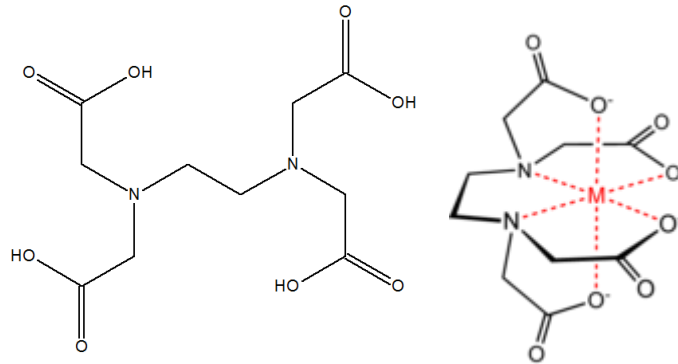
metilparabeno

### 2.5.4 AGENTE QUELANTE

Os agentes quelantes ou sequestrantes de metais são essenciais na formulação de xampus. A água contém sais minerais e a queratina do cabelo tem uma estrutura carregada de cargas negativas. Por atração eletrostática, os metais contidos na água se depositam sobre o cabelo. Quanto mais poroso estiver o cabelo, maior a deposição de metais sobre os fios, tornando-os opacos, sem maleabilidade e com aparência suja. Quelantes como o EDTA (ácido etilendiamino tetracético) impedem que os metais contidos na água se depositem sobre os fios de cabelo, já que

eles se ligam ao EDTA (Figura 7) e são totalmente removidos durante o enxágüe (LIMA e COMARELLA, 2009).

Figura 7 - Estrutura química do agente quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético).



ácido etilenodiamino tetracético

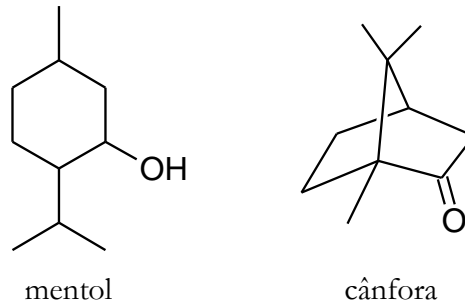
#### 2.5.5 AGENTE EMOLIENTE

Substâncias são adicionadas à formulação para amaciar e hidratar os cabelos, restaurando a oleosidade perdida e evitando o ressecamento da pele do couro cabeludo. Como agentes emolientes podem ser usados uréia, óleo de amêndoas ou óleo mineral (LIMA e COMARELLA, 2010).

#### 2.5.6 AGENTE REFRESCANTE

O composto orgânico mentol, obtido por síntese ou pela extração do óleo de menta, é adicionado a algumas formulações para causar a sensação de frescor na pele durante e após a lavagem. Quando aplicado na pele, ele produz vasodilatação, provocando efeito refrescante seguido de efeito analgésico. Segundo a Catec, em Resolução RDC nº 8 de 1 de novembro de 2005, em baixas concentrações o mentol não produz efeitos tóxicos, porém em concentração igual ou superior a 3% ele causa efeitos irritantes (ANVISA, 2006). Na Figura 8 estão as estruturas químicas do mentol e da cânfora, agentes refrescantes utilizados em cosméticos.

Figura 8 - Estrutura química de agentes refrescantes utilizados em cosméticos.



## 2.5.7 ADITIVOS

Essências e corantes são adicionados aos cosméticos para satisfazer as exigências do consumidor, porém podem provocar alterações na estabilidade, transparência, viscosidade e cor final. Aditivos especiais são adicionados aos produtos para caracterizá-los, dependendo da proposta do produto, como por exemplo: agentes sequestrantes, antioxidantes, filtros solares, medicamentos, etc. Quanto ao diluente, o mais utilizado é água tratada, destilada ou deionizada (MOTTA, 2007; CALEFFI *et al.*,2009). Alguns exemplos de aditivos são:

### 2.5.7.1 Corantes

Os corantes são os compostos responsáveis pela cor nos cosméticos. Devem apresentar alto grau de pureza e boa estabilidade, além de serem aprovados para uso em cosméticos pela ANVISA.

### 2.5.7.2 Essências

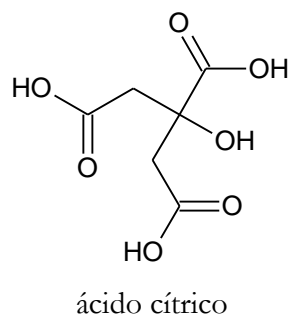
As essências são composições aromáticas formadas pela combinação de dezenas e algumas vezes centenas de compostos odoríferos de origem natural e sintética.

### 2.5.7.3 Ácido cítrico

O ácido cítrico é utilizado para correção do pH em sistemas como xampus, condicionadores e sabonetes líquidos. No entanto, em algumas formulações, o ácido cítrico (Figura 9) também é usado como antioxidante. Para sua utilização é necessário a sua previa dissolução em água.



Figura 9 - Estrutura química do componente utilizado como corretor de pH ácido cítrico.



#### 2.5.7.4 Água

A água é a matéria prima básica para a fabricação de cosméticos, desta forma deve ser de excelente qualidade, tanto no aspecto químico/físico, quanto microbiológico. A mais utilizada em cosméticos é a água deionizada embora outras formas de purificação da água possam ser empregadas sem afetar a qualidade do produto final.

## 2.6 PRODUTOS COSMÉTICOS

No presente trabalho foram formulados sabonetes líquidos e emulsões contendo extratos e/ou óleos essenciais de *A. canelilla*. A seguir apresenta-se a descrição destes produtos cosméticos, bem como de seu local de uso (pele), e do principal componente de sabonetes, o surfactante.

### 2.6.1 SABONETE

O sabonete é o produto cosmético mais consumido no Brasil e tem como principal função limpar a pele, removendo as impurezas e eliminando os resíduos da pele. De acordo com a ABIHPEC, são consumidas aproximadamente 218 mil toneladas de sabonetes em barra e 4,8 mil toneladas por ano de sabonetes líquidos no país, sendo o segundo maior consumidor mundial deste produto per capita (MOTTA, 2007; GALEMBECK e CSORDAS, 2009).

O sabonete possui moléculas de caráter anfílico em sua composição, os surfactantes (SANTOS *et al.*, 2007). Moléculas de sujidade com caráter apolar ligam-se com a parte apolar, enquanto que a extremidade polar se liga com a água podendo assim serem removidas (ROSSI *et al.*, 2006; CONDE, 2003).

Geralmente, os sabonetes podem ser encontrados nas formas sólidas, líquidas ou pastosas. Cada forma, de acordo com o costume popular, é utilizada em diferentes situações. Para o banho, por exemplo, a forma sólida é a mais utilizada. Já para barbear ou para depilação, costuma-se utilizar

os aerossóis. Os sabonetes líquidos são utilizados para ambos os fins, e o seu uso tem alcançado mais adeptos com o passar do tempo (MERCANTE *et al.*, 2009).

A diferença no processo de fabricação de sabonetes líquidos e em barra está na base. A base para os sabonetes em barra é obtida através da reação de gorduras vegetais ou animais com soda cáustica. Após esse processo são adicionados preservantes, corantes e o produto é prensado. Os sabonetes líquidos são obtidos em uma única etapa através da mistura de diferentes surfactantes com preservantes, emolientes, corantes, hidratantes e perfumes (MOTTA, 2007).

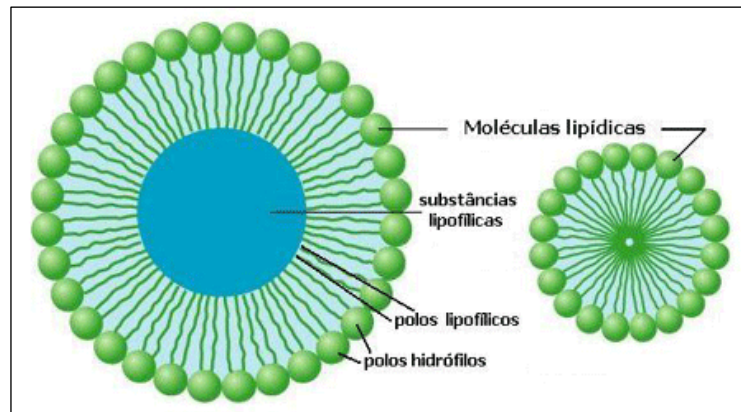
A produção de sabonetes líquidos subdivide-se entre sintéticos, aqueles feitos com compostos previamente processados a partir do petróleo ou de plantas, e naturais, produzidos por reação direta entre óleos e uma base (UNIOESTE, 2009). Devido ao processo de fabricação, é mais fácil agregar ingredientes benéficos para a pele aos sabonetes líquidos (MOTTA, 2007).

Em se tratando de sabonete líquido íntimo, a principal modificação em relação ao sabonete líquido tradicional está relacionada ao pH, que deve ser por volta de 3,8 a 4,2, com o objetivo de manter as condições de pH vaginal, preservando a flora normal feminina. As principais vantagens do sabonete líquido íntimo são: (i) utilização de pouco perfume, diminuindo a sensibilidade quanto aos componentes das essências; (ii) são excelentes veículos para substâncias ativas; (iii) menor possibilidade de contaminação por microrganismo, pois não ficam exposto ao ar; e (iv) dificilmente haverá contaminação pelo uso de pessoas diferentes, como ocorre com o sabonete comum em barra (GARCIA *et al.*, 2009).

### 2.6.1.1 Surfactantes

O principal componente de xampus e sabonetes líquidos é o surfactante ou detergente, o qual é o responsável pela limpeza dos cabelos e pele. Em cremes hidratantes, por exemplo, são responsáveis pela mistura das fases oleosa e aquosa. Eles reduzem a tensão superficial da água permitindo a formação de emulsões estáveis e a incorporação de ativos lipofílicos nas preparações. Surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma porção apolar hidrofóbica, que se liga aos lipídios, e uma porção polar hidrofílica, que interage com a água, permitindo assim a remoção de impurezas e o enxágue do material desejado. A parte apolar das moléculas dos surfactantes é formada por cadeias alquílicas ou alquil-arílicas longas que, dissolvidas em líquidos, associam-se formando micelas (Figura 10), estruturas esféricas formadas quando várias moléculas de tensoativos são colocadas em contato com o óleo e a água (ABRAHAM *et al.*, 2009; GALEMBECK e CSORDAS, 2009; KOHLER, 2011).

Figura 10 - Estrutura das micelas, formadas pela associação de moléculas de surfactantes.



Fonte ltc.nutes.ufrj.br (2013).

A tensão superficial é a força necessária para que a superfície de um líquido se espalhe por um centímetro e é resultante das forças de coesão entre as moléculas do líquido. A tensão superficial da água é 72,6 dinas/cm a 20°C, com a adição de pequenas quantidades de tensoativos ela é reduzida para 30-40 dinas/cm (MOTTA, 2007). As propriedades dos surfactantes fazem com que eles sejam apropriados a uma ampla gama de aplicações industriais, são elas: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (HEWITT, 2002).

Segundo Abraham *et al.* (2009), existem quatro categorias básicas de surfactantes (baseadas na sua dispersão em meio aquoso): aniônico, catiônico, não iônico e anfótero.

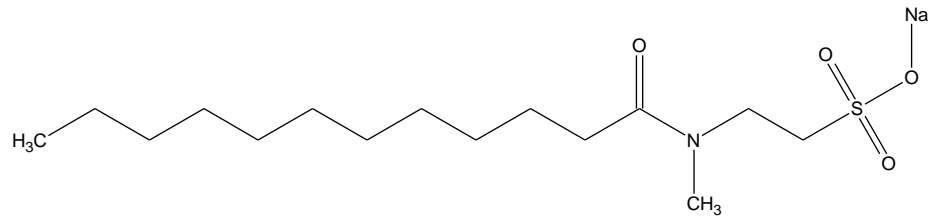
### 2.6.1.2 Tensoativo aniônico

Os surfactantes aniônicos se dissociam em meio aquoso. Este tipo de surfactante, como o lauril sulfato de sódio e de amônio, laureto sulfato de amônio e alfa-olefin sulfonado são os mais utilizados comercialmente, pois são excelentes removedores de sebo do couro cabeludo. Porém, não são bem aceitos pelo consumidor porque deixam os fios opacos, pouco maleáveis e difíceis de pentear. Por todos estes fatores, muitas fórmulas adicionam outros surfactantes considerados secundários, como os não aniônicos (ABRAHAM *et al.*, 2009; MOTTA, 2007).

Os surfactantes aniônicos representam cerca de 50% da produção mundial. Possuem alta capacidade de formação de espuma e são amplamente utilizados na produção de creme dental, sabonete, xampu e detergente (SILVA, 2012A).

O lauril, quimicamente denominado como lauril éter sulfato de sódio (Figura 11) e popularmente conhecido como “espumante”, apresenta-se como líquido incolor ou levemente amarelado, de odor característico e que ao ser agitado produz espuma abundante. É uma das matérias-primas mais importantes na preparação de xampus e sabonetes líquidos.

Figura 11 - Estrutura química do surfactante aniônico lauril éter sulfato de sódio.



lauril éter sulfato de sódio

### 2.6.1.3 Tensoativo não iônico

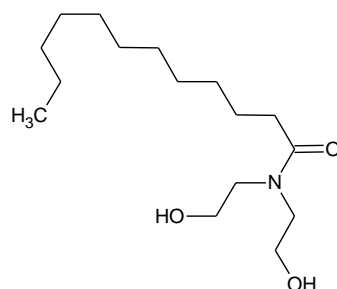
Os surfactantes não iônicos não se ionizam em solução aquosa, pois seu grupo hidrofílico é do tipo não dissociável, como álcool, fenol, éter, éster e amida. A maioria destes surfactantes são polioxipropileno ou polioxietileno derivados de alquifenol, ácidos graxos, alcoóis e amidas (FERREIRA, 2004).

Os surfactantes não aniônicos geralmente são usados em combinação com os aniônicos, funcionando como limpadores secundários, já que apresentam pequena capacidade de limpar o couro cabeludo e suavizam o surfactante aniônico. Estes são considerados bons emulsionantes, umectantes e solubilizantes (ABRAHAM *et al.*, 2009; MOTTA, 2007).

A dietanolamina de ácido graxo de coco (Figura 12) é um surfactante não iônico muito utilizado na indústria na fabricação de diferentes produtos como xampu, detergente, sabão líquido, gel para as mãos, além de ser utilizado como um inibidor da corrosão em fluidos para metais e em produtos para polimento de superfícies. É doadora de viscosidade, estabilizadora de espuma, sobreengordurante e solubilizante de óleos e essências (OLIVEIRA, 2005).

Para uso em cosméticos, a amida 80 e a amida 90 são bastante utilizadas, sendo que a diferença está no grau de pureza. A amida 90 é um produto mais puro que a amida 80. As amidas são tensoativos derivados de óleos láuricos (óleo de babaçu ou óleo de palmiste) que quimicamente são denominadas dietanolamidas de ácidos graxos de coco. São utilizadas como espessantes, sobreengordurantes e solubilizantes de essências em xampus e sabonetes líquidos.

Figura 12 - Estrutura química do surfactante não iônico dietanolamida de ácido graxo de coco.



dietanolamida de ácido graxo de coco

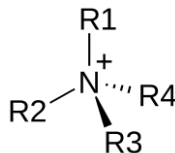
#### 2.6.1.4 Tensoativo catiônico

Os surfactantes catiônicos têm uma molécula de nitrogênio carregada positivamente ligada diretamente no último grupo hidrofóbico. Eles transportam carga positiva quando em solução aquosa, esta carga consiste um grupo amino ou nitrogênio quaternário (FERREIRA, 2004).

Os surfactantes catiônicos mais comuns são haletos de trimetilamônio quaternário (Figura 13). Em meio ácido, este tensoativo adquire características catiônicas mais acentuadas, podendo apresentar incompatibilidades com alguns tensoativos aniônicos, reagindo e formando um sal insolúvel em água (SILVA, 2012A).

Surfactantes catiônicos geralmente são utilizados em xampus para cabelos secos ou quimicamente tratados devido ao seu poder limitado de remover o sebo e por deixar os fios macios e maleáveis. Proporcionam efeitos como aumento de viscosidade, condicionamento e efeito antiestático. São utilizados na formulação de condicionadores (MOTTA, 2007; ABRAHAM *et al.*, 2009).

Figura 13 - Estrutura química geral do trimetilamônio quaternário

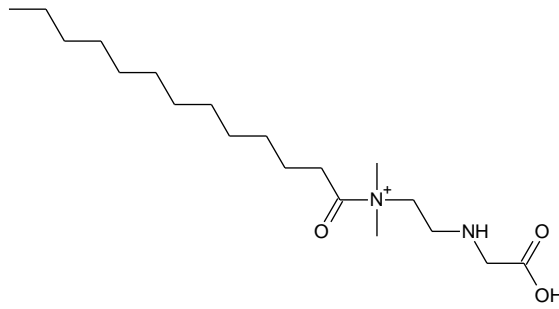


#### 2.6.1.5 Tensoativos anfóteros

Os surfactantes anfóteros são substâncias que apresentam tanto o polo negativo quanto o positivo, em meio ácido formam cátions e em meio alcalino formam ânions. Este é o caso de produtos sintéticos como betaínas ou sulfobetaínas. Possuem ótima compatibilidade com a pele, proporcionam aumento da viscosidade e estabilização da espuma. Eles são utilizados em xampus para bebês, pois não irritam os olhos e são indicados para cabelos finos. Este tensoativo não é utilizado como detergente principal devido ao seu alto preço e baixo poder de detergência (MOTTA, 2007; ABRAHAM *et al.*, 2009; SILVA, 2012A).

O anfótero coco betaína ou anfótero betaínico (Figura 14), se apresenta como líquido amarelado de odor característico e que produz espuma abundante ao ser agitado. Dependendo do pH do meio onde é utilizado apresenta características diferentes de condicionamento e espumação. É utilizado para aumentar a espuma em sistemas tensoativos como xampus e sabonetes líquidos e promover limpeza suave em tônicos para pele. Em conjunto com outros tensoativos apresenta ótimo poder de espessamento.

Figura 14 - Estrutura química do surfactante anfótero betaínico.



anfótero betaínico

## 2.6.2 EMULSÕES

Os sistemas emulsionados são formas químico-farmacêuticas semi-sólidas constituídas por dois líquidos imiscíveis um no outro, em geral água e componentes graxos, sob a forma de gotículas obtidas com o auxílio de um agente emulsivo (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Segundo Patravale e Mandawgade (2008), de acordo com a consistência, as emulsões podem ser classificadas em cremes, loções e leites.

A água e o óleo são componentes naturalmente e mutuamente insolúveis, portanto há necessidade de um componente (tensoativo) que adsorva nas interfaces e tenha afinidade por ambas, a fim de evitar a separação das fases, com a função de estabilizar a emulsão, que passa a ter uma fase interna e outra externa (PATRAVALE e MANDAWGADE, 2008).

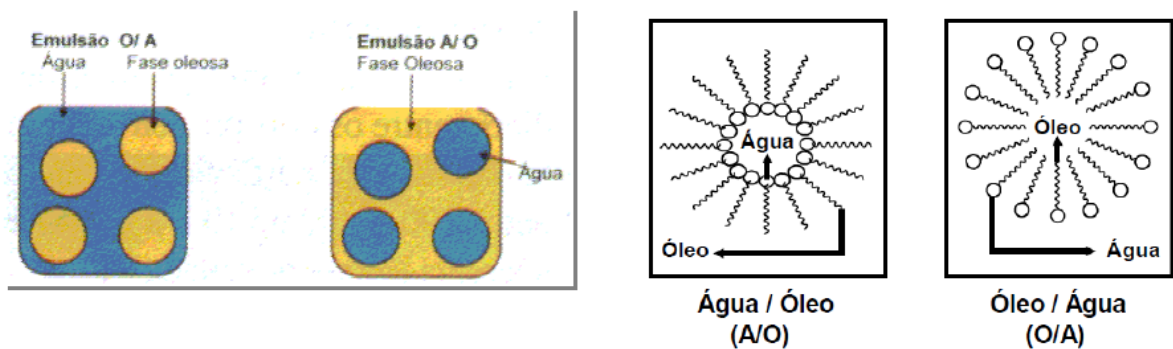
Nas emulsões o ativo vegetal pode estar dissolvido ou suspenso nas fases aquosa ou oleosa, e esta versatilidade permite o incremento de uma grande variedade de ativos no sistema, tornando-se uma das principais vantagens ao usar emulsões. As emulsões possibilitam ainda aperfeiçoar a biodisponibilidade e a biocompatibilidade com a pele (CÁCERES e CRUZ, 2015).

O processo de emulsificação permite a dispersão de um líquido em outro, sendo um hidrófilo e o outro lipófilo, de forma que o sistema fique estável, mesmo depois no estado de repouso. Este processo se dá pela adição do tensoativo, que diminui a tensão interfacial e aumenta a energia livre de Gibbs dos glóbulos menores formados. Naturalmente, estes glóbulos tendem-se a se unirem novamente, voltando assim ao seu estado inicial e diminuindo a energia livre. O tensoativo age justamente na preservação destes pequenos glóbulos, impedindo a coalescência entre as partículas, adsorvendo-se na superfície globular, diminuindo a tensão interfacial, mantendo as gotículas menor formando as duas fases (a interna e externa) (KUMAR, *et al.*, 2015). Já neste processo, forma-se um filme de tensoativos entre as gotículas de uma das fases, que se orienta para formar uma barreira física entre um glóbulo e outro.

### 2.6.2.1 Tipos de Emulsões

Os dois componentes básicos de uma emulsão são a água e o óleo, classificando as emulsões em dois tipos distintos (Figura 15), de acordo com a natureza da respectiva fase dispersa, ou interna. As emulsões simples podem ser do tipo óleo em água (O/A), que possui a fase interna (descontínua) formada por gotículas de óleo envoltas pela fase aquosa (contínua), e água em óleo (A/O), onde a fase interna (descontínua) formada por gotículas de água, é envolta por uma fase oleosa contínua (dispersante) (PATRAVALE e MANDAWGADE, 2008).

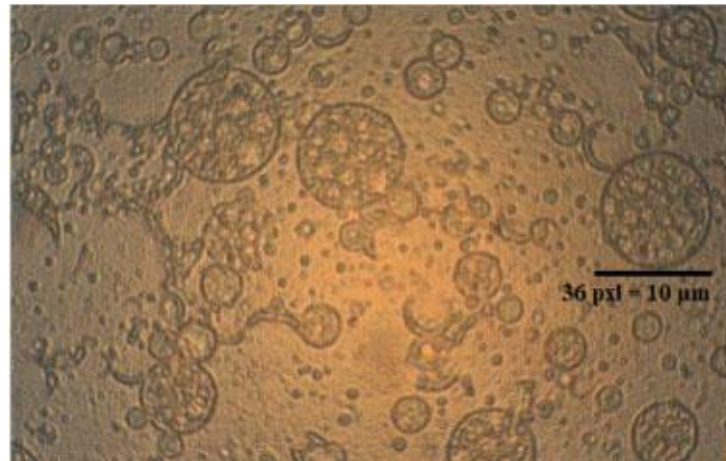
Figura 15 - Classificação das emulsões de acordo com a natureza das fases dispersa e interna.



Fonte: <http://s3.amazonaws.com/magoo/ABAAAc14YAF-5.jpg>.

Segundo Rosen (1989), as emulsões classificam-se em quatro tipos de acordo com o tamanho das gotículas da sua fase dispersa ou interna: (i) macroemulsões: emulsões opacas, termodinamicamente instáveis, com gotículas de tamanho maior que 400 nm (0,4  $\mu\text{m}$ ), facilmente visíveis no microscópio; (ii) nanoemulsões: sistemas termodinamicamente estáveis, dispersões isotrópicas, transparentes com gotículas de tamanho inferior a 100 nm (0,1  $\mu\text{m}$ ) e de baixa viscosidade; (iii) microemulsões: tipo intermediário entre os dois primeiros, com tamanho de partícula variando entre 100 a 400 nm (0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$ ) e aparência branco-azulada; e (iv) emulsões múltiplas (Figura 16): as gotículas dispersas são emulsões delas mesmas, ou seja, são gotas de um líquido dispersado em gotas maiores de outro líquido, que é então disperso em uma fase contínua, que geralmente é de mesma natureza que o primeiro líquido.

Figura 16 - Fotomicrografia de uma emulsão múltipla.



Fonte: Mahmood *et al.* (2013).

Myers *et al.* (1988) e Chhabra (1997) relacionam o tamanho da partícula ao tipo de emulsão, e comparam com os tipos de estruturas micelares dos tensoativos. Segundo Mahmood *et al.* (2013), as emulsões podem ser avaliadas por microscopia ótica com aumento de 100x. A Tabela 2 compara o tamanho com a aparência da emulsão, entanto estas classificações são arbitrárias, podendo ocorrer sobreposição de faixas.

Tabela 2 - Tipo, aparência da emulsão e tamanho da partícula da fase interna.

Tamanho da partícula (nm)	Tipo de emulsão/solução	Aparência da emulsão/ solução
< 1,0	Solução molecular	Transparente
1,0 - 20,0	Solução Micelar	Transparente
< 50,0	Nanoemulsão	Transparente ou transluzente
50,0 - 100,0	Nanoemulsão	Opalescente-cinza
100 a 400	Microemulsão	Branca- azulada
100,0 – 1000,0	Dispersão coloidal	Opalescente a opacas
> 400 - 10000,0	Macroemulsão, suspensão	Opacas brancas
> 0,5 mm	Fases separadas	Glóbulos visíveis

Fonte: Mahmood *et al.* (2013).

### 2.6.2.2 Pele

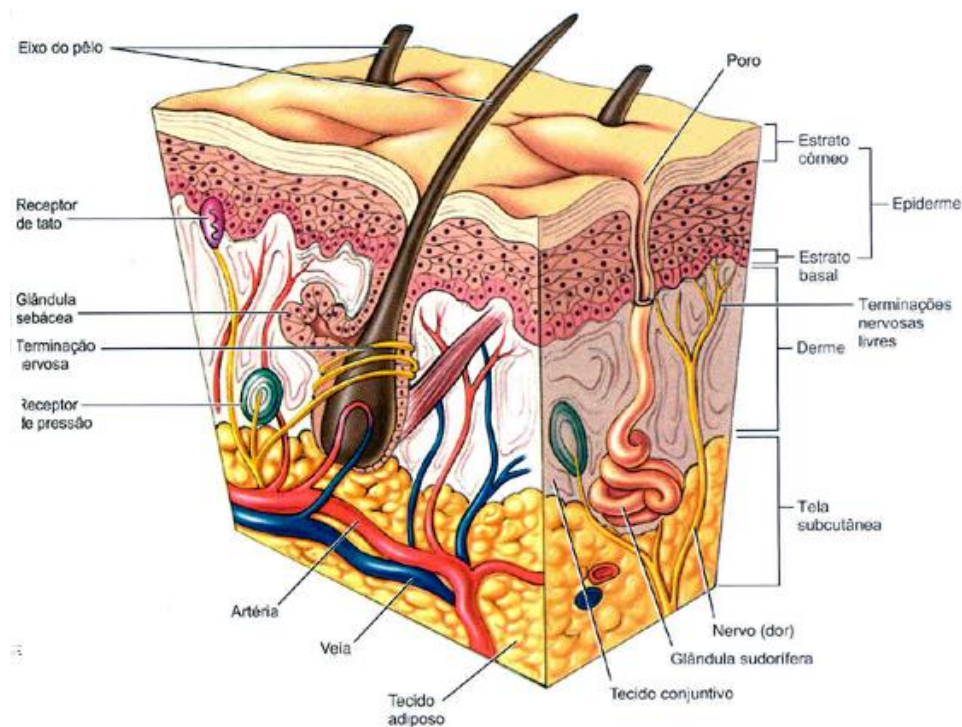
A pele forma a superfície externa contínua ou tegumento do corpo, sendo o maior órgão, constituindo quase um sexto do seu peso total (1,75m<sup>2</sup>). É representada pela epiderme com o seu manto córneo, a qual se assenta sobre um tecido de sustentação fibrilar, a derme, que por sua vez, repousa sobre o panículo célula-adiposo da hipoderme (YANNAS, 2015). A pele possui as funções principais de: (i) proteção contra lesões mecânicas, químicas e térmicas; (ii) termo-regulação,



impedindo a perda de calor; (iii) impermeabilidade à água sobre a entrada ou saída dela no organismo (conservação de fluidos); (iv) barreira física a organismos patogênicos; e (v) detecção de estímulos sensoriais.

Segundo Stamatias *et al.* (2011), apesar dessas variações que refletem diferentes demandas funcionais, todos os tipos de pele possuem a mesma estrutura básica. A pele espessa cobre a palma da mão e a plantados pés, possui glândulas sudoríparas, mas não possuem folículos pilosos (pele glabra), músculos eretores do pêlo e glândulas sebáceas. A pele delgada cobre a maior parte do resto do corpo e contém folículos pilosos, músculos eretores do pêlo, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (pele pilificada) (Figura 17).

Figura 17 - Anatomia da pele.



Fonte: <http://www.fisioterapiaesaude.com/wp-content/uploads/2012/02/pele6.jpg>.

A pele é preenchida em toda sua superfície por diversos tipos de microrganismos (fungos ou bactérias), constituindo a flora cutânea. Ela é formada por uma flora chamada residente ou permanente, contendo germes saprófitos, normalmente não patogênicos, mas podendo tornar-se devido a certas condições. Em sua constituição também há uma flora transitória ou patogênica, resultantes da contaminação diária. Os microrganismos que a compõem são hóspedes acidentais da pele, cuja sobrevivência sobre o território cutâneo é fraca e temporária. A competição entre os microrganismos permanentes e os transitórios permite uma proteção relativa contra estes últimos.

É, portanto, primordial conservar a flora cutânea resistente em bom estado, garantindo maior proteção contra a inoculação de patógenos (AL-GHAZZEWI e TESTER, 2014).

Michael-Jubeli e colaboradores (2011), afirmam que uma emulsão do tipo A/O recobre a camada córnea, a fim de: (i) manter a hidratação da camada córnea; (ii) manter a acidez cutânea devido ao poder tampão dos aminoácidos; (iii) funcionar como barreira contra agressões externas; e (iv) permitir a presença da flora saprófita, que defende a pele contra os microrganismos patogênicos.

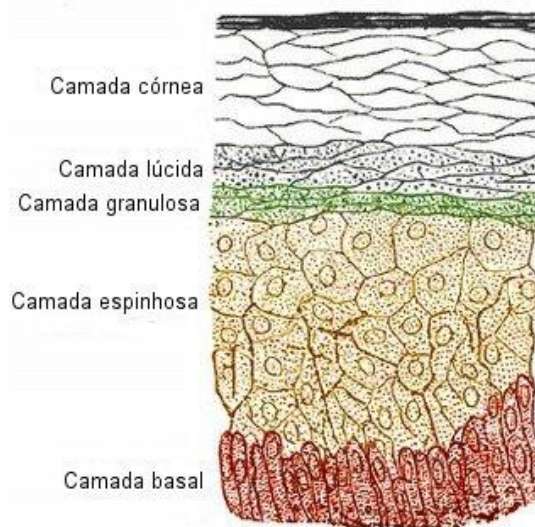
O filme hidrolipídico varia conforme a idade, sexo, regiões do corpo, e são formadas por substâncias como: produtos de desintegração dos queratinócitos (queratina); cimento intercelular (colesterol, ceramidas, ácidos graxos, triglicerídeos); componentes do NMF – Natural Moisturizing Factor (uréia, ácido láctico, ácido pilorridônico carboxílico); secreção sudoral (água e sais minerais como NaCl, KCl, Ca e Mg).

A epiderme é a camada mais externa do corpo e está em contato direto com o meio externo. É um epitélio queratinizado estratificado pavimentoso composto principalmente de queratinócitos onde encontram-se as células epiteliais especializadas responsáveis pela renovação, coesão e barreira da epiderme. A Figura 18 mostra as diferentes camadas que compõem a epiderme, formadas pela diferenciação sequencial de células migrando da camada basal para a superfície. Composta por quatro tipos de células, os melanócitos, os queratinócitos, as células de Merkel e as células de Langerha, e, dependendo da região da pele, se renova a cada 20 a 30 dias (KIERSZENBAUM e TRES, 2012; DUAN *et al.*, 2013).

A camada basal (*stratum basale*) ou camada germinativa é a mais profunda da epiderme e fica sobre a derme. É a camada com a maior atividade mitótica, pois contém células-fonte da epiderme, onde há constante renovação celular. A camada espinhosa (*stratum spinosum*), apresenta células com características poligonais cubóides. É importante por conferir à epiderme coesão nas células e resistência ao atrito. A camada granulosa (*stratum granulosum*) possui células com grânulos que são expulsos para o meio extracelular, conferindo à epiderme impermeabilidade à água e a outras moléculas. A camada lúcida (*stratum lucidum*) é pouco representativa, consistindo em uma camada de transição entre a camada granulosa e a camada córnea. A camada córnea (*stratum corneum*) tem espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo. O citoplasma destas células apresenta-se repleto de uma escleroproteína dura chamada de queratina, rica em ligações dissulfeto (S-S), que confere força e resistência. A esta camada é conferida 98% da habilidade de retenção de água da epiderme, a membrana plasmática se torna grossa devido à deposição e ligação cruzada de proteínas, como a involucrina, ao longo da superfície interna para

formar o envelope córneo. O *stratum lucidum* é parte desta camada (BAUMANN E SAGHARI, 2009).

Figura 18 - Camadas que compõe a epiderme.



Fonte: [https://funcionalfisioestetica.files.wordpress.com/2011/09/camadas\\_pele.jpg](https://funcionalfisioestetica.files.wordpress.com/2011/09/camadas_pele.jpg).

Outros integrantes da epiderme são as células de Langerhans que apresentam antígeno, os linfócitos T epidérmicos, ambos derivados da medula óssea; os melanócitos formadores de pigmentos e as células de Merkel neuroepiteliais, queratinócitos modificados que possuem queratinas e formam ligações desmossomais de queratinócitos (ELIAS, 2012).

## 2.7 DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO COSMÉTICO

Os cosméticos devem obedecer a criteriosos estudos, passando pela proposição, criação e desenvolvimento. Durante todo o processo, devem ser monitoradas as alterações físicas, químicas, biológicas e organolépticas incluindo os testes de estabilidade. Faria *et al.* (2012), Souza *et al.* (2010) e Silva e Albuquerque (2014) afirmam que existe a necessidade de assegurar a qualidade do cosmético, desde a fabricação até o término do prazo de validade dos mesmos. Segundo Vilegas e Cardoso (2007), o estudo de estabilidade não era um parâmetro de importância primária, conseqüentemente, sua validação era pouco descrita, antes da ocorrência de diversos problemas com o uso de cosméticos.

Segundo os trabalhos de Isaac *et al.* (2008) e Daher *et al.* (2014), diversas variáveis relacionadas à formulação podem influenciar as características do produto final, como o processo de fabricação, o material de acondicionamento, as condições ambientais e transporte, assim como

cada componente da formulação. Essas alterações distinguem-se em extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração) e intrínsecas, relacionadas aos componentes químicos das formulações e sua interação, bem como a interação dos componentes com o material de acondicionamento, podendo ocorrer incompatibilidade física e incompatibilidade química.

O aspecto do cosmético deve ser desenvolvido a fim de corresponder com a sua finalidade. Por exemplo, xampus transparentes transmitem a sensação de pureza e limpeza e são indicados para cabelos oleosos, já os perolados são indicados para cabelos secos, pois transmitem a ideia de tratamento. Viscosidade, espuma, eliminação com o enxágue, estabilidade, inocuidade, brilho, cor, odor, funcionalidade e economia são fatores importantes para se avaliar a qualidade do produto. Em geral, o que se espera de um cosmético é que seja estável frente às alterações de temperatura ambiental e exposição à luz durante seu tempo de vida (FUJIWARA *et al.*, 2009).

## 2.7.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AVALIADOS EM COSMÉTICOS

### 2.7.1.1 Teste de Centrifuga

O teste de centrifuga é o primeiro a ser feito após a elaboração de uma formulação, pois a ocorrência de alterações no aspecto da formulação após a centrifugação indica que os componentes não estão estáveis e a formulação deve ser reelaborada. A não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade (ISAAC *et al.* 2008).

Este ensaio produz estresse na amostra pela ação da força da gravidade, que atua sobre esta, fazendo com que suas partículas se movam em seu interior. A simulação do aumento da força da gravidade aumenta a mobilidade das partículas e antecipa possíveis instabilidades. Estas instabilidades podem ser observadas caso ocorra precipitação, formação de sedimentos, separação de fases, coalescência ou qualquer outra alteração na amostra (ANVISA, 2007).

### 2.7.1.2 Viscosidade

Para a maioria dos consumidores, a viscosidade está relacionada com a qualidade do produto, mesmo que essa relação não seja verdadeira normalmente. A viscosidade é a resistência de um fluido frente a um fluxo resultante da aplicação de uma força, que causa deformação temporária ou permanente da matéria. Quanto maior a viscosidade, maior a resistência ao fluxo. A formulação não deve permitir que o xampu, por exemplo, escorra das mãos durante a aplicação,

mas se espalhe com facilidade no couro cabeludo. Nos xampus anticaspas a viscosidade deve permitir uma aderência ao couro cabeludo para que haja a ação antimicrobiana. Os principais agentes espessantes utilizados em cosméticos são amidas, betaínas, oleato de decila, álcool laurílico etoxilado, sais orgânicos, derivados da celulose, gomas, polímeros carboxivinílicos e alcoóis polivinílicos (FUJIWARA *et al.*, 2009; CALEFFI *et al.*, 2009).

Sais como o cloreto de sódio são utilizados no controle da viscosidade. Quando diluído em água, os íons se separam em solução, rodeados por moléculas de solvente. O cloreto de sódio é o espessante mais utilizado, aumentando a viscosidade do produto através da interação com agentes tensoativos empregados. O uso de eletrólitos é o meio mais barato e eficiente para espessar xampus. Com o acréscimo de quantidades crescentes de sal, a viscosidade aumenta até um ponto máximo e depois começa a decrescer. A quantidade máxima de sal para evitar a turvação é de 1%. Atualmente existe um forte apelo no mercado sobre os malefícios da presença de sal nas fórmulas dos xampus. Porém, caso não estejam em quantidades acima do ideal, os sais não oferecem nenhum risco a saúde dos cabelos. Em quantidades elevadas eles reduzem o poder condicionante dos produtos (ABRAHAM *et al.*, 2009; CALEFFI *et al.*, 2009).

Segundo Fujiwara *et al.* (2006), os xampus devem apresentar viscosidade de no mínimo 2000 cP. A maioria dos produtos industrializados apresenta viscosidade entre 2000 e 5000 cP.

### **2.7.1.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)**

A camada hidrolipídica que protege o cabelo tem pH compreendido entre 4,0 e 6,0, levemente ácido. O pH natural para a queratina do cabelo é em torno de 4,0. Quando são utilizados produtos muito ácidos ou muito alcalinos, as cutículas se abrem e deixam o córtex exposto, aumentando a porosidade do cabelo.

Os sabonetes líquidos íntimos devem ser mais ácidos, entre 3,8 e 4,2, que é a faixa de pH ideal para preservar a flora normal feminina, pois o produto deve ter as características químicas compatíveis com as do local a ser aplicado, evitando assim, reações adversas (GARCIA, 2009).

### **2.7.1.4 Densidade**

A densidade é definida como o quociente entre a massa e o volume de um corpo, medindo o grau de concentração de massa em determinado volume. Ela é determinada com o uso de picnômetro ou densímetro. De um modo geral, a densidade dos xampus encontra-se entre 1,010 e 1,020 g/cm<sup>3</sup>. Nos líquidos ou semissólidos, este parâmetro pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis (ANVISA, 2007; FUGIWARA *et al.*, 2006).

### **2.7.1.5 Condutividade e Resistividade**

A condutividade elétrica mede, através de condutivímetros, a passagem da corrente elétrica no meio avaliado. Esta é uma análise importante, pois alterações na condutividade elétrica de sistemas dispersos podem ser indicativas de instabilidades. O aumento da condutividade pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição da condutividade pode estar relacionada com a agregação. O inverso da condutividade é a resistividade, definida como a oposição do material ao fluxo de corrente elétrica (ISAAC *et al.*, 2008).

### **2.7.1.6 Sólidos Totais**

A análise dos sólidos totais dissolvidos revela o conjunto de substâncias orgânicas e inorgânicas sob formas ionizadas, moleculares ou micro-granulares contidas no cosmético (ANVISA, 2007).

### **2.7.1.7 Índice de Espuma**

A espuma é formada por pequenas bolhas de gás espalhadas na fase líquida. O poder espumante do produto é um indicativo de qualidade, pois os consumidores consideram um fator importante. Entretanto, não há nenhuma relação entre o poder de formação de espuma e o poder detergente do produto. É possível produzir sabão com alto poder detergente e quase nenhum poder de produzir espuma (BITTENCOURT *et al.*, 1999).

### **2.7.1.8 Espalhabilidade**

A espalhabilidade de um cosmético está correlacionada com as características reológicas dos produtos. Esta é uma resposta importante a ser monitorada, pois define se o xampu, por exemplo, poderá ser aplicado sobre o couro cabeludo de maneira fácil e agradável. O alto índice de espalhabilidade do produto diminui a quantidade necessária no momento da aplicação, reduzindo o consumo (SOUZA, 2007; BORELLA *et al.*, 2010).

Pardeike *et al.* (2010) relatam que as emulsões com uma alta espalhabilidade podem possuir uma sensação ao toque mais agradável e melhor sensação de hidratação, além de uma menor quantidade necessária de produto a ser aplicada sobre a pele.

## **2.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE INTERESSE EM COSMÉTICOS**

A utilização de extratos vegetais e/ou óleos vegetais em produtos cosméticos, tem se mostrado promissora, tornando-se uma tendência mundial que cresceu significativamente nos

últimos anos (SOUZA *et al.*, 2005; IHA *et al.*, 2008). Isaac *et al.* (2008) afirmam que a ação define a atividade do produto, e os fitocosméticos, assim chamados, devem ser elaborados a partir de uma ação encontrada na espécie vegetal, o qual orienta o tipo de produto a ser desenvolvido.

Existe a necessidade crescente no desenvolvimento de métodos analíticos específicos para quantificar os metabólitos secundários de plantas, sendo os teores destes utilizados como parâmetros para se avaliar a qualidade e a padronização de extratos vegetais. O teor de componentes ativos é fator imprescindível para a eficácia do fitocosmético. Baixos teores em substâncias ativas representam menor biodisponibilidade desses componentes, afetando, assim, sua eficácia e terapêutica.

Entre as atividades biológicas de interesse, destacam-se as avaliadas neste trabalho, como produtos com ação antioxidante, antimicrobiano, antisséptico, com proteção solar, entre outros. A ANVISA (2003) ressalta que como outros produtos que promovem a saúde e o bem-estar, estes devem ser avaliados também quanto aos aspectos toxicológicos. Sendo assim, os ensaios biológicos de toxicidade para avaliação de segurança devem preceder à disponibilidade do cosmético no mercado.

A formulação para obtenção de cosméticos naturais significa dar a preferência, sempre que possível, aos derivados vegetais, evitando a sua substituição por substâncias sintéticas. É extremamente importante realizar um balanceamento lógico e coerente entre as matérias-primas sintéticas e naturais, maximizando a ação farmacológica, a fim de alcançar melhores efeitos (RODRIGUES, 2001; PIETRO *et al.*, 2006).

### 2.8.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Um dos grandes problemas relacionados com a qualidade de cosméticos a base de produtos naturais e matérias-primas, principalmente em seu estado cru, é a sua contaminação microbiológica, que pode se tornar um sério risco para os usuários de plantas medicinais, pois pode compreender a contaminação inclusive com agentes potencialmente patogênicos (TASSANEYAKUL *et al.*, 2004). Material contaminado pode representar falta de cuidado nas etapas de plantio, colheita e processamento do material (MARTINS *et al.*, 2001). A própria água de irrigação pode ser uma fonte de contaminação microbiana.

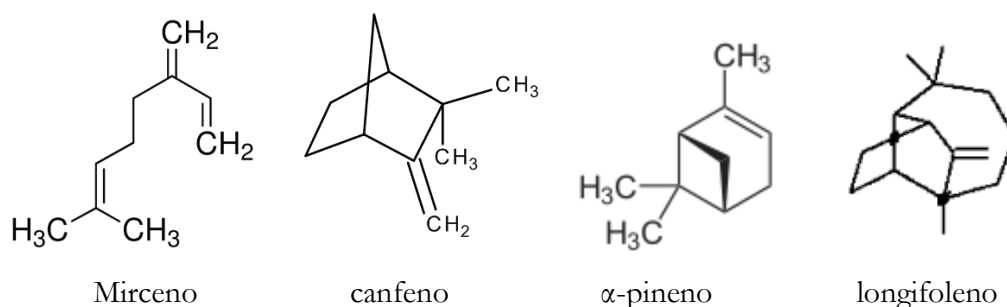
Em princípio, a carga microbiana de uma planta é o resultado de uma série de influências causadas por fontes animadas e inanimadas, podendo ser facilmente transferida por vetores aéreos ou pelo solo (KNEIFEL *et al.*, 2002). No entanto, certas plantas contêm barreiras naturais e

metabólitos com ação antimicrobiana que exercem efeito inibitório no crescimento de microrganismos (DORMAN e DEANS, 2000; SANTOS *et al.*, 2007).

Produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento de novas substâncias, permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiência e outras doenças (ANGÉLICO, 2011). Extratos e óleos essenciais de plantas mostram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos ocorre devido à variedade de substâncias químicas pertencentes às diferentes classes de metabólitos secundários, tais como, cumarina, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWAN, 1999). Várias pesquisas realizadas com plantas demonstraram que os compostos fenólicos como os flavonóides possuem potente ação antibacteriana (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

O uso de plantas aromáticas na medicina popular é bastante difundido no tratamento de infecções microbianas. Vários estudos relatam a atividade antimicrobiana em óleos essenciais como de espécies da família Asteraceae (CARRILLO-HORMAZA *et al.*, 2015), algumas espécies de *Piper* (da SILVA *et al.*, 2014) e várias outras da própria família Lauraceae como *Litsea cubeba* (NGUYEN *et al.*, 2016), *Ocotea caudata* (GIL *et al.*, 2016) e *Endlicheria arenosa* (da SILVA *et al.*, 2016). Em estudos prévios, verificou-se atividade contra *Candida albicans* nos óleos essenciais de *Aniba canelilla* (SILVA, 2012; OGER, 1994). Os óleos essenciais também podem ser utilizados na indústria alimentícia por suas atividades antibacterianas e antifúngicas como aditivos nos alimentos e na ração animal (WALACE, 2004). Alguns monoterpenos e sesquiterpenos, como mirceno, canfeno,  $\alpha$ -pineno e longifoleno (Figura 19) retardam o crescimento de fungos decompositores (KELSEY *et al.*, 1984; DELL e MCCOMB, 1987).

Figura 19 - Estruturas químicas de mono e sesquiterpenos com ação antifúngica.



Fonte: DELL e MCCOMB (1987).



## 2.8.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A presença de substâncias naturais antioxidantes e anti-radicais livres em formulações cosméticas tem favorecido as propriedades curativas e de prevenção relativas a envelhecimento precoce, além de possuir baixa toxicidade em relação aos sintéticos e elevar a qualidade do produto, minimizando os fenômenos de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem (PIETRO *et al.*, 2006).

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), as quais abrangem moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Essas moléculas, conhecidas como Radicais Livres (RL), são muito instáveis, extraordinariamente reativas, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (GASPARRI, 2005).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, pois reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (MELO *et al.*, 2006).

O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O<sub>2</sub> e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988).

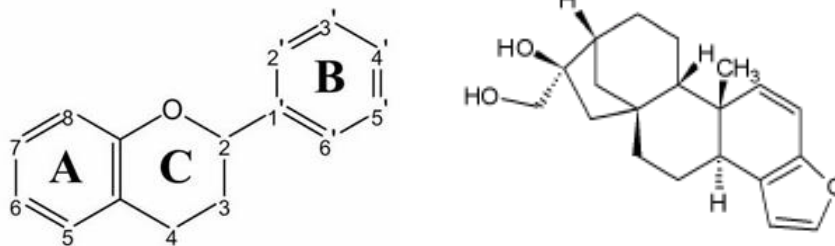
A maioria dos radicais livres age muito rapidamente, podendo ser produzidos com a mesma velocidade com que desaparecem, sendo que quando atacam podem transformar a molécula atacada em outro radical livre, gerando reações em cadeia bastante danosas (YOUNGSON, 1995; CHORILLI *et al.*, 2007a). Se estes radicais atacarem o DNA, ocorrem reações em cadeia causando danos e mutações no material genético ou até mesmo o rompimento dos filamentos de DNA (BUCHLI, 2002; HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; CHORILLI *et al.*, 2007b). Em termos gerais, o dano provocado pelos radicais livres apresenta uma reação química conhecida como oxidação, e os ataques dos radicais livres sobre o tecido são conhecidos como estresse oxidativo (CHORILLI *et al.*, 2007a).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Formam um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 2003). Outros oxidantes podem reparar o dano oxidativo a biomoléculas ou podem influenciar as enzimas que catalisam os mecanismos de reparação.

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém substâncias químicas que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonoides (Figura 20), diterpenos e ácidos fenólicos (MILIAUSKAS *et al.*, 2004).

Figura 20 - Estrutura química geral de um flavonóide e um diterpeno.



Alguns estudos relatam a presença de substâncias antioxidantes em *Aniba canelilla*, nos extratos e óleo essencial obtidos da casca (SILVA *et al.*, 2007), nos extratos de folhas e de galhos finos (SILVA *et al.*, 2012; MESQUITA *et al.*, 2015), sendo atribuída tal atividade à presença de substâncias fenólicas e flavonoides.

### 2.8.3 FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

As radiações solares, além de proporcionar saúde e bem-estar ao homem, também podem ocasionar danos agudos ou crônicos à pele humana, dependendo da duração e frequência de exposição. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele ocupa o

primeiro lugar dentre todos os tumores malignos registrados no Brasil (BALOGH *et al.*, 2011). Por essa razão, o uso de filtros solares tem sido indicado como uma profilaxia contra os raios ultravioletas (URBACH, 2001).

Atualmente, devida à ação fotoprotetora, muitos extratos e óleos de plantas têm sido empregados em produtos cosméticos como protetores solares. Porém, os mesmos devem apresentar moléculas com estruturas semelhantes às dos filtros sintéticos. Segundo Henrique *et al.* (2000), os alcaloides são metabólitos com núcleos aromáticos que agem como absorvedores da radiação ultravioleta e de acordo com Santana *et al.* (2001), a presença de taninos na planta identifica um potencial na absorção da radiação UV.

O fator de proteção solar (FPS) avalia a capacidade dos filtros solares para a porção UVB do espectro eletromagnético. Como o UVB é o responsável por causar eritema na pele, um filtro bastante eficaz é aquele que é capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar. O valor de FPS consiste na razão entre o tempo de exposição à radiação ultravioleta necessário para produzir eritema na pele protegida pelo protetor solar e o tempo, para o mesmo efeito, com a pele desprotegida (RIBEIRO *et al.*, 2004).

O comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) é utilizado para determinação da medida de “amplitude” da proteção nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm, referente à radiação UVA. O  $\lambda_c$  é aquele que corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre os referidos comprimentos de onda. Essa técnica tem sido avaliada e proposta tanto pela COLIPA (European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association) como pela CTFA (Cosmetic, Toiletries and France Association) (COLE, 2000).

Um fotoprotetor, para ser indicado como adequado na proteção à radiação UVA, deve apresentar valor de  $\lambda_c$  maior ou igual a 370 nm. Quanto maior o valor de comprimento de onda crítico, maior a proteção com relação à radiação UVA. No entanto, o comprimento de onda crítico não leva em consideração a intensidade de todo espectro, possibilitando que um filtro com proteção inferior possa apresentar mesmo valor de  $\lambda_c$  que outro, com proteção superior (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; DIFFEY *et al.*, 2000; BOOTS THE CHEMISTS, 2004).

A Equação 1, utilizada para determinação do comprimento de onda crítico, permite a classificação das amostras em 5 diferentes categorias, conforme a Tabela 3 (BOOTS THE CHEMISTS, 2004).

$$0,9 = \frac{\int_{290\text{nm}}^{\lambda} A\lambda, d\lambda}{\int_{290\text{nm}}^{400\text{nm}} A\lambda, d\lambda} \quad (1)$$

Tabela 3 - Classificação da proteção UVA em função do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ).

$\lambda_c$ (nm)	Classificação Amplo Espectro
<325	0
$\geq 325$ e <335	1
$\geq 335$ e <350	2
$\geq 350$ e <370	3
$\geq 370$	4

Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, Fonseca Jr. *et al.* (2015) investigaram a atividade fotoprotetora de *A. canelilla* sendo verificada alta absorção da radiação UVB em seus extratos etanólicos obtidos de folhas e galhos. No trabalho de Martins *et al.* (2016), verificou-se que extratos etanólicos de *A. canelilla* tem um bom potencial fotoprotetor, tendo em vista a característica de seu espectro de absorção, com comprimentos de ondas críticos semelhantes aos de flavonoides.

O espectro de absorção dos flavonoides quando dispersos em etanol e metanol mostra-se com dois picos, sendo um entre 240 a 280 nm e o outro nos comprimentos de 300 a 500 nm (BOBIN *et al.*, 1994).

#### 2.8.4 CITOTOXICIDADE

Os produtos cosméticos são raramente associados com sérios danos à saúde. Entretanto, isto não significa que produtos cosméticos sejam sempre seguros, especialmente considerando os efeitos a longo prazo. Partindo do pressuposto de que estes produtos podem ser usados extensivamente durante um amplo período de tempo, se faz necessário garantir a segurança e eficácia dos mesmos, através do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes (ROMANOWSKI e SCHUELLER, 1996; ANVISA, 2003; CHORILLI *et al.*, 2007b).

A utilização de bioensaios para monitoramento da atividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido incorporada à pesquisa fitoquímica com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994). A letalidade de organismos simples, como *Artemia salina*, tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica (MEYER *et al.*, 1982), onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

Ensaio com células também podem ser utilizados, com fibroblastos primários da derme humana ou outras linhagens celulares como, por exemplo queratinócitos, de acordo com a finalidade do estudo, onde é avaliada visualmente a morte celular pela presença da substância em estudo (IHA *et al.*, 2008).

Em um estudo prévio (SILVA, 2012) foi verificada atividade citotóxica no subproduto da destilação do óleo essencial de *A. canelilla*, o hidrolato, indicando, portanto, a importância de um estudo mais aprofundado dos constituintes dessa espécie.

## Capítulo 3

---

**Avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de *Aniba canelilla*, caracterização química e desenvolvimento de uma formulação cosmética**

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *ANIBA CANELILLA*, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, pois reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (MELO *et al.*, 2006).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Formam um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 2003). Outros oxidantes podem reparar o dano oxidativo a biomoléculas ou podem influenciar as enzimas que catalisam os mecanismos de reparação.

Segundo Tomei e Salvador (2007), vários métodos podem ser encontrados na literatura para determinação da atividade antioxidante e são divididos em métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos consistem em estudos de cinética química onde o sistema é caracterizado pela competição de uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres (ROGINSKI, 2005). Os métodos indiretos são mediados pela transferência de elétrons por uma reação de oxirredução (BENZIE *et al.*, 1999) e são monitorados espectrofotometricamente.

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes (MILIAUSKAS *et al.*, 2004). A adição de extratos, ceras e óleos essenciais em produtos cosméticos agrega características benéficas aos mesmos, uma vez que apresentam atividades biológicas interessantes, devido à presença de metabólitos secundários como os fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros (SOUZA *et al.*, 2009). Seguindo esta tendência, surge a necessidade de estudos científicos que comprovem os efeitos

benéficos desses componentes quando adicionados às diferentes formulações cosméticas, visando garantir a eficácia das mesmas (BALOGH, 2011).

A espécie *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez é nativa da região Amazônica, popularmente conhecida como casca-preciosa, casca-do-maranhão, canela-cheirosa, folha-preciosa, arapaima, amapaíama, pereiorá, pau-precioso, e pau-rosa (MAIA *et al.*, 2000; MORS *et al.*, 2000), é muito utilizada na medicina popular contra artrismo, esgotamento nervoso, como redutora da albumina no sangue (SILVA, 1977; LUPE 2007), contra hidropsia, catarro crônico, sífilis, leucorréia, aerofagia, males do coração (INTERAMINENSE *et al.*, 2010), para amenizar a dor após extração de dentes (MORS *et al.*, 2000), tratar anemia, além de ser usada como anti-desentérico, anti-espasmódico e anti-inflamatório, digestivo, eupéptico, peitoral e estimulante (MAIA *et al.*, 2000), bem como no tratamento de resfriados, dor de cabeça e náuseas (SILVA, 1977; LUPE, 2007).

Diversas atividades biológicas já foram descritas para os metabólitos dessa espécie, tais como, vasorrelaxante (INTERAMINENSE *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2013; ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014), cardiovascular (LAHLOU, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2010; INTERAMINENSE *et al.*, 2011), antinociceptiva (LIMA *et al.*, 2009), antioxidante (SILVA *et al.*, 2007; SILVA, 2012), antimicrobiana (SILVA, 2012), citotóxica (SILVA *et al.*, 2007), citoprotetora (COSKER *et al.*, 2014), anti-inflamatória (VALE *et al.*, 2013), inibitória da acetilcolinesterase (SILVA *et al.*, 2014), hipnótica, anticonvulsiva e ansiolítica (OYEMITAN *et al.*, 2013).

Nesse sentido, com o intuito de favorecer o uso sustentável da biodiversidade amazônica utilizando-se do potencial dos metabólitos secundários de *A. canelilla* para formulação de um fitocosmético, foram investigadas as atividades antioxidante, por método direto e indireto, e citotóxica dos extratos e óleos essenciais desta espécie. Foram investigadas as classes químicas presentes nos metabólitos de folhas e galhos de *A. canelilla*, caracterizando-se as moléculas bioativas. Finalmente, foi formulada uma emulsão antioxidante, avaliando suas características físico-químicas e sua estabilidade preliminar.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas e galhos finos de *A. canelilla* foram coletados no período de cheia (abril de 2011) e de seca (setembro de 2014) na Reserva Florestal Adolpho Ducke (3° 05' S, 60° 00' W) em Manaus, Amazonas, no período matutino. Os dados referentes aos índices pluviométricos foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia. Os mapas climáticos analisados indicaram que não houve quaisquer mudanças atípicas referentes ao clima da região no período da coleta do material



vegetal (INMET, 2014). As plantas coletadas foram identificadas comparando-as com uma excicata depositada no Herbário do INPA pelo projeto “Potencial biotecnológico da produção sustentável de óleos essenciais e compostos com atividade antifúngica de espécies da família Lauraceae”, edital MCT/CNPq/FNDCT – Ação Transversal/CT-Amazônia/CT-Biotec/ Bionorte nº 066/2009.

O material vegetal foi colhido de onze árvores, seco por 10 dias à temperatura ambiente e à sombra e triturado em um moinho elétrico de facas com tela de 3 mm. O material vegetal seco e triturado foi macerado a frio em álcool etílico 92,8° INPM à temperatura ambiente por 3 ciclos de 48 horas com filtração e renovação do solvente a cada ciclo, seguido de 20 min no ultrassom (SILVA, 2012; CURSINO, 2011). O filtrado foi submetido à evaporação sob pressão reduzida, a 40 °C, em evaporador rotativo. Parte do extrato bruto resultante foi dissolvido em etanol-água (1:3) e submetido à partição líquido-líquido, utilizando *n*-hexano e diclorometano, restando ainda uma fração hidroetanólica que foi levada ao liofilizador (Christ – Alpha 1-2 LD plus) sob pressão de 0,04 mbar e temperatura de -45°C. Assim, o material obtido para análise consistiu em extrato etanólico (bruto), fase *n*-hexânica (partição), fase diclorometânica (partição) e fase hidroalcoólica (partição), de folhas e galhos de *A. canelilla*.

Os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* foram obtidos por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger modificado, onde 100 g do material vegetal foram destilados com um litro de água destilada a 100°C durante 3,5 h para folhas e 6 h para galhos (CHAAR, 2000; FERRAZ, 2012). Posteriormente, os óleos foram levados à centrifugação para separação da água e secos por percolação em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, obtendo-se assim, os óleos essenciais.

### 3.2.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste trabalho, óleos e extratos de folhas e galhos de casca-preciosa foram avaliados pelo método direto para determinação da atividade antioxidante, utilizando-se o sistema β-caroteno/ácido linoleico, inicialmente desenvolvido por Marco (1968) e Miller (1971), sendo adaptado por Mattos *et al.* (2009). As amostras também foram avaliadas pelo método indireto, de redução do radical livre DPPH, descrito inicialmente por Brand-Williams *et al.* (1995), modificado por Sánchez-Moreno *et al.* (1998), Mensor *et al.* (2001), Silva *et al.* (2007) e Rufino *et al.* (2007) e adaptado por Silva (2012).

#### 3.2.2.1 Método de Captura do Radical Livre DPPH•

Um dos métodos mais usados na determinação da atividade antioxidante consiste em avaliar a capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura que possui absorção máxima em 517 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou

uma espécie radicalar (R), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; 2002).

A solução de DPPH• foi preparada na concentração 0,06 mol/L com metanol P. A., no mesmo dia da análise e protegida da exposição à luz. Para o preparo das soluções teste foram pesados 0,0128 g de extrato seco ou de óleo essencial e solubilizados em metanol P. A., avolumando-se para 10 mL. A partir da solução estoque foram feitas diluições sucessivas em progressão geométrica com razão igual a 0,5 utilizando como solvente metanol P. A., em microtubos, até a concentração de 5,0 µg/mL. Soluções estoque dos padrões ácido ascórbico e quercetina foram preparadas a 800 µg/mL. Em seguida, foram feitas as diluições necessárias obtendo-se as concentrações finais de 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 e 0 µg/mL para a construção das curvas analíticas.

Para o ensaio da atividade antioxidante foram transferidos 50 µL de cada concentração da amostra teste, em triplicata, para tubos de ensaio, protegidos da exposição direta da luz, sendo adicionados 1950 µL da solução de DPPH• seguido de homogeneização da mistura. O controle foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por metanol P. A. O branco foi preparado adicionando-se 1950 µL de metanol P. A. e 50 µL da solução-teste contendo a mesma concentração de cada ensaio para a calibração do espectrofotômetro. Após 30 minutos de reação, verificou-se a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição de DPPH• conforme a Equação 2, e por meio de regressão linear foi determinado a Concentração Eficiente (CE<sub>50</sub>), concentração de amostra necessária para o sequestro de 50% dos radicais livres DPPH• (SILVA *et al.*, 2007).

$$AA\% = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.2.2 Sistema β-Caroteno/Ácido Linoléico

A solução controle foi preparada com ácido ascórbico a 200 mg/L em álcool etílico. A solução de β-caroteno/ácido linoleico foi preparada pesando-se 1 mg de β-caroteno seguido da adição de 1 mL de clorofórmio P.A. A esta mistura foram adicionados 400 µL de Tween 80, 50 µL de ácido linoleico e 5 mL de água oxigenada, seguida de total evaporação do clorofórmio. A água

utilizada para este ensaio foi oxigenada por borbulhamento durante 30 min. Essas soluções foram armazenadas em vidro âmbar e utilizadas imediatamente após o preparo. Foram então adicionados mais 95 mL de água oxigenada, totalizando 100 mL. A absorvância da solução foi avaliada em espectrofotômetro, calibrado com água oxigenada, a 480 nm, devendo estar entre 0,7 e 0,9. Essa solução sistema deve apresentar uma coloração amarelo-alaranjada e deve ser protegida da luz e imediatamente utilizada.

A solução teste foi preparada na concentração de 1280 mg/mL, utilizando-se metanol. O teste então foi realizado com 1900  $\mu$ L da solução de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico reagindo com 100  $\mu$ L da solução das amostras, seguido de homogeneização. O branco foi preparado com a substituição da solução do extrato por metanol P.A. A solução foi incubada em banho-maria a 50°C. Leituras das absorvâncias a 470 nm foram realizadas a cada 30 min durante 120 min.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorvância do sistema sem antioxidante (Equação 3) foi considerada como 100% de oxidação.

$$\text{Redução da absorvância} = Abs_{inicial} - Abs_{final} \quad (3)$$

Os decréscimos de absorvância das amostras foram correlacionados com o sistema e estabeleceu-se a porcentagem de oxidação (Equação 4), subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Equação 5). A ação antioxidante da amostra foi comparada com a atividade dos antioxidantes padrão ácido ascórbico e quercetina.

$$\% \text{ Oxidação} = \frac{[(\text{Redução } Abs_{amostra}) \times 100]}{\text{Redução } Abs_{sistema}} \quad (4)$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação}) \quad (5)$$

Por meio de regressão linear foram obtidos os valores de  $CP_{50}$ , que corresponde à concentração que oferece 50% de proteção da oxidação.

### 3.2.2.3 Análise Estatística dos Resultados

Os dados de atividade antioxidante foram expressos em média e desvio padrão da média, sendo aplicado o teste t de Student para comparação entre duas médias e teste de ANOVA One Way para análise de variância em mais de duas médias, seguida de teste de Tukey para discriminação das diferenças. Foram consideradas as diferenças com  $p \leq 0,05$  como significativas.

### 3.2.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A atividade citotóxica das amostras que apresentaram atividade antioxidante foi avaliada através de letalidade contra *Artemia salina* Leach, de acordo com o método proposto por Meyer *et al.* (1982) e McLaughlin *et al.* (1991).

As soluções testes foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, seguindo-se de diluições seriadas até a concentração de 0,125 mg/mL solubilizando-se em 1% de Tween 80 para óleos e DMSO para extratos e partições. As soluções foram avolumadas com solução salina na mesma concentração do meio de cultivo. Como meio de crescimento, foi utilizada uma solução salina contendo 38 g de sal marinho sintético em água destilada, preparando-se 1 L de solução (3,8%), e para a eclosão, foram adicionados 10 mg de cistos de *Artemia salina*. O crescimento ocorreu em temperatura ambiente, de 25 a 28°C, sob iluminação em lâmpada fluorescente durante 48 h e aeração constante.

Após as 48 h da eclosão, os náuplios foram transferidos para tubos de ensaio, sendo distribuídas 15 larvas de *Artemia salina* para cada tubo. Nos tubos foram adicionados 5 mL das soluções teste, em triplicata. No controle, a solução teste foi substituída pelo solvente utilizado para solubilizar o óleo ou extrato. Para evitar a mortalidade no grupo controle, foi elaborado um sistema de aeração constante e os tubos de ensaio contendo as larvas de *Artemia salina* foram mantidas por 24 h sob iluminação de lâmpada fluorescente.

Após o período de exposição, foi analisado o número de larvas sobreviventes, tanto nos tubos de controles quanto nos tratamentos. Foram feitas diluições sucessivas das soluções seguindo uma progressão geométrica para a determinação da Concentração Letal que causa morte de 50% de uma população (CL<sub>50</sub>), obtida por meio de regressão linear.

### 3.2.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS E EXTRATOS DE *Aniba canelilla*

Para a prospecção fitoquímica preliminar dos metabólitos presentes em folhas e galhos de *A. canelilla*, foi utilizada a metodologia descrita por Matos (2009) e pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2016), com adaptações. Para cada procedimento foram preparadas soluções a 2 mg/mL em álcool etílico P. A. Os ensaios realizados consistiram em testes para verificar a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas, taninos e compostos fenólicos.

Alcaloides: em tubo de ensaio com 2,0 mL de amostra acrescentaram-se três gotas do reagente de Drangendorff para a observação da presença de precipitado (precipitado floculoso, em pelo menos dois tubos é indicativo de alcaloides).

Esteroides: foi realizada a reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), misturando 2,0 mL de amostra a 2,0 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada em um funil com algodão coberto com sulfato de sódio anidro em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentaram-se três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado observando-se o desenvolvimento de cores: coloração azul seguida de verde permanente indica presença de esteroides livres.

Flavonoides: foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg). Adicionou-se a 2,0 mL de amostra, aproximadamente 0,5 cm de Mg em fita e 2,0 mL de HCl concentrado. O fim da reação é determinado pelo término da efervescência e pode ser considerado positivo se houver o aparecimento da cor vermelha. Além disso, para confirmação dos resultados, foi realizado o teste de alcalinização das amostras, utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3,0 mL da amostra em um tubo de ensaio, até pH 11,0 observando-se a mudança de cor. O aparecimento de cor amarela indica a presença de flavonas, flavonóis e xantonas e a coloração vermelho laranja a de flavonóis.

Saponinas: para determinação da presença de saponinas nas amostras foram misturados 2,0 mL de clorofórmio junto a 2,0 mL de extrato e 5,0 mL de água destilada. Em seguida, foi separada a fração aquosa e depois agitada para observação de uma possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas.

Fenóis e Taninos: para determinação da presença de taninos nas amostras, em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL de extrato foram adicionadas três gotas de FeCl<sub>3</sub>. Após forte agitação foi observada a mudança de cor ou formação de precipitado abundante. Coloração entre azul e vermelho indica presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

### 3.2.5 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA (CCA)

A fim de purificar as amostras ativas, estas foram submetidas à separação por cromatografia em coluna aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60. Foram empregados como sistemas de eluição: acetona, acetato de etila/etanol (8:2), acetato de etila/etanol (1:1), acetona/etanol (1:1), acetona/etanol (8:2), etanol/acetona (8:2), metanol, metanol/ácido acético (8:2), metanol/água (8:2), metanol/ácido acético (1:1). Foram usados 60 mL de cada eluente, seguindo a ordem crescente de polaridade, coletando-se frações de 5 mL.

### 3.2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As frações obtidas em coluna foram analisadas por CLAE utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu Promience com detector Diode Array (DAD), uma coluna Shim-pack 2,0 mm ID x 100 mm e acetonitrila/água como eluente (35:65). As amostras foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL em acetonitrila com massa seca de cada fração de 5,0 mg. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas no equipamento. Os cromatogramas obtidos foram usados para avaliar o perfil químico e reunir as frações semelhantes.

### 3.2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Após reunir as frações semelhantes, os grupos e frações isoladas foram avaliadas novamente quanto à atividade antioxidante e as que apresentaram as maiores atividades foram submetidas à caracterização química por espectrometria de massa usando um espectrômetro *ion trap* LCQ Fleet™ (Thermo Scientific) equipado com uma fonte *eletronspray*, operando no modo negativo e programado para monitorar a faixa de  $m/z$  50-200. As soluções foram diluídas a 5 ppm em metanol grau HPLC e aplicadas por inserção direta através da bomba seringa do próprio equipamento. Para analisar as frações utilizaram-se os seguintes parâmetros de operação: *spray voltage*: 5kV, *sheath gas*: 8arb, *aux gas*: 5 arb, *sweep gas*: 5 arb, *capilar temp*: 175 °C, *capilar voltage*: 50V (folhas) e 35V (galhos), *tube lens*: 120 V, *syringe pump*: 8 µL/min.

### 3.2.7 PREPARO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

As emulsões foram elaboradas pela técnica da inversão de fases em quatro formulações diferentes e em duplicata contendo cera automemulsionante não-iônica Crodabase CR2 (35,0 g), miristrato de isopropila (17,5 g), silicone (17,5 g), propilparabeno (0,50 g), óleo mineral (17,5 g), água (370,0 g), propilenoglicol (10,0 g), EDTA (0,50 g), metilparabeno (0,75 g), glicerina (20,0 g), ureia (0,50 g) e essência (1,0 mL). As quatro formulações foram divididas pelo antioxidante utilizado sendo: (i) contendo BHT (0,1750 g); (ii) com extrato hidroalcoólico de galhos (0,1750 g); (iii) com extrato hidroalcoólico de folhas (0,1750 g); e (iv) com glicerina, como controle. As fases aquosas e oleosas foram aquecidas a 75°C vertendo-se posteriormente a fase aquosa à fase oleosa sob agitação constante (1200 rpm) até o arrefecimento natural à temperatura ambiente, onde os conservantes e antioxidantes foram adicionados. Após 24 h do preparo das emulsões, foram determinadas as características macroscópicas, físico-químicas e a atividade antioxidante.

### 3.2.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As emulsões formuladas foram conduzidas ao estudo de estabilidade preliminar (estresse térmico e ciclo gela-degela), sendo monitorados os parâmetros organolépticos e físico-químicos (centrifugação, pH e condutividade, densidade e espalhabilidade) das formulações.

**Estresse Térmico:** consistiu no aquecimento das emulsões na faixa de temperatura de 40 a 80°C. O aumento da temperatura ocorreu de  $5\pm 1^\circ\text{C}$  em  $5\pm 1^\circ\text{C}$ , por 30 min em cada temperatura. Os ensaios físico-químicos foram realizados ao término do aquecimento a 80°C, após o arrefecimento natural das amostras à temperatura ambiente (FERRARI, 1998).

**Ciclo Gela-Degela:** as emulsões foram expostas a variações de temperatura por um período de 12 dias. As amostras foram submetidas a  $4\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h em geladeira e  $45\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h em estufa, completando assim, um ciclo. As análises foram realizadas ao final do 6º ciclo (12 dias).

**Teste de Centrifugação:** os testes de centrifugação foram realizados 24 h após o preparo das emulsões, em duplicata, acondicionando-se 5,0 g de amostra em tubos centrífugos e submetendo-os a 1000, 2500 e 3500 rpm, correspondentes a 70, 440 e 863 g, respectivamente, durante 30 min em cada rotação a 25°C, em uma centrífuga Centrifuge Model 90-1.

**pH e Condutividade:** os valores de pH foram determinados com auxílio de pHmetro (GEHAKA PG 1800), por meio da dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra ensaiada em água destilada, avaliando a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo (BRASIL, 2004). Da mesma maneira, foi avaliada a condutividade das emulsões em condutivímetro (GEHAKA CG 1800). As análises foram realizadas em duplicata.

**Densidade Relativa:** a densidade relativa das formulações foi obtida de acordo com a ANVISA (2007), por meio de um picnômetro de vidro e uma balança analítica, avaliando a relação entre a massa da amostra e da água a 20° C. O ensaio foi realizado em duplicata.

**Espalhabilidade:** a medida da espalhabilidade foi realizada posicionando-se uma lâmina de vidro sobre outra contendo 25 mg da amostra. O raio formado pelo espalhamento da base cremosa foi medido e repetiu-se o procedimento, sempre a intervalos de 1 min, adicionando-se pesos aferidos de 2,1 g, 2,1 g e 4,6 g (FERNANDEZ-MONTES, 2005).

**Parâmetros Organolépticos:** foram avaliados cor, odor e aspecto, comparando as formulações após 24 h de sua elaboração e após os testes de estabilidade. Para esta avaliação, levou-se em conta a classificação em: normal, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (ANVISA, 2004).

### 3.2.9 TESTE DE EFICÁCIA (ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA EMULSÃO)

O ensaio consistiu em determinar a atividade antioxidante das formulações obtidas comparando-as com as formulações contendo o antioxidante de referência utilizados em cosméticos, o BHT. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical livre DPPH (seção 3.2.2). As soluções teste foram preparadas utilizando a formulação obtida em substituição aos extratos e óleos da planta.

### 3.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados analisados foram submetidos ao teste t de Student para comparação entre duas médias independentes e emparelhadas, e a ANOVA (Análise de Variância) para comparação de mais de duas médias. Os dados foram tratados com o programa Biostat, Versão 5.0.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL, EXTRATOS ETANÓLICOS E PARTIÇÕES

Os óleos essenciais foram obtidos com um rendimento médio de 1,02 % m/m para as folhas e 1,409 % m/m para os galhos finos. Os óleos essenciais apresentaram coloração escura nas folhas e amarelada nos galhos que iam também escurecendo conforme o progresso da extração. O rendimento dos extratos etanólicos foi de 5,916 g (1,48% do material vegetal) para as folhas e 5,197 g (1,30% do material vegetal) para os galhos. Após submeter 3,9442 g de extrato etanólico das folhas à partição líquido-líquido, obteve-se 1,7249 g (43,73% do extrato bruto) de fase hexânica, 0,6324 g (16,03% do extrato bruto) de fase diclorometânica e 1,5243 g (38,65% do extrato bruto) de fase hidroalcoólica. Para os galhos, com 3,4648 g de extrato etanólico foram obtidos 0,5003 g (14,44% do extrato bruto) de fase hexânica, 0,4213 g (12,16% do extrato bruto) de fase diclorometânica e 2,4932 g (71,96% do extrato bruto) de fase hidroalcoólica.

### 3.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO DPPH

Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em percentual de atividade antioxidante, e por meio de regressão linear foram obtidas as  $CE_{50}$  para cada extrato e óleo essencial, obtidos de folhas e galhos de *A. canelilla* coletados no período da seca e da cheia. Os resultados foram comparados com as  $CE_{50}$  das soluções padrões (ácido ascórbico e quercetina), conforme apresentado na Tabela 4.



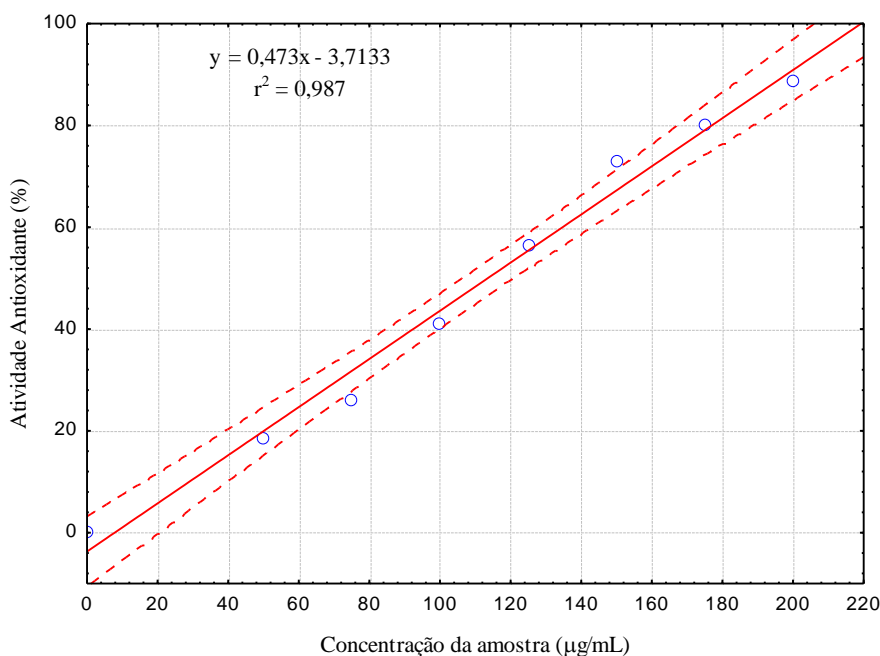
Tabela 4 - Atividade antioxidante expressa em porcentagem de inibição com os cálculos da concentração eficiente (CE<sub>50</sub>) expressa em µg/mL para os extratos, partições e óleos essenciais de folhas e galhos dos períodos de cheia e seca.

		% Inibição ± desvio Padrão							
[ µg/mL	EBF CHEIA	EBF SECA	FHF CHEIA	FHF SECA	FDCMF CHEIA	FDCMF SECA	FHAF CHEIA	FHAF SECA	
80	10,79 ± 2,65	3,03 ± 0,455	7,86 ± 1,31	0,799 ± 0,652	6,18 ± 1,31	6,976 ± 0,22	11,69 ± 2,59	21,05 ± 1,181	
160	27,24 ± 2,99	8,33 ± 0,182	16,62 ± 0,86	0,188 ± 0,293	14,02 ± 0,57	14,244 ± 1,17	36,17 ± 16,53	34,80 ± 1,034	
320	52,01 ± 2,63	17,63 ± 0,350	35,57 ± 1,89	0,940 ± 0,165	24,43 ± 0,17	27,024 ± 0,51	60,06 ± 18,79	63,62 ± 1,464	
640	92,23 ± 1,17	36,76 ± 0,520	64,44 ± 0,86	2,679 ± 0,287	44,07 ± 0,38	47,415 ± 1,68	80,57 ± 0,36	95,48 ± 0,703	
1280	92,65 ± 0,40 <sup>a</sup>	68,90 ± 0,102 <sup>b</sup>	89,83 ± 0,14 <sup>c</sup>	6,532 ± 0,990 <sup>d</sup>	73,34 ± 0,55 <sup>e</sup>	80,049 ± 1,54 <sup>e</sup>	82,16 ± 0,13 <sup>f</sup>	95,97 ± 0,077 <sup>f</sup>	
CE <sub>50</sub>	336,18 ± 10,23	876,16 ± 7,898	486,27 ± 10,07	23167,52	789,46 ± 47,89	665,468 ± 17,39	344,24 ± 21,31	301,76 ± 10,91	
[ µg/mL	EBG CHEIA	EBG SECA	FHG CHEIA	FHG SECA	FDCMG CHEIA	FDCMG SECA	FHAG CHEIA	FHAG SECA	
80	9,28 ± 0,88	8,18 ± 0,80	8,32 ± 0,74	-0,125 ± 0,250	2,08 ± 0,53	2,809 ± 0,51	13,76 ± 1,79	21,75 ± 1,834	
160	18,72 ± 0,25	17,47 ± 1,00	17,38 ± 2,14	-0,584 ± 0,313	5,79 ± 1,79	5,865 ± 0,10	28,84 ± 3,36	37,13 ± 2,536	
320	36,44 ± 0,72	32,99 ± 0,55	32,13 ± 0,76	0,417 ± 0,255	20,29 ± 4,91	13,948 ± 0,17	60,86 ± 4,21	61,63 ± 2,136	
640	69,63 ± 1,84	70,56 ± 0,42	63,20 ± 2,01	0,459 ± 0,134	31,39 ± 0,70	30,409 ± 1,88	78,83 ± 0,33	93,80 ± 1,083	
1280	92,07 ± 0,10 <sup>a</sup>	89,39 ± 0,30 <sup>a</sup>	91,16 ± 0,15 <sup>c</sup>	2,003 ± 0,125 <sup>d</sup>	53,05 ± 0,01 <sup>e</sup>	62,297 ± 1,74 <sup>e</sup>	77,98 ± 0,54 <sup>f</sup>	94,82 ± 0,230 <sup>f</sup>	
CE <sub>50</sub>	453,72 ± 11,36	460,98 ± 2,837	503,25 ± 14,16	39283,09	1074,97 ± 153,9	1013,36 ± 66,92	358,3 ± 16,28	299,69 ± 10,909	
[ µg/mL	Ácido Ascórbico	Quercetina	OEF CHEIA		OEF SECA	OEG CHEIA	OEG SECA		
75	26,16 ± 1,59	7,37 ± 1,90							
100	41,08 ± 2,42	61,66 ± 0,73	nd		nd	nd	nd		
125	56,45 ± 3,81	84,52 ± 1,14							
150	73,04 ± 2,57	88,11 ± 0,04							
175	80,09 ± 0,30	88,48 ± 0,58							
200	88,65 ± 1,05	88,16 ± 1,46							
CE <sub>50</sub>	113,55 ± 2,42	104,35 ± 0,73							

EBF-Extrato etanólico bruto das folhas; EBG-Extrato etanólico bruto dos galhos; FHF-Fase hexânica das folhas; FHG-Fase hexânica dos galhos; FDCMF-Fase diclorometânica das folhas; FDCMG-Fase diclorometânica dos galhos; FHAF-Fase hidroalcoólica das folhas; FHAG-Fase hidroalcoólica dos galhos; OEF-Óleo essencial das folhas; OEG-Óleo essencial dos galhos; CE<sub>50</sub>-Concentração eficiente que inibe 50% dos radicais livres (µg/mL). Letras minúsculas sobrescritas indicam as diferenças estatísticas.

Os padrões apresentaram  $CE_{50}$  de  $104,35 \pm 0,73 \mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0,825$ ) para quercetina e  $113,55 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0,987$ ) para o ácido ascórbico. A Figura 21 apresenta a curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção da  $CE_{50}$  das amostras dos extratos de *A. canelilla*.

Figura 21 - Curva analítica do ácido ascórbico utilizada para determinação da Concentração Eficiente ( $CE_{50}$ ). As linhas tracejadas representam o limite de confiança em 95%.



De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, observa-se que os extratos etanólicos brutos de *A. canelilla* apresentaram valores significativos de atividade antioxidante, chegando a inibir mais de 90% dos radicais livres presentes nas soluções. Nota-se também que o extrato etanólico bruto das folhas coletadas do período da cheia apresentaram mais componentes antioxidantes ( $CE_{50} = 336,18 \pm 10,23 \mu\text{g/mL}$ , aproximadamente 3 vezes menos eficiente que o padrão ácido ascórbico), que o extrato bruto das folhas coletadas na seca ( $CE_{50} = 876,16 \pm 7,898 \mu\text{g/mL}$ , 7,75 vezes menos eficiente que o padrão ácido ascórbico). Os extratos etanólicos brutos dos galhos também apresentaram alta atividade antioxidante, tanto para o extrato obtido dos galhos coletados na cheia ( $CE_{50} = 453,72 \pm 11,36 \mu\text{g/mL}$ ), como na seca ( $CE_{50} = 460,98 \pm 2,837 \mu\text{g/mL}$ ), ambos se mostrando aproximadamente 4 vezes menos eficientes que o ácido ascórbico (sem diferença estatística entre os períodos de coleta).

Para as fases hexânicas de folhas e galhos, foi observada atividade antioxidante apenas para as fases obtidas com material vegetal coletado no período de cheia. As fases hexânicas de folhas ( $CE_{50} = 486,27 \pm 10,07 \mu\text{g/mL}$ ), e de galhos ( $CE_{50} = 503,25 \pm 14,16 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram-se

aproximadamente 4,5 vezes menos eficiente que o padrão ácido ascórbico. As fases hexânicas obtidas de folhas e galhos coletados na seca não apresentaram atividade antioxidante significativa, sendo observados valores de  $CE_{50}$  extremamente altos.

As fases diclorometânicas apresentaram-se similares, quando se comparam os dois períodos de coleta, sendo a  $CE_{50} = 789,46 \pm 47,89 \mu\text{g/mL}$  para a fase das folhas coletadas na cheia, e  $CE_{50} = 665,468 \pm 17,39 \mu\text{g/mL}$ , para as coletadas na seca (aproximadamente 6,5 vezes menos eficiente que o ácido ascórbico). Os valores de  $CE_{50}$  para as fases diclorometânicas obtidas de galhos foram de  $1074,97 \pm 153,9 \mu\text{g/mL}$  (cheia) e de  $1013,36 \pm 66,92 \mu\text{g/mL}$  (seca), sendo aproximadamente 10 vezes menos eficiente que o padrão ácido ascórbico.

Os extratos das fases hidroalcoólicas das folhas apresentaram as mais altas atividades antioxidantes, inibindo até 95% dos radicais livres. As fases hidroalcoólicas das folhas coletadas na cheia apresentaram  $CE_{50} = 344,24 \pm 21,31 \mu\text{g/mL}$ , e as das coletadas na seca  $CE_{50} = 301,76 \pm 10,91 \mu\text{g/mL}$  (2,66 vezes menos eficiente que o padrão ácido ascórbico). As fases hidroalcoólicas dos galhos apresentaram  $CE_{50} = 358,3 \pm 16,28 \mu\text{g/mL}$  (cheia), e  $CE_{50} = 299,69 \pm 10,909 \mu\text{g/mL}$  (seca).

Os óleos essenciais de folhas e galhos obtidos de material vegetal coletado nos dois períodos de coleta não apresentaram atividade antioxidante pelo método estudado, corroborando os resultados encontrados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, onde os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. camelilla* foram analisados em 30, 60 e 90 minutos de reação com o DPPH, e também não apresentaram atividade antioxidante (SILVA, 2012).

Verifica-se ainda que a maior parte das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante foi separada na fase hidroalcoólica, que possui o caráter mais polar dos extratos, sendo este resultado de concentração eficiente bem próximo ao do antioxidante padrão, ácido ascórbico. Tal resultado pode ser explicado pela maior solubilidade das substâncias antioxidantes em solvente polares, pois o ensaio utilizando o radical estável DPPH mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio radicalar a este radical, e assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior seu potencial antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). O aumento do número de hidroxilas nas substâncias também aumenta sua polaridade, e conseqüentemente, essas substâncias podem ser extraídas nas fases mais polares da partição.

As substâncias responsáveis pela inibição da oxidação deste extrato, ao doar hidrogênios radicalares para a redução do DPPH, podem possuir a capacidade de deslocalizar o radical para sua estrutura, devido à alta estabilidade do novo radical formado, pois além da redução do DPPH ocorrer no primeiro minuto da reação (observado visualmente), após trinta minutos de reação, a absorvância permaneceu constante.

Silva *et al.* (2007), ao analisar extratos metanólicos de *A. canelilla*, encontraram alta atividade antioxidante, com concentrações eficientes equivalentes às encontradas neste trabalho. Analisando os óleos essenciais do tronco, folhas e galhos, os autores perceberam que, embora menor que nos extratos, havia atividade antioxidante relevante nos óleos ( $CE_{50} = 223,81 \pm 1,88 \mu\text{g/mL}$ ) e, ao analisarem a atividade antioxidante do composto majoritário 1-nitro-2-feniletano ( $CE_{50} = 792,50 \pm 9,97$ ), concluíram que o potencial antioxidante da espécie não é devido exclusivamente a este composto. A diferença nos resultados encontrados por Silva *et al.*, quando comparados com os obtidos no presente trabalho pode ser explicada levando em consideração a amostra vegetal, que foi coletada em Ulinópolis-PA e Novo Airão-AM, enquanto que os indivíduos de *A. canelilla* utilizados neste trabalho foram oriundos de Manaus-AM. Vale ressaltar que neste trabalho foram feitos estudos em duas épocas de coleta diferentes, cheia e seca, com uma amostragem de 10 árvores ( $n=10$ ), e em nenhuma amostra de óleo observou-se atividade antioxidante.

De acordo com Soares *et al.* (2008), os compostos fenólicos são substâncias com grande potencial antioxidante, pertencentes às classes de taninos e flavonoides. São formados no metabolismo secundário de vegetais, possuindo funções de defesa contra o ataque de pragas. Silva *et al.* (2007), ao analisarem os óleos essenciais de folhas e galhos finos de *A. canelilla* descreveram a presença do terpeno  $\beta$ -cariofileno. Associado com compostos fenólicos, o  $\beta$ -cariofileno tem seu potencial antioxidante aumentado através do efeito sinérgico, o que pode ter sido um dos responsáveis pela boa atividade antioxidante descrita pelos autores.

### 3.3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - SISTEMA $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

Os resultados foram obtidos pelo monitoramento da redução da absorbância ao longo do tempo de reação. As Figuras 22 a 25 mostram os gráficos para o extrato bruto e partições obtidos das folhas de *A. canelilla* coletadas no período da seca.

Figura 22 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para o extrato etanólico das folhas de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

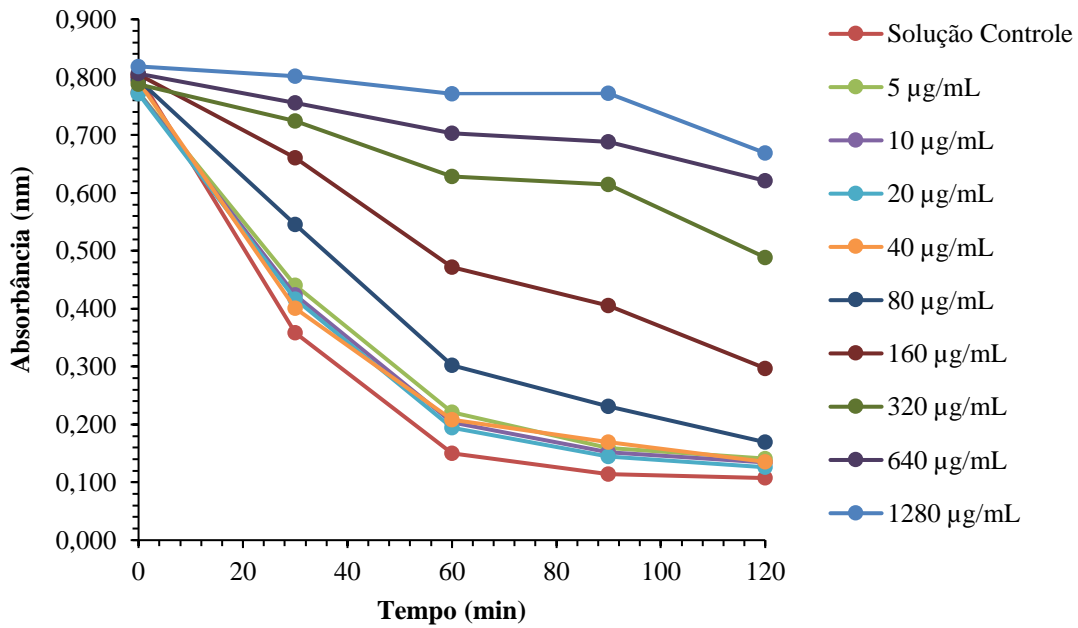


Figura 23 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase diclorometânica das folhas de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

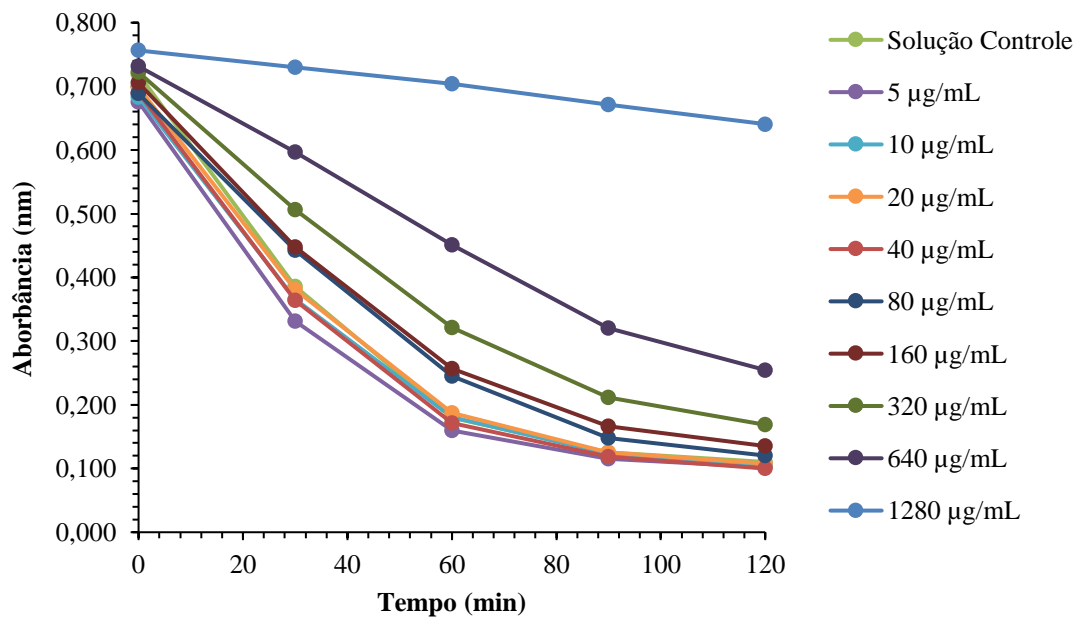


Figura 24 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hexânica das folhas de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

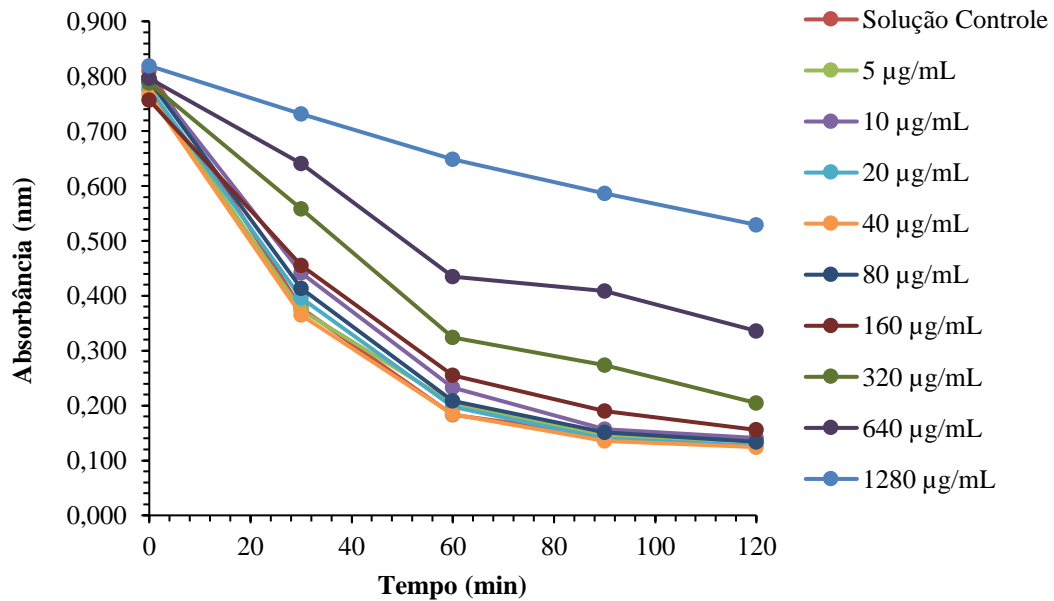
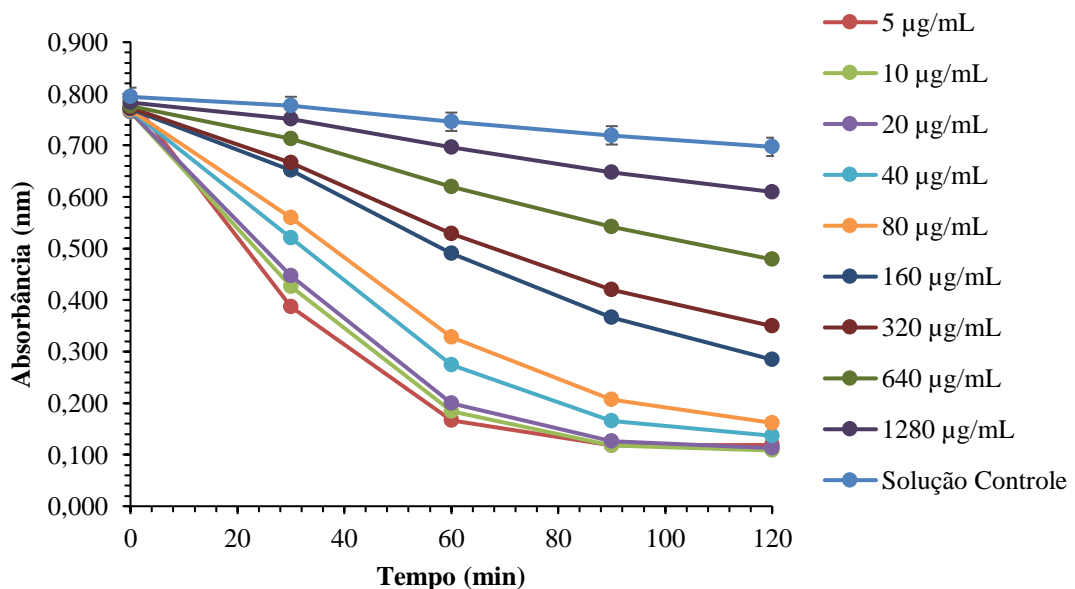


Figura 25 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hidroalcoólica das folhas de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).



As Figuras 26 a 29 mostram os gráficos para o extrato bruto e partições obtidos dos galhos de *A. canelilla* coletados no período da seca.

Figura 26 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para o extrato etanólico dos galhos de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

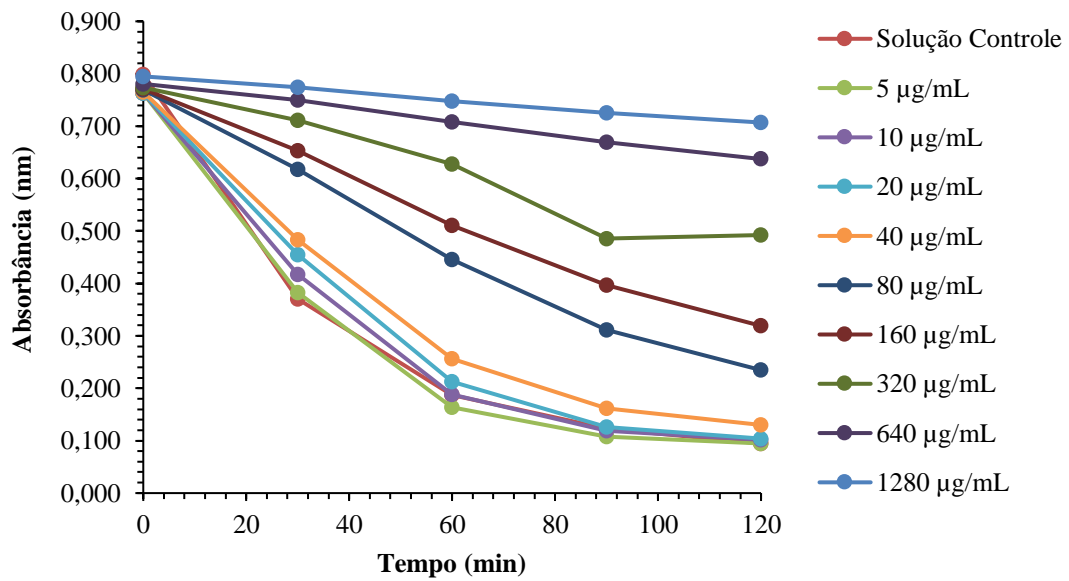


Figura 27 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase diclorometânica dos galhos de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

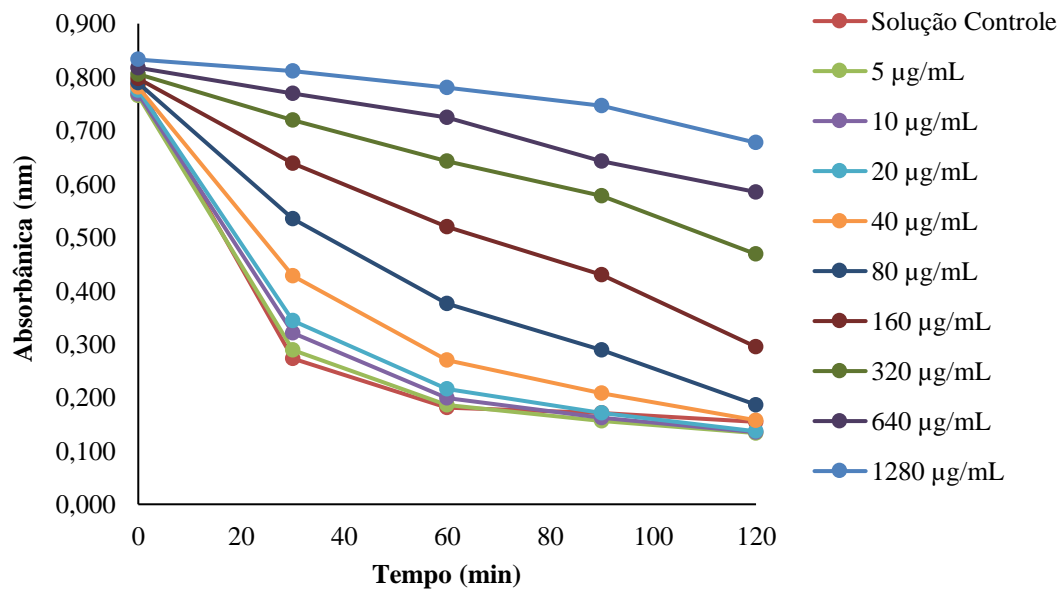


Figura 28 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hexânica dos galhos de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

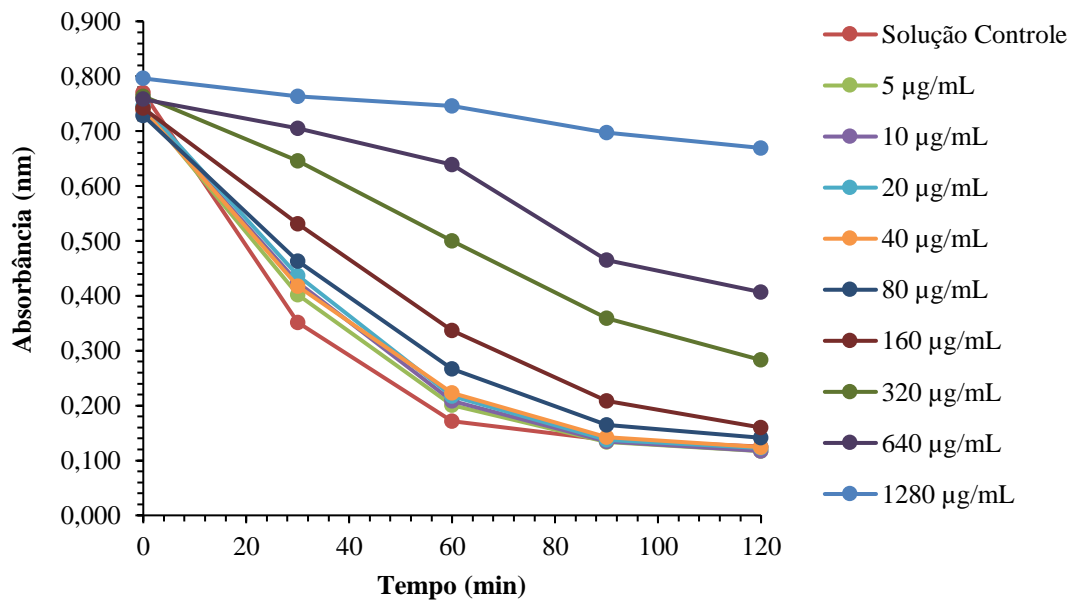
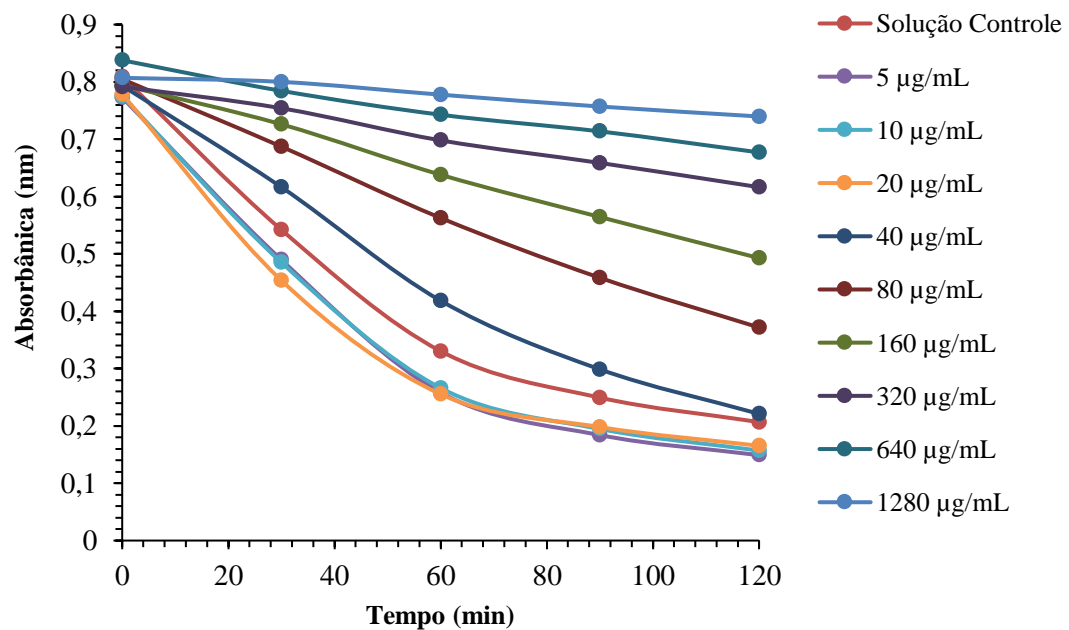


Figura 29 - Curvas do decréscimo da absorbância obtidas para a fase hidroalcoólica dos galhos de *Aniba canelilla* submetido ao teste de atividade antioxidante (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).



Na Tabela 5 observam-se os valores percentuais da atividade antioxidante para cada extrato e partição, obtidos de folhas e galhos no período da seca. Os resultados foram expressos em percentual de proteção da oxidação (%P) do ácido linoleico e em valores de  $CP_{50}$ , correspondente à concentração que oferece 50% de proteção da oxidação.



Nos extratos das folhas, a fase hidroalcoólica é a partição que se destaca com um percentual de proteção de 85,58%. Nos extratos de galhos, o mesmo é observado, tendo em vista que o percentual de proteção da fase hidroalcoólica é de 88,58%. Os óleos essenciais não apresentaram atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, confirmando os resultados observados utilizando o método de sequestro do radical DPPH.

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade antioxidante através da análise espectrofotométrica da descoloração ou oxidação do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (MATTOS *et al.*, 2009). Comparando os valores de  $CE_{50}$  (Tabela 4) com os valores de  $CP_{50}$  (Tabela 5), verifica-se que os resultados são similares, ou seja, os extratos e partições que se mostraram aptos a sequestrar o radical DPPH também se apresentaram eficazes na proteção da oxidação lipídica, indicando que os metabólitos de *A. canelilla* presentes nas fases hidroetanólicas e nos extratos etanólicos brutos são eficazes também como antioxidantes de produtos com alto teor de lipídios, característica que pode ser útil para a indústria de alimentos.

A  $CP_{50}$  encontrada para o padrão quercetina foi de 116,94  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Portanto, verifica-se que a fase hidroetanólica de folhas ( $CP_{50} = 317,44 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi apenas 2,71 vezes menos eficiente que o padrão, e que a fase hidroetanólica de galhos ( $CP_{50} = 228,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi 1,95 vezes menos eficiente que a quercetina na proteção lipídica.

O ácido ascórbico é amplamente conhecido por sua atividade antioxidante e por isso é utilizado em cosméticos ou em tratamentos de doenças degenerativas (IRACHE *et al.*, 1993). O ácido ascórbico no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico apresentou atividade pró-oxidante (porcentagem de inibição negativa), como pode ser visto na Duarte-Almeida *et al.* (2006) e Hassimoto *et al.* (2005) verificaram esse mesmo comportamento e afirmam que a atividade pró-oxidante ocorre porque o ácido ascórbico, após doar os dois hidrogênios redutores, fica passível de receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é um agente oxidante. Já na reação com o radical DPPH o radical ascorbila não interfere na reação e, portanto, verifica-se a atividade antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006)

Tabela 5 - Resultados da atividade antioxidante para os extratos e partições obtidos de folhas e galhos de *Aniba canelilla* no período da seca expressos em porcentagem de proteção do ácido linoléico (%P).

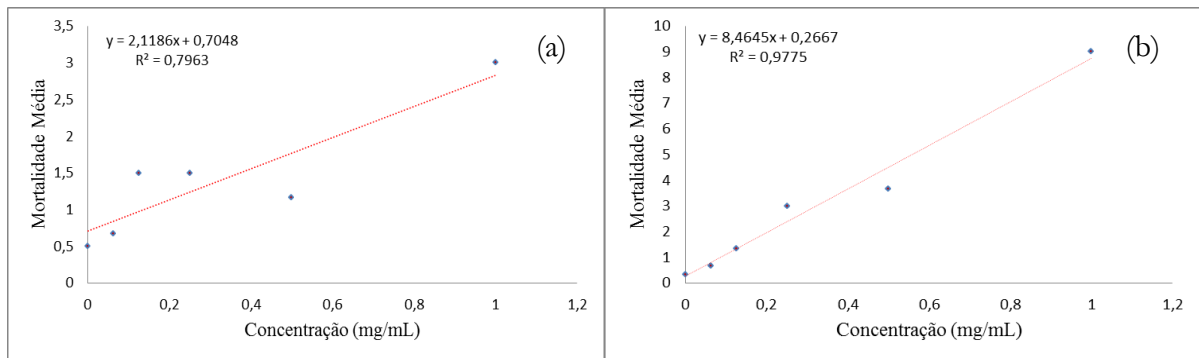
% Proteção $\pm$ desvio padrão								
[ ] $\mu\text{g/mL}$	EBF		FHF		FDCMF		FHAF	
5	9,46	$\pm$ 0,73	4,70	$\pm$ 7,43	-3,27	$\pm$ 5,29	2,17	$\pm$ 4,33
10	6,82	$\pm$ 1,57	2,59	$\pm$ 2,96	2,70	$\pm$ 8,54	2,83	$\pm$ 3,68
20	4,32	$\pm$ 0,81	3,13	$\pm$ 2,74	2,24	$\pm$ 2,64	5,97	$\pm$ 5,17
40	4,31	$\pm$ 1,05	4,43	$\pm$ 2,77	-0,22	$\pm$ 4,18	9,55	$\pm$ 4,59
80	8,40	$\pm$ 0,05	2,15	$\pm$ 2,13	2,19	$\pm$ 2,51	27,63	$\pm$ 4,65
160	25,80	$\pm$ 1,73	10,55	$\pm$ 4,26	3,39	$\pm$ 6,29	36,93	$\pm$ 6,46
320	57,79	$\pm$ 0,87	13,28	$\pm$ 3,53	6,38	$\pm$ 5,70	55,56	$\pm$ 7,84
640	76,13	$\pm$ 1,12	31,51	$\pm$ 4,84	19,20	$\pm$ 2,04	74,21	$\pm$ 1,89
1280	77,81	$\pm$ 3,78	56,89	$\pm$ 1,91	80,48	$\pm$ 4,21	85,58	$\pm$ 4,14
CP <sub>50</sub>	367,89 $\mu\text{g/mL}$		1111,73 $\mu\text{g/mL}$		919,68 $\mu\text{g/mL}$		317,44 $\mu\text{g/mL}$	
[ ] $\mu\text{g/mL}$	EBG		FHG		FDCMG		FHAG	
5	4,99	$\pm$ 4,76	2,98	$\pm$ 3,00	-0,35	$\pm$ 4,76	-4,18	$\pm$ 10,26
10	5,93	$\pm$ 4,94	3,70	$\pm$ 2,81	-0,66	$\pm$ 4,65	-3,34	$\pm$ 11,87
20	6,23	$\pm$ 5,80	3,30	$\pm$ 0,75	-1,48	$\pm$ 3,71	-2,36	$\pm$ 8,66
40	9,65	$\pm$ 4,24	4,69	$\pm$ 2,82	0,88	$\pm$ 4,53	4,19	$\pm$ 13,28
80	23,87	$\pm$ 6,32	8,93	$\pm$ 3,41	4,26	$\pm$ 4,70	27,86	$\pm$ 15,31
160	35,73	$\pm$ 2,81	9,77	$\pm$ 1,31	20,23	$\pm$ 1,24	48,77	$\pm$ 18,79
320	59,92	$\pm$ 5,04	25,39	$\pm$ 6,27	46,45	$\pm$ 1,92	70,82	$\pm$ 1,27
640	79,54	$\pm$ 3,00	45,44	$\pm$ 16,21	62,94	$\pm$ 4,60	73,49	$\pm$ 7,52
1280	87,42	$\pm$ 2,45	80,33	$\pm$ 4,94	75,29	$\pm$ 1,19	88,58	$\pm$ 4,56
CP <sub>50</sub>	302,34 $\mu\text{g/mL}$		759,44 $\mu\text{g/mL}$		571,78 $\mu\text{g/mL}$		228,25 $\mu\text{g/mL}$	

EBF-Extrato etanólico bruto das folhas; EBG-Extrato etanólico bruto dos galhos; FHF-Fase hexânica das folhas; FHG-Fase hexânica dos galhos; FDCMF-Fase diclorometânica das folhas; FDCMG-Fase diclorometânica dos galhos; FHAF-Fase hidroalcoólica das folhas; FHAG-Fase hidroalcoólica dos galhos; CP<sub>50</sub>- concentração da amostra com capacidade de proteção de 50% da oxidação do ácido linoléico.

### 3.3.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FASES ATIVAS

Por apresentarem a maior atividade antioxidante, as soluções das fases hidroalcoólicas de folhas e galhos de *A. canelilla* coletadas na seca foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade, conforme mostra a Figura 30. O valor de CL<sub>50</sub> obtido para a fase hidroalcoólica das folhas foi de 3,207 mg/mL e de 0,855 mg/mL para a fase dos galhos. Os dados mostram que os galhos de *A. canelilla* produzem substâncias mais ativas quanto à citotoxicidade do que a folhas.

Figura 30 - Gráfico de mortalidade das larvas de *Artemia salina* expostas aos extratos da fase hidroalcoólica de folhas (a) e de galhos (b) de *Aniba canelilla*.



Souza *et al.* (2007) analisaram o hidrolato de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) contra *A. salina*, utilizando as concentrações de 12,5%, 25% e 50%, e perceberam que na concentração a 12,5% ainda existiam larvas vivas, porém debilitadas, considerando o hidrolato ativo frente ao crustáceo. Estes autores, ao analisar óleos essenciais extraídos das cascas do tronco, bem como o 1-nitro-2-feniletano isolado de *A. canelilla*, observaram uma alta atividade citotóxica frente à *A. salina*, com  $CL_{50}$  igual a  $21,61 \pm 1,21$  e  $20,37 \pm 0,99$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Por outro lado, os autores verificaram que os extratos metanólicos da madeira apresentaram  $CL_{50}$  igual a  $91,38 \pm 7,20$   $\mu\text{g/mL}$ , mostrando uma citotoxicidade quatro vezes menor, demonstrando a grande correlação entre o composto majoritário 1-nitro-2-feniletano encontrado no óleo essencial com a bioatividade (citotoxicidade).

No presente estudo, a fase hidroalcoólica das folhas apresentou  $CL_{50}$  maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$  sendo considerada não tóxica. A fase hidroalcoólica dos galhos, por outro lado, por apresentar a  $CL_{50}$  abaixo de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , foi considerada ativa.

Estudos comparativos efetuados pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) apontam que, em geral, a alta toxicidade (ou seja, baixa  $CL_{50}$ ) de substâncias frente às larvas de *Artemia* pode ser correlacionada à alta inibição (ou baixa concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) *in vitro* de linhagens de células provenientes de tumores sólidos. Tendo em vista esses resultados, pode-se afirmar que a fase hidroalcoólica dos galhos de *A. canelilla* (H.B.K) Mez possui substâncias potencialmente citotóxicas e antitumorais (ANDERSON *et al.*, 1991). Por outro lado, uma baixa toxicidade pode ser uma boa característica para utilização de extratos vegetais em ambientes naturais, por exemplo, para o controle da população de caramujos (NUNES *et al.*, 2008).

### 3.3.5 ANÁLISE QUALITATIVA DOS METABÓLITOS PRESENTES NAS FASES HIDROALCOÓLICAS DE FOLHAS E GALHOS DE *Aniba canelilla*

A análise fitoquímica preliminar das fases hidroalcoólicas obtidas dos extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. canelilla* coletados na seca, revelou a presença de fenóis, taninos e flavonoides, corroborando os resultados de atividade antioxidante encontrados.

O teste realizado para fenóis e taninos forneceu uma coloração escura e azulada, decorrente da formação de complexos coloridos com o íon  $Fe^{+3}$ , indicando a presença de taninos hidrolisáveis em todos os extratos e partições. Os taninos são compostos polifenólicos solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Plantas que apresentam em sua composição química certas quantidades de taninos tendem a ser utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, problemas no estômago e inflamações (SANTOS e MELLO, 1999). São utilizadas também como antioxidantes em sucos e refrigerantes pela indústria alimentícia por possuírem ação sequestradora de radicais livres (SANTOS e MELLO, 2004) e ação protetora contra danos ao DNA (BARNEJEE *et al.*, 2005).

No teste para determinação da presença de flavonoides, as fases hidroalcoólicas apresentaram uma coloração vermelha parda ao reagirem com magnésio em meio ácido, indicando a presença de moléculas que contêm o núcleo benzopirona na sua estrutura química (MARTINEZ 2005). Para o teste em que se utilizou NaOH, as amostras apresentaram uma coloração vermelha alaranjada, indicativo da presença de flavonóis. Para o extrato proveniente das folhas observou-se uma coloração amarelada, indicativo da presença de flavonas, flavonóis e xantonas. Os flavonoides são substâncias com núcleo fenólico que possuem alto poder de captação de espécies reativas de oxigênio (EROs) agindo como importantes agentes antioxidantes, capazes de inibir e retardar a oxidação de lipídios e alguns danos causados às células (CHANWITHEESUK *et al.*, 2005). Além disso, esses metabólitos secundários fornecem às plantas ação anti-inflamatória, antialérgica, anti-hemorragica, antimutagênica e antiespasmódica (WOLLENWEBER *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2001; ZUANAZZI e MONTANHA, 2004; AMARAL *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

### 3.3.6 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FASE HIDROALCOÓLICA

Após a análise da atividade antioxidante, foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) para determinar os possíveis solventes que seriam utilizados na cromatografia em coluna aberta (CCA) para separação dos constituintes químicos da fase hidroalcoólica de folhas e galhos de *A. canelilla* coletados na seca (amostras que apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante). Os sistemas de eluição escolhidos dispersavam as substâncias na placa com valores de  $R_f$  entre 0,3 e 0,7 para melhor separação das biomoléculas.

Após ser realizada a CCA em coluna de sílica gel 60, obtiveram-se 114 frações para as folhas e 72 para os galhos. As frações foram analisadas novamente por cromatografia em camada delgada (CCD) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o intuito de unir as frações semelhantes. A partir da semelhança química observada para as amostras, as frações foram unidas, resultando em 15 amostras provenientes de folhas e quatro de galhos. Após todas as frações terem sido reunidas, realizou-se novamente a análise de atividade antioxidante para determinar quais frações ou grupos de frações apresentavam os maiores valores. Os valores estão dispostos na Tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) obtida para as frações reunidas, após separação por cromatografia em coluna aberta da fase hidroalcoólica das folhas de *Aniba canelilla*.

Amostra	Fração	AA%	Massa (g)	Rendimento (%)
F1	1 - 42	9,730 ± 1,582	0,3307	15,60
F2	43 - 45	0,660 ± 0,990	0,008	0,38
F3	46 - 50	2,160 ± 0,530	0,0019	0,09
F4	51 - 65	0,150 ± 0,367	0,0061	0,29
F5	66 - 67	92,60 ± 0,367	0,0389	1,83
F6	68 - 74	93,17 ± 0,220	0,2472	11,66
F7	75	83,49 ± 0,767	0,2472	11,66
F8	76 - 81	84,52 ± 1,498	0,0941	4,44
F9	82 - 83	88,72 ± 0,300	0,0107	0,50
F10	84 - 88	92,66 ± 0,145	0,0981	4,63
F11	89 - 92	69,86 ± 13,55	0,3217	15,17
F12	93 - 99	6,760 ± 1,515	0,4307	20,31
F13	106	15,53 ± 7,150	0,011	0,52
F14	113	2,620 ± 1,094	0,0029	0,14
F15	114	4,340 ± 1,094	0,0031	0,15

AA%= percentagem de inibição do DPPH.

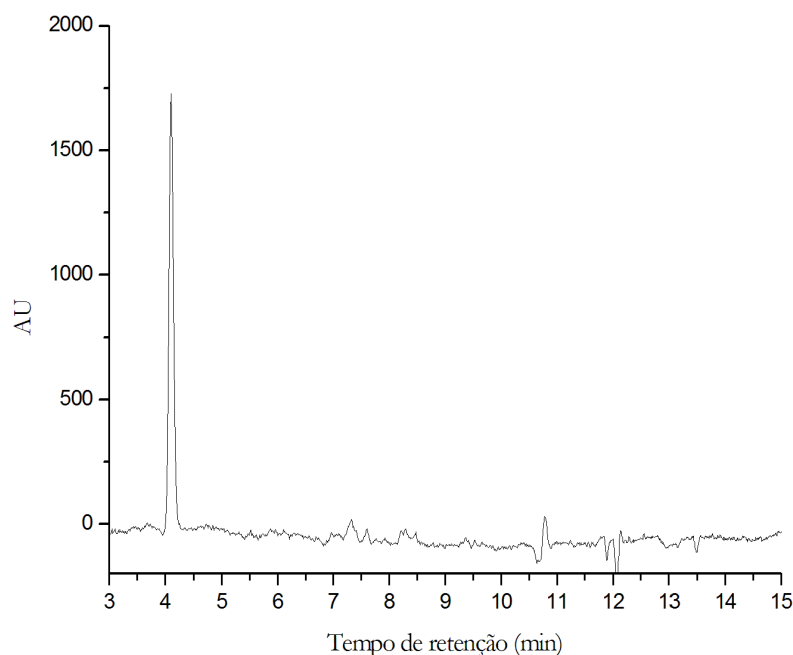
É possível observar que as frações F10 de folhas e G2 de galhos se mostraram as mais promissoras, pois apresentam as maiores porcentagens de inibição do radical livre DPPH, sendo de 92,66% e 94,13%, respectivamente. Na Figura 31 está apresentado o cromatograma obtido por CLAE para a fração F10, obtida das folhas de *A. canelilla*.

Tabela 7 – Atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) obtida para frações reunidas, após separação por Cromatografia em Coluna Aberta da fase hidroalcoólica dos galhos de *Aniba canelilla*.

Amostra	Fração	AA%	Massa (g)	Rendimento (%)
G1	1 - 30	0,510 ± 1,30	0,0245	2,26
G2	31 - 51	94,13 ± 0,13	0,8203	75,83
G3	52 - 57	74,63 ± 3,13	0,0789	7,29
G4	58 - 72	25,76 ± 3.11	0,1581	14,61

AA%= percentagem de inibição do DPPH.

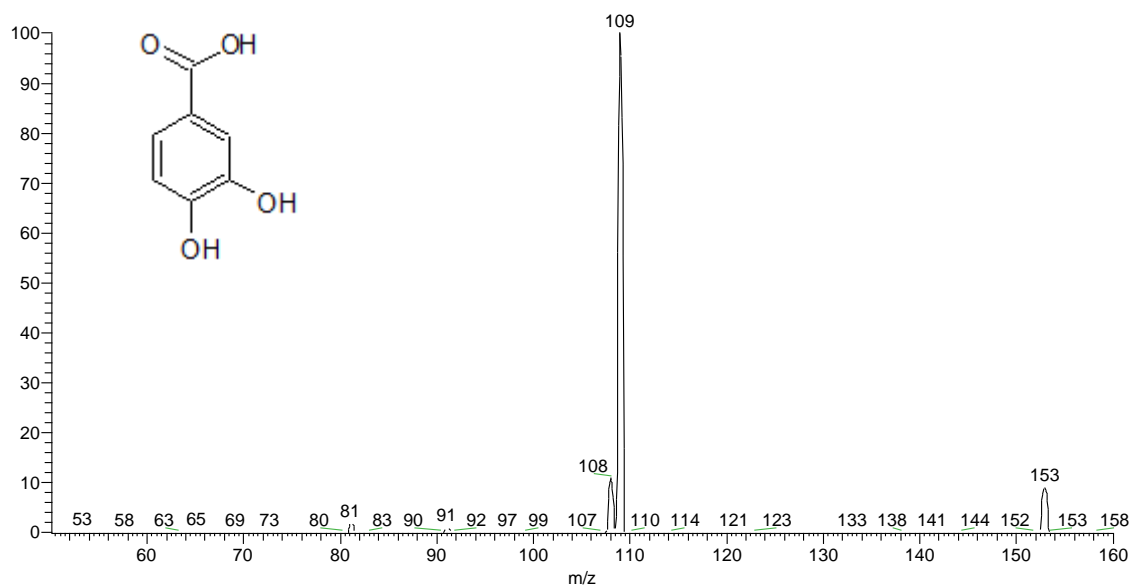
Figura 31 - Cromatograma da fração F10 obtida da fase hidroalcoólica de folhas de *Aniba canelilla*.



### 3.3.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS MOLÉCULAS BIOATIVAS

Por apresentar os mais altos valores de atividade antioxidante (Tabelas 4 e 5), as **frações** F10 e G2 foram analisadas por espectrometria de massas para caracterização química das moléculas bioativas. No espectro de íons totais da fração F10 (Figura 32), observam-se dois grandes picos, o íon molecular 153 m/z, característico do ácido protocatecuico desprotonado  $[(M-H)^-]$  e o 109 m/z,  $[(M-44)^-]$  característica fragmento carboxilato ( $COO^-$ ). Dessa forma, pode-se inferir que a atividade antioxidante da fração F10 deve-se ao ácido protocatecuico (composto majoritário). Entretanto, as demais moléculas presentes na fração F10, observadas na análise de CLAE (Figura 31), também podem ser responsáveis pelo alto valor da atividade antioxidante (92,66% de inibição do radical DPPH).

Figura 32 - Espectro de íons totais em modo negativo do ácido protocatecuico obtido por espectrometria de massa da fração F10 obtido de folhas de *Aniba canelilla*.



Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e os derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico, e possuem sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ), enquanto os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, cinâmico e sináptico fazem parte dos ácidos hidroxicinâmicos, compostos aromáticos com nove átomos de carbono ( $C_6-C_3$ ) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; SOARES, 2002).

O ácido protocatecuico é um ácido fenólico conhecido, e pode ser formado pela degradação da fenilalanina e pela hidroxilação do ácido parahidroxi-benzóico. A hidroxilação direta do ácido protocatecuico para formar o ácido gálico, embora rara, também é conhecida (LIANDA, 2009).

A atividade antioxidante do ácido protocatecuico já foi descrita. Moura *et al.* (2011) avaliaram a atividade antioxidante de constituintes de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae), entre eles o ácido protocatecuico, que apresentou  $CE_{50}$  de 192,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente ao radical DPPH. Em outro estudo, Sroka e Cisowski (2003) demonstraram que a atividade antioxidante e anti-radical dos ácidos fenólicos está correlacionada positivamente com o número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático, e observaram maior atividade antioxidante e anti-radical para o ácido gálico (três grupos hidroxila ligados ao anel aromático), seguido pelo ácido protocatecuico (dois grupos hidroxila ligados ao anel aromático). Lianda (2009) verificou que o extrato de mel de laranja apresentou excelente resultado para a atividade antioxidante (9,74  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e que este extrato continha seu perfil cromatográfico ácido protocatecuico como constituinte majoritário. Bonilla *et al.* (1999) também observaram alta atividade antioxidante do ácido protocatecuico no ensaio do tempo de

indução da oxidação em óleo de oliva. Portanto, pode-se inferir que o alto valor de atividade antioxidante encontrado nas frações obtidas de folhas de *A. canelilla* seja devido à presença desta substância.

No espectro de íons totais da fração G2 (Figura 33), observa-se o íon molecular 284 m/z, característico da luteolina desprotonada  $[(M-H)^-]$  seguido de uma importante reação de fragmentação chamada Retro-Diels-Alder (RDA). Segundo Coutinho (2014) este tipo de fragmentação ocorre em anel de seis membros contendo uma ligação dupla e envolve a relocação de três pares de elétrons no anel, de acordo com o mecanismo da Figura 34. Dessa forma, pode-se inferir que a atividade antioxidante da fração G2 deve-se à luteonina (composto majoritário). Entretanto, as demais moléculas presentes na fração G2, observadas na análise de CLAE (Figura 34), também podem ser responsáveis pelo alto valor da atividade antioxidante (94,13% de inibição do radical DPPH).

Figura 33 - Espectro de íons totais em modo negativo da luteolina obtida por espectrometria de massa da amostra G2 obtido de galhos de *Aniba canelilla*.

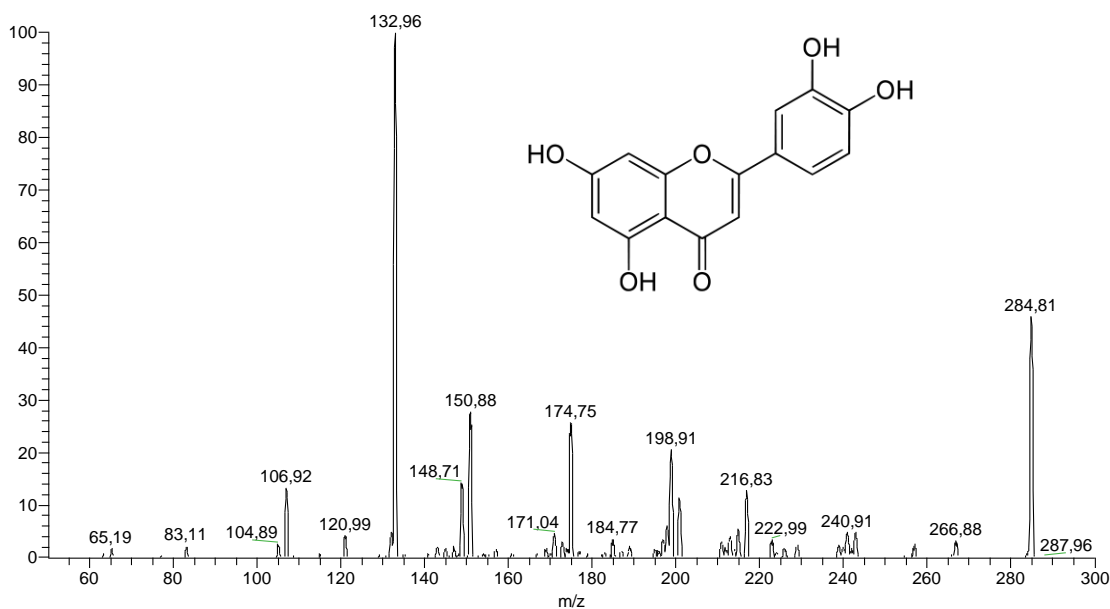
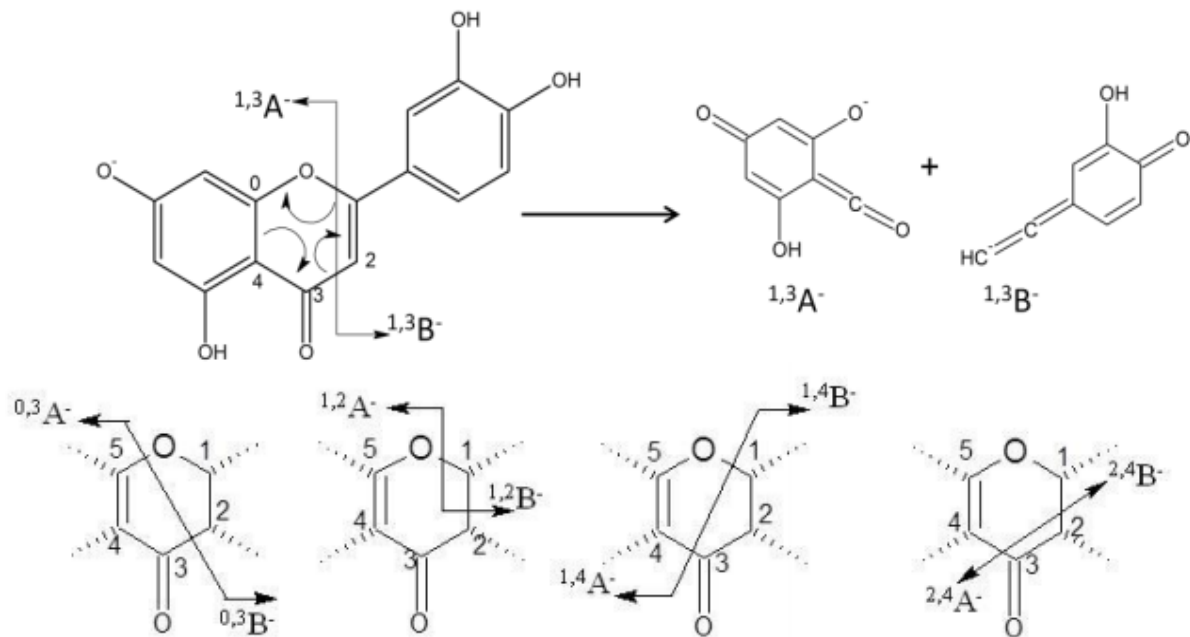




Figura 34 - Mecanismo de reação para a formação dos íons fragmentos  $^{1,3}A^-$  e  $^{1,3}B^-$  para luteolina e via de fragmentação para flavonoides pelo rompimento de ligação no anel.



Fonte: COUTINHO, 2014.

Os flavonoides pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas de origem natural e apresentam uma série de propriedades farmacológicas que lhes permite atuar em sistemas biológicos e assim favorecer a saúde humana. Mais de 8000 diferentes flavonoides já foram descritos, sendo as suas principais classes: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas. A luteolina é uma flavona, antigamente usada em tinturaria têxtil como corante amarelo, presente em especiarias, cereais e frutos (FLAMBÓ, 2009).

A atividade antioxidante da luteolina está descrita na literatura. Silva *et al.* (2007) realizaram o fracionamento do extrato metanólico de *Leiothrix flavescens* que apresentou atividade antioxidante frente ao radical DPPH e identificaram as substâncias isoladas, entre elas a luteolina. Re *et al.* (1999), ao estudarem os efeitos antioxidantes de vários flavonóides, verificaram que a atividade antioxidante decresce no sentido quercetina > luteolina > canferol, evidenciando que o grupo catecólico no anel B tem maior influência na atividade do que a hidroxila na posição 3. Além disso, o maior número de hidroxilas fenólicas confere maior hidrofilicidade à xantona 3, o que também é considerado um fator de extrema importância para a atividade antioxidante (VAN DEN BERG *et al.*, 2000).

### 3.3.8 FORMULAÇÃO COSMÉTICA

As emulsões cosméticas formuladas apresentaram aparente compatibilidade química com os extratos de *A. canelilla*. As características obtidas foram consideradas desejáveis, tais como, emulsões homogêneas e brilhantes, com aspecto fino e macio ao toque. Após o estresse térmico e ciclo gela-degela, que visa acelerar interações físico-químicas entre as matérias-primas num reduzido espaço de tempo (RIEGER, 1996), a homogeneidade foi perdida e o produto adquiriu um aspecto heterogêneo, opaco e fibroso, tidos como defeitos sérios (ISAAC *et al.*, 2008).

As amostras submetidas à centrifugação apresentaram aspecto normal e sem alteração, quando comparadas às análises macroscópicas realizadas no tempo zero (24 h após a formulação). O procedimento de centrifugação é eficaz na determinação da instabilidade dos produtos emulsificados, já que a simulação de aumento da força de gravidade pode promover separação de componentes de diferentes densidades, como nas fases óleo e água. Velocidades de rotação moderadas entre 2000 e 5000 rpm, durante curto período, são muito úteis para verificar o comportamento das gotículas emulsionadas frente à força da gravidade (RIEGER, 1996).

As emulsões caracterizadas como macroscopicamente estáveis após 24 h da formulação, foram submetidas ao estudo preliminar de estabilidade, por um período de 15 dias (ANVISA, 2004). As amostras foram submetidas ao ciclo gela-degela e estresse térmico. Os resultados das análises de densidade, pH e condutividade encontram-se na Tabela 8.

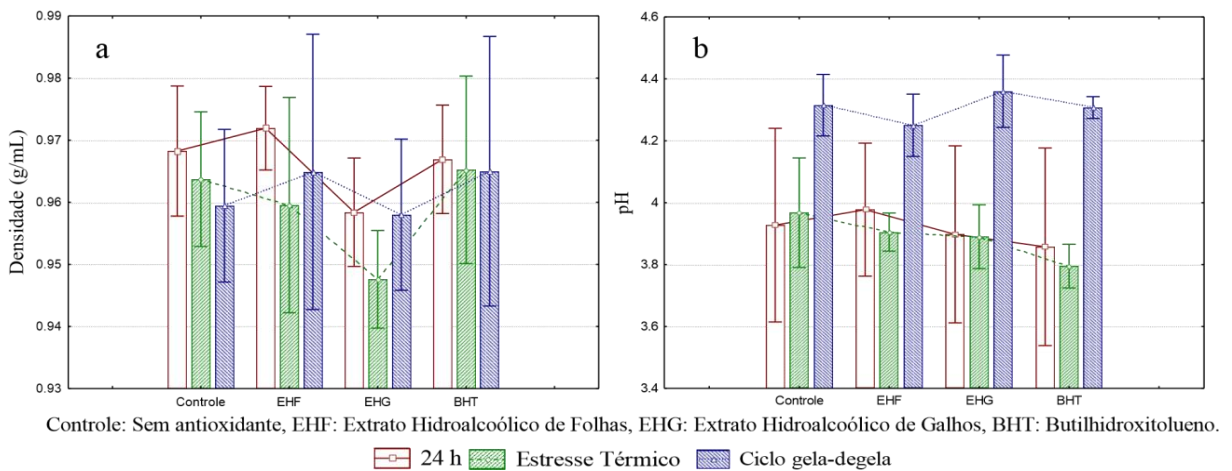
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos analisados 24 horas após o preparo das formulações das emulsões, após o estresse térmico e ciclo gela-degela.

Amostra	24 h			Estresse Térmico			Ciclo Gela-degela		
	Dens	pH	Cond	Dens	pH	Cond	Dens	pH	Cond
Controle	0,970	4,22	1,99	0,968	4,13	1,85	0,966	4,40	2,03
	0,976	3,86	1,88	0,970	3,88	1,86	0,957	4,30	2,24
EHG	0,977	4,17	2,19	0,957	3,94	2,12	0,976	4,33	2,27
	0,971	3,90	2,09	0,974	3,85	2,21	0,959	4,21	2,30
EHF	0,965	4,02	2,06	0,947	3,95	2,05	0,966	4,33	2,27
	0,960	3,88	1,55	0,954	3,92	1,67	0,956	4,42	1,53
BHT	0,966	4,00	1,81	0,972	3,81	1,76	0,957	4,29	2,17
	0,974	3,63	1,78	0,975	3,83	1,48	0,980	4,30	1,83

Dens = densidade (g/mL); Cond = condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ); EHG = formulação contendo fase hidroalcoólica dos galhos; EHF = formulação contendo fase hidroalcoólica das folhas; BHT = formulando contendo butilhidroxitolueno.

As densidades das formulações não apresentaram diferenças significativas entre os lotes avaliados. Os valores medidos durante os ensaios de estabilidade preliminar também não diferem entre si nos produtos elaborados (Figura 35).

Figura 35 - Gráfico das análises de: a - densidade (g/mL) sem diferença estatística entre os grupos e b - análises de pH apresentando diferença estatística entre as formulações.



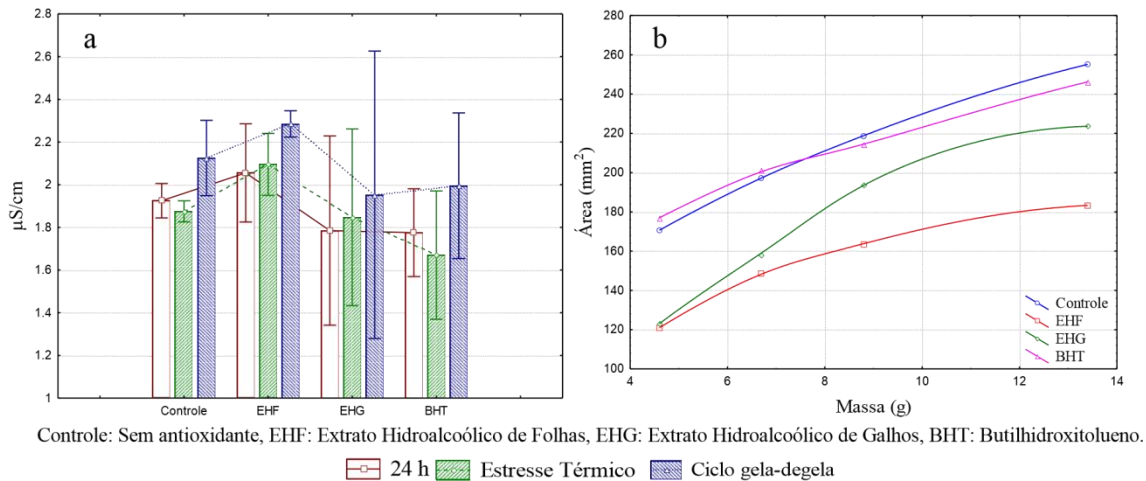
O pH de uma formulação deve garantir a estabilidade dos ingredientes da formulação, sua eficácia e segurança (ANVISA, 2004), bem como ser compatível com os fluidos biológicos de acordo com a via de administração pretendida. A maior estabilidade dos sistemas dá-se quando estes são mantidos dentro de uma pequena variação de pH. Desta forma, a diminuição progressiva da estabilidade dá-se quando o pH se afasta de seu limite ótimo (GENNARO, 2000).

Apesar do valor do pH não ser uma medida tão sensível quando comparado à condutividade elétrica, alterações deste durante o período de estocagem nas diferentes temperaturas podem indicar um processo de instabilidade. Segundo Masmoudi *et al.* (2005), a diminuição do pH pode representar uma oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos, ou mesmo a hidrólise de triglicérides levando à formação de ácidos graxos.

A condutividade elétrica apresentou valores constantes durante os ensaios de estabilidade preliminar, não havendo diferença estatística entre os valores observados conforme a Figura 36a. A medição da condutividade elétrica é considerada como uma ferramenta útil para a avaliação da estabilidade da emulsão imediatamente após a sua preparação e depende também do grau de dispersão. As preparações O/A com partículas pequenas apresentam resistência reduzida, um aumento da resistência revela agregação de gotículas de óleo e conseqüentemente revela instabilidade. Uma emulsão fina de água num produto A/O não conduz a corrente até que se verifique coalescência das gotículas, isto é, quando se torna instável (LACHMAN, 2001).

Avaliando a espalhabilidade das emulsões formuladas, notou-se que as manipulações Controle e BHT apresentaram valores maiores que as obtidas com os extratos vegetais, EHF e EHG, como mostra a Figura 36b.

Figura 36 - Gráfico das análises de: a - condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) sem diferença estatística entre as formulações e os grupos e b - espalhabilidade apresentando diferença estatística entre os grupos.



Os dados referentes à espalhabilidade são importantes, pois se a emulsão produzida tiver melhores características reológicas, ela poderá melhorar a percepção sensorial no momento de sua aplicação sobre a pele e utilizar menor quantidade, levando a uma redução do consumo dessa preparação.

Estudos de Borella, *et al.* (2010) demonstraram que preparações obtidas sem aquecimento têm melhores características de espalhabilidade que aquelas obtidas com aumento da temperatura. Patil e Ravindra (2009) concluíram que o aquecimento utilizado na preparação da forma farmacêutica contendo óleo de alho afetava diretamente a atividade da droga. Sendo assim, a elaboração de emulsões cosméticas utilizando extratos hidroalcoólicos de *A. canelilla* podem ser estudadas preparando-as a frio, a fim de melhorar a espalhabilidade e ainda preservar os extratos ativos no fitocosmético.

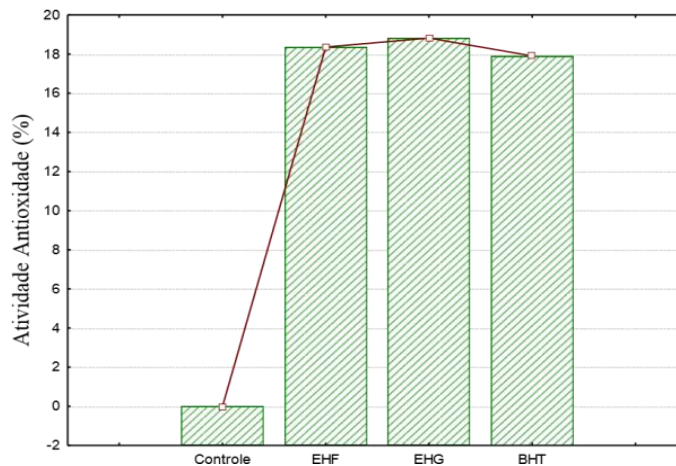
### 3.3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FORMULAÇÕES

As atividades antioxidantes das formulações apresentaram-se iguais estatisticamente nas emulsões elaboradas com os extratos da planta e o BHT e diferentes da emulsão elaborada sem o antioxidante como observado na Figura 36.

Os dados obtidos demonstram que os extratos hidroalcoólicos de *A. canelilla* mostraram-se eficientes como componentes antioxidantes na formulação, pois apresentaram valores iguais

estatisticamente aos obtidos com o BHT, amplamente utilizado em cosméticos (Figura 37). Estes valores demonstram ainda que não houve incompatibilidade química entre os componentes da formulação mantendo a atividade antioxidante.

Figura 37 - Gráfico das análises de atividade antioxidante das formulações elaboradas com extratos hidroalcoólicos de folhas e galhos de *Aniba canelilla*. Controle: Sem antioxidante e BHT: Butilhidroxitolueno com EHF: Extrato Hidroalcoólico de Folhas e EHG: Extrato Hidroalcoólico de Galhos.



Controle: Sem antioxidante e BHT: Butilhidroxitolueno com EHF: Extrato Hidroalcoólico de Folhas e EHG: Extrato Hidroalcoólico de Galhos.

### 3.4 CONCLUSÃO

O extrato de *A. canelilla* apresenta biomoléculas capazes de inibir os processos de oxidação, através do sequestro de radicais livres. As fases hidroalcoólicas obtidas de folhas e galhos foram as que apresentaram as maiores atividades antioxidantes, pelos diferentes métodos utilizados. A fase hidroalcoólica dos galhos apresentou citotoxicidade frente à *Artemia salina*, que deve passar por maior investigação quanto as substâncias ativas. As substâncias encontradas na fase hidroalcoólica de folhas, o ácido protocatecuico, e nos galhos, a luteolina, possuem alta atividade antioxidante. Por fim, a fase hidroalcoólica de folhas de *A. canelilla* apresentou compatibilidade química com os componentes da formulação cosmética, podendo substituir o BHT, normalmente usado em cosméticos, incorporando produtos naturais na formulação.

## Capítulo 4

---

**Avaliação do fator de proteção solar de extratos e óleos essenciais de *Aniba canelilla*, estudo químico e incorporação em formulação cosmética**

## **AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *ANIBA CANELILLA*, ESTUDO QUÍMICO E INCORPORAÇÃO EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

A luz do Sol é uma fonte de energia que permite a ocorrência de diversas reações metabólicas, as quais favorecem a produção de água, oxigênio e de biomoléculas necessárias para a existência da vida. No corpo humano, a luz do Sol estimula a produção da vitamina D na pele (ARAÚJO *et al.*, 2008). Em trabalho recente, Radice *et al.* (2016) relatam outros efeitos benéficos da energia solar sobre o corpo humano, tais como, aumento da produção de melanina, melhora da psoríase, do vitiligo e, ainda, melhora de humor por meio da liberação de endorfinas no organismo.

As radiações ultravioletas presentes na superfície terrestre causam também alguns efeitos indesejáveis como o surgimento de cânceres cutâneos na pele humana, alterações químicas e histológicas na epiderme, causando danos ao DNA (ARAÚJO *et al.*, 2008). Por isso, o uso de fotoprotetores tem aumentado continuamente nos últimos anos, pois reduzem a quantidade de radiação absorvida pela pele, servindo como uma barreira fotoprotetora (CEFALI *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, verifica-se um aumento na atenção dos consumidores sobre questões de saúde, e ao mesmo tempo, um crescimento no interesse de cosméticos a base de produtos naturais, de origem vegetal (CEFALI *et al.*, 2016). Muitos extratos e óleos essenciais de plantas têm sido empregados em formulações cosméticas como loções e cremes fotoprotetores, pois exibem moléculas ou complexos moleculares, geralmente compostos fenólicos, que são substâncias semelhantes aos filtros sintéticos (VIOLANTE *et al.*, 2009), capazes de absorver e refletir a radiação ultravioleta e neutralizar os radicais livres, intensificando assim o efeito protetor das emulsões (DEUSCHLE *et al.*, 2015). Normalmente, moléculas orgânicas usadas como protetores solares são compostos aromáticos conjugados com grupos carbonila. Estas moléculas podem absorver radiações ultravioletas defendendo a pele dos efeitos e de danos causados pela radiação UV (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013).

A classe dos flavonóides é a mais estudada quando se fala de fotoprotetores, pois são uma classe de compostos polifenólicos sintetizados pelas plantas através da via metabólica de fenilpropanóides que tem grande interesse científico (DOMAS *et al.*, 2007). Os flavonoides não só têm potencial anticarcinogênico e antioxidante, mas também protegem os sistemas cardiovasculares, renais e hepáticos (AHLENSTIEL *et al.*, 2003; BEHLING *et al.*, 2004; HERTOOG *et al.*, 1992; SU *et al.*, 2003).

A presença de anéis aromáticos na estrutura molecular dos flavonoides confere-lhes a capacidade de absorver radiação UV entre 200 e 400 nm, o que os torna adequados para utilização como agentes de proteção solar. Conforme estudado por Bobin *et al.* (1994) e descrito por Orlanda *et al.* (2015), o espectro de absorção dos flavonóides quando dispersos em etanol e metanol mostra-se com dois picos, sendo um presente entre 240 a 280 nm e o outro nos comprimentos de 300 a 500 nm. Santana *et al.* (2001) relatam que plantas que contenham taninos como metabólitos secundários possuem um bom potencial de absorção da radiação UV, proporcionando proteção à radiação também ao vegetal.

O Brasil é detentor de grande biodiversidade e possui uma das mais ricas floras do mundo (GUERRA *et al.*, 2001). Entretanto, estudos existentes sobre moléculas oriundas de espécies amazônicas com atividade fotoprotetora são poucos, o que evidencia a necessidade de maior desenvolvimento de pesquisas nesta área. A biodiversidade amazônica pode ser explorada como opção de investimento, principalmente pela indústria de cosméticos e de medicamentos (SEBRAE, 2008). Uma forma de agregar valor a um produto natural é transformá-lo em um fitocosmético, definido como um cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, seja um extrato, óleo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto (ISAAC *et al.*, 2008).

A *Aniba canelilla* (casca preciosa) é uma planta amazônica que além de oferecer madeira de ótima qualidade, é utilizada para extração do óleo essencial de interesse, cujo componente majoritário é o 1-nitro-2-feniletano. Diversas atividades biológicas já foram descritas para os metabólitos dessa espécie, tais como, vasorrelaxante (INTERAMINENSE *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2013; ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014), cardiovascular (LAHLOU, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2010; INTERAMINENSE *et al.*, 2011), antinociceptiva (LIMA *et al.*, 2009), antioxidante (SILVA *et al.*, 2007; MARTINS, 2016), antimicrobiana (SILVA, 2012), citotóxica (SILVA *et al.*, 2007), citoprotetora (COSKER *et al.*, 2014), anti-inflamatória (VALE *et al.*, 2013), inibitória da acetilcolinesterase (SILVA *et al.*, 2014), hipnótica, anticonvulsiva, ansiolítica (OYEMITAN *et al.*, 2013) e anticorrosiva (DE BARROS, 2015). Propõe-se então, neste trabalho, avaliar a capacidade fotoprotetora dos extratos e do óleo essencial da espécie *A. canelilla*, determinar o perfil químico de seus metabólitos e elaborar uma emulsão O/A contendo a amostra que apresentar o maior FPS.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Folhas e galhos finos de *A. canelilla* foram coletados no período seco (setembro de 2014) na Reserva Florestal Adolpho Ducke (3° 05' S, 60° 00' W) em Manaus, Amazonas, no período



matutino. Os dados referentes aos índices pluviométricos foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia. Os mapas climáticos analisados indicaram que não houve quaisquer mudanças atípicas referentes ao clima da região no período da coleta do material vegetal (INMET, 2014). As plantas coletadas foram identificadas comparando-as com uma excicata depositada no Herbário do INPA pelo projeto “Potencial biotecnológico da produção sustentável de óleos essenciais e compostos com atividade antifúngica de espécies da família Lauraceae”, edital MCT/CNPq/FNDCT – Ação Transversal/CT-Amazonia/CT-Biotec/Bionorte nº 066/2009.

O material vegetal foi colhido de dez árvores, enviado ao laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da UEA para secagem por 10 dias à temperatura ambiente e à sombra. Folhas e galhos finos foram triturados separadamente em um moinho elétrico facas com tela de 3 mm e foram utilizados para a obtenção do óleo essencial e dos extratos etanólicos.

#### 4.2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

O material vegetal seco e triturado foi macerado a frio em álcool etílico 92,8° INPM à temperatura ambiente por 3 ciclos de 48 horas com filtração e renovação do solvente a cada ciclo, seguido de 20 min no ultrassom (SILVA, 2012; CURSINO, 2011). O filtrado foi submetido à evaporação sob pressão reduzida, a 40°C, em evaporador rotativo. Parte do extrato bruto resultante foi dissolvido em etanol-água (1:3) e submetido à partição líquido-líquido, utilizando *n*-hexano e diclorometano, restando ainda uma fração hidroetanólica que foi levada ao liofilizador (Christ – Alpha 1-2 LD plus) sob pressão de 0,04 mbar e temperatura de -45°C. Assim, o material obtido para análise consistiu em extrato etanólico (bruto), fase *n*-hexânica (partição), fase diclorometânica (partição) e fase hidroalcoólica (partição), de folhas e galhos de *A. canelilla*.

#### 4.2.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* foram obtidos por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger modificado, onde 100 g do material vegetal foram destilados com um litro de água destilada a 100°C durante 3,5 h para folhas e 6 h para galhos (CHAAR, 2000; FERRAZ, 2012). Posteriormente, os óleos foram levados à centrifugação para separar da água e secos por percolação em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, obtendo-se assim, os óleos essenciais de folhas e de galhos de *A. canelilla*.

#### 4.2.4 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

Os óleos essenciais, extratos e partições de *A. canelilla* foram analisados quanto ao FPS utilizando método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur *et al.* (1986). Esta metodologia

ganhou notoriedade entre os métodos *in vitro* em substituição ao uso de animais, como mostram os trabalhos de Ferrari *et al.* (2007) e Savian *et al.* (2010), e a revisão sistemática realizada por Radice *et al.* (2016), que mostra a evolução da técnica ao longo dos anos e como a técnica foi sendo adaptada aos diferentes objetivos.

As soluções dos óleos essenciais e extratos de *A. canelilla* foram preparadas em isopropanol e etanol, respectivamente, na concentração de 1% (m/m) para análise, seguidas de diluições sucessivas até a concentração de 0,1%. Em um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) realizou-se uma varredura entre os comprimentos de onda de 280 a 400 nm em cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, sendo a linha de base calibrada com seu respectivo solvente. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo do FPS *in vitro* utilizando a Equação 1, e também para a elaboração dos espectros de absorção. Além disso, determinou-se a razão UVA/UVB a fim de conhecer sua proteção em relação à radiação UVA, conforme descrito por Boots the Chemists (2004). Quercetina, benzofenona e um protetor comercial foram utilizados como padrões. Os parâmetros *in vivo* utilizados na Equação 6 foram determinados por Mansur *et al.* (1986) e estão apresentados na Tabela 9.

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (6)$$

Onde: FC é o fator de correção; EE( $\lambda$ ) é o efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda  $\lambda$ ; I( $\lambda$ ) é a intensidade do Sol no comprimento de onda  $\lambda$ ; e Abs( $\lambda$ ) é a absorvância da solução no comprimento de onda  $\lambda$ .

Tabela 9 - Parâmetros *in vivo* para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS).

$\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ ) valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
	1,0000

Fonte: MANSUR *et al.*, 1986.

A razão entre a curva UVA/UVB foi obtida de acordo com Boots the Chemist (BOOTS, 2004), conforme a Equação 7, e associada com a proteção frente à radiação UVA. Os resultados podem ser expressos com estrelas (Tabela 10), sendo que o maior número destas corresponde a uma maior proteção antiUVA estimada.

$$\frac{\text{UVA}}{\text{UVB}} = \frac{\int_{320\text{nm}}^{400\text{nm}} A\lambda, d\lambda}{\int_{290\text{nm}}^{320\text{nm}} A\lambda, d\lambda} \quad (7)$$

Tabela 10 - Classificação em estrelas segundo a razão UVA/UVB.

Proteção AntiUVA		
Razão UVA	Estrelas	Descrição
0,0 até < 0,2	*	Muito baixa
0,2 até < 0,4	**	Moderada
0,4 até < 0,6	***	Boa
0,6 até < 0,8	****	Superior
0,8 até < 0,9	*****	Máxima
>0,9	*****	Ultra

Fonte: DIFFEY, 1998.

Após a análise dos resultados de FPS, o extrato, partição e/ou óleo essencial ativos foram submetidos ao estudo químico, utilizando técnicas de separação cromatográfica e identificação espectrométrica.

#### 4.2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE *Aniba canelilla*

Para a prospecção fitoquímica preliminar dos óleos essenciais, extratos e partições de *A. canelilla*, foi utilizada a metodologia de Matos (2009) e da Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2016), com adaptações. Para cada procedimento foram preparadas soluções dos extratos e partições a 2 mg/mL em álcool etílico P. A. Os ensaios consistiram em testes qualitativos para verificar a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas, taninos e compostos fenólicos.

Alcaloides: em tubo de ensaio com 2,0 mL de amostra acrescentaram-se três gotas do reagente de Drangendorff para a observação da presença de precipitado (precipitado floculoso, em pelo menos dois tubos é indicativo de alcaloides).

Esteroides: foi realizada a reação de Liebermann-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), misturando 2,0 mL de amostra a 2,0 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada em um funil com algodão coberto com sulfato de sódio anidro em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentaram-se três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado observando-se o desenvolvimento de cores: coloração azul seguida de verde permanente indica presença de esteroides livres.

Falvonoides: foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg). Adicionou-se a 2,0 mL de amostra, aproximadamente 0,5 cm de Mg em fita e 2,0 mL de HCl concentrado. O fim da reação é determinado pelo término da efervescência e pode ser considerado positivo se houver o aparecimento da cor vermelha. Além disso, para confirmação dos resultados, foi realizado o teste de alcalinização das amostras, utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3,0 mL da amostra em um tubo de ensaio, até pH 11,0 observando-se a mudança de cor. O aparecimento de cor amarela indica a presença de flavonas, flavonóis e xantonas e a coloração vermelho laranja a de flavonóis.

Saponinas: para determinação da presença de saponinas nas amostras foram misturados 2,0 mL de clorofórmio junto a 2,0 mL de extrato e 5,0 mL de água destilada. Em seguida, foi separada a fração aquosa e depois agitada para observação de uma possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas.

Fenóis e Taninos: para determinação da presença de taninos nas amostras, em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL de extrato foram adicionadas três gotas de FeCl<sub>3</sub>. Após forte agitação foi observada a mudança de cor ou formação de precipitado abundante. Coloração entre azul e vermelho indica presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

#### 4.2.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As amostras que apresentaram atividade fotoprotetora foram analisadas por CCD utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 UV<sub>254</sub>, nas quais foram aplicadas alíquotas da partição biologicamente ativa das folhas e galhos de *A. canelilla* e solubilizadas em quantidade suficiente de solvente. Foram empregados como sistemas de eluição: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, hexano/diclorometano (1:1), hexano/diclorometano (2:8), diclorometano, diclorometano/acetato de etila (8:2), diclorometano/acetato de etila (1:1), diclorometano/acetato de etila (2:8), acetato de etila, acetato de etila/etanol (8:2), acetato de etila/etanol (1:1), acetato de etila/etanol (2:8), acetato de etila/metanol (8:2), metanol e metanol/ácido acético (8:2). As cromatoplasmas foram eluídas em cubas saturadas com o solvente da fase móvel, e após a finalização,

a visualização das manchas foi realizada numa câmara de luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm (SILVA *et al.*, 2015).

#### 4.2.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA (CCA)

A fim de purificar as amostras ativas, estas foram submetidas à separação por cromatografia em coluna aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60, eluída com os solventes selecionados pela CCD. Foram usados 60 mL de cada eluente, seguindo a ordem crescente de polaridade, coletando-se frações de 5 mL.

#### 4.2.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As frações obtidas em coluna foram analisadas por CLAE utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu Promience com detector Diode Array (DAD), uma coluna Shim-pack 2,0 mm ID x 100 mm e acetonitrila/água como eluente (35:65). As amostras foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL em acetonitrila com massa seca de cada fração igual a 5,0 mg. Após preparadas, as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas no equipamento. Os cromatogramas obtidos foram usados para avaliar o perfil químico e reunir as frações semelhantes, auxiliando as análises de CCD.

#### 4.2.9 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Após reunir as frações semelhantes, os grupos e frações isoladas foram avaliadas novamente quanto ao FPS e as que apresentaram as maiores atividades foram submetidas à caracterização química por espectrometria de massa usando um espectrômetro *ion trap* LCQ Fleet™ (Thermo Scientific) equipado com uma fonte *electrospray*, operando no modo negativo e programado para monitorar a faixa de  $m/z$  50-200. As soluções foram diluídas a 5 ppm em metanol grau HPLC e aplicadas por inserção direta através da bomba seringa do próprio equipamento. Para analisar as frações utilizaram-se os seguintes parâmetros de operação: *spray voltage*: 5kV, *sheath gas*: 8arb, *aux gas*: 5 arb, *sweep gas*: 5 arb, *capilar temp*: 175 °C, *capilar voltage*: 50V (folhas) e 35V (galhos), *tube lens*: 120 V, *syringe pump*: 8 µL/min.

#### 4.2.10 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COM ATIVIDADE FOTOPROTETORA

As emulsões O/A foram elaboradas em três formulações distintas, diferenciando-se apenas com relação à presença dos ativos fotoprotetores sendo: (i) com ativo vegetal, (ii) com benzofenona

e (iii) sem ativo fotoprotetor (controle). A composição das formulações encontra-se descrita na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição das formulações de emulsões fotoprotetoras I, II e III.

Componentes	Formulações			
	I	II	III	
	Quantidade (%)			
Fase A	Base não iônica croda	7,00	7,00	7,00
	Óleo mineral USP	3,50	3,50	3,50
	Miristrato de isopropila	3,50	3,50	3,50
	Nipazol (Propilparabeno)	0,10	0,10	0,10
	Óleo de silicone	3,50	3,50	3,50
Fase B	Nipagin (Metilparabeno)	0,15	0,15	0,15
	Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00
	EDTA	0,10	0,10	0,10
	Água destilada	72,05	72,05	72,05
Fase C	Uréia	0,10	0,10	0,10
	Glicerina	4,00	4,00	4,00
	Benzofenona – 3	-	0,03	-
	Extrato ativo de <i>A. canelilla</i>	-	-	0,14

As emulsões foram preparadas por inversão de fase. As fases A (fase oleosa) e B (fase aquosa) foram aquecidas a 70°C, e em seguida verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, homogeneizando-se em agitador mecânico até o arrefecimento natural da emulsão formada. A fase C foi adicionada durante a agitação da emulsão quando a temperatura atingiu 40°C, evitando assim qualquer tipo de degradação térmica do extrato da planta e do filtro químico. As formulações foram elaboradas em duplicatas e os parâmetros físico-químicos foram avaliados após 24 h do seu preparo, seguidos dos testes de estabilidade.

Análise Macroscópica: a análise macroscópica foi realizada após 24 h do preparo das formulações, onde foram avaliadas as características organolépticas (aspecto, cor e odor), com a finalidade de identificar possíveis indícios de instabilidade tais como cremeação, floculação e coalescência (FERRARI, 1998).

Teste de Centrifugação: os testes de centrifugação foram realizados 24 h após o preparo das emulsões, em duplicata, acondicionando-se 5,0 g de amostra em tubos centrífugos e

submetendo-os a 1000, 2500 e 3500 rpm, correspondentes a 70, 440 e 863 g, respectivamente, durante 30 min em cada rotação a 25°C, em uma centrífuga Centrifuge Model 90-1.

pH e Condutividade: os valores de pH foram determinados com auxílio de pHmetro (GEHAKA PG 1800), por meio da dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra ensaiada em água destilada, avaliando a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo (BRASIL, 2004). Da mesma maneira, foi avaliada a condutividade das emulsões em condutivímetro (GEHAKA CG 1800). As análises foram realizadas em duplicata.

Densidade Relativa: a densidade relativa das formulações foi obtida de acordo com a ANVISA (2007), por meio de um picnômetro de vidro e uma balança analítica, avaliando a relação entre a massa da amostra e da água a 20° C. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### 4.2.11 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As emulsões formuladas foram conduzidas ao estudo de estabilidade preliminar, com duração de 12 dias, onde foram expostas às condições extremas de temperatura e a exposição à luz solar com a finalidade de acelerar possíveis sinais de instabilidade. Após este período, avaliaram-se as características organolépticas (aspecto, cor e odor), valores de pH, condutividade e densidade relativa (ANVISA, 2004). As emulsões foram submetidas ao estresse térmico, ciclo gela-degela e à exposição à radiação solar. Uma amostra foi mantida protegida da luz, em local seco e arejado, sendo utilizada como controle.

Estresse Térmico: consistiu no aquecimento das emulsões na faixa de temperatura de 40 a 80°C. O aumento da temperatura ocorreu de  $5\pm 1^\circ\text{C}$  em  $5\pm 1^\circ\text{C}$ , por 30 min em cada temperatura. Os ensaios físico-químicos foram realizados ao término do aquecimento a 80°C, após o arrefecimento natural das amostras à temperatura ambiente (FERRARI, 1998).

Ciclo Gela-Degela: as emulsões foram expostas a variações de temperatura por um período de 12 dias. As amostras foram submetidas a  $4\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h em geladeira e  $45\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h em estufa, completando assim, um ciclo. As análises foram realizadas ao final do 6º ciclo (12 dias).

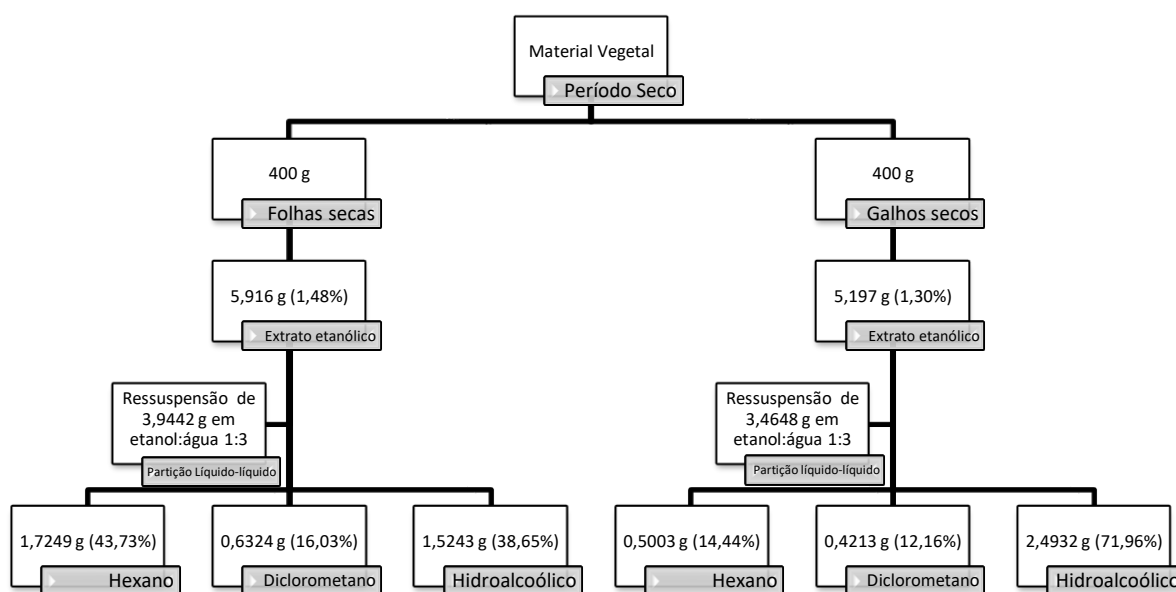
Exposição à Radiação Luminosa: as amostras foram submetidas à incidência luminosa direta por 12 h durante o dia, e em local escuro por 12 h durante o dia, ambos à temperatura ambiente durante 12 dias, para detecção de sinais de instabilidade decorrente da exposição à luz (ANVISA, 2004).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL, EXTRATOS E PARTIÇÕES DE *Aniba canelilla*

Os óleos essenciais foram obtidos com um rendimento médio de 1,02% (m/m) para as folhas e de 1,41% (m/m) para os galhos finos. Os óleos essenciais das folhas apresentaram coloração escura e os dos galhos cor amarelada, que foi escurecendo conforme o progresso da extração. O rendimento dos extratos etanólicos de folhas e galhos e suas partições podem ser observados na Figura 38.

Figura 38 - Massas e rendimentos dos extratos etanólicos e partições líquido-líquido obtidos de folhas e galhos secos de *Aniba canelilla*.



#### 4.3.2 ANÁLISE DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

Os resultados da atividade fotoprotetora mostram que as amostras de óleos essenciais e de extratos de folhas e galhos de *A. canelilla* apresentam um alto fator de proteção solar. Nota-se ainda que os extratos possuem maior atividade fotoprotetora que os óleos essenciais. O valor máximo de FPS foi encontrado nas fases diclorometânicas, das folhas e galhos, obtidas a partir dos extratos etanólicos. Observa-se ainda, que os extratos exibiram uma alta absorção da radiação UVB em comparação com os padrões quercetina, benzofenona e o protetor solar comercial. Os valores de FPS e a razão UVA/UVB encontram-se dispostos na Tabela 12.



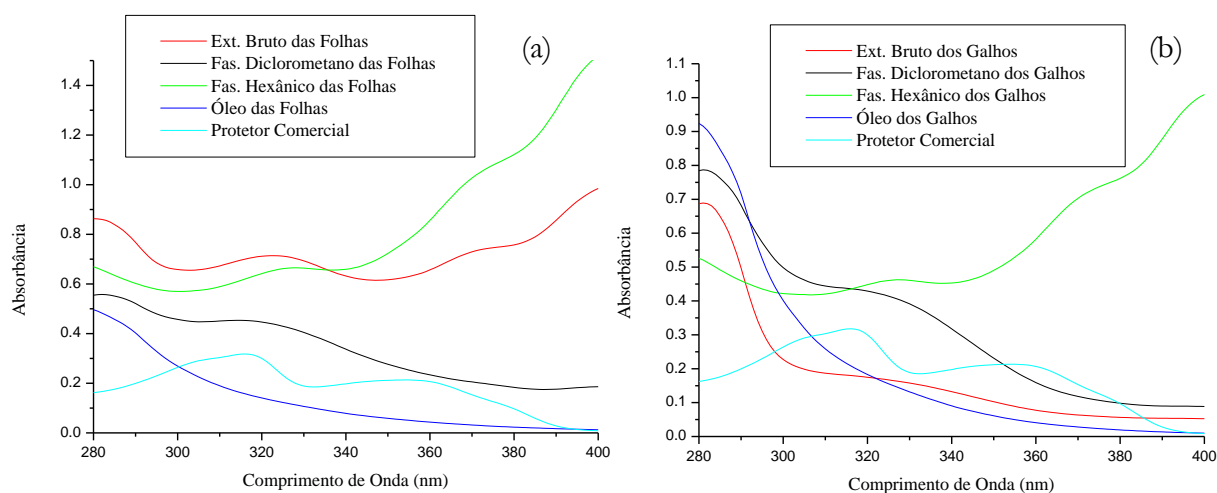
Tabela 12 - Valores de FPS e razão UVA/UVB calculados para padrões e para os extratos, partições e óleos essenciais de galhos e folhas de *Aniba canelilla*.

<b>Amostras</b>	<b>FPS</b>	<b>UVA/UVB</b>
Extrato Etanólico Bruto de Galhos	27,70	1,06
Extrato Etanólico Bruto de Folhas	42,80	2,82
Fase Diclorometânica de Galhos	122,60	1,12
Fase Diclorometânica de Folhas	116,52	1,54
Fase Hexânica de Galhos	54,23	3,92
Fase Hexânica de Folhas	37,21	4,19
Fase Hidroalcoólica de Galhos	37,77	2,10
Fase Hidroalcoólica de Folhas	74,09	0,52
Óleo Essencial de Galhos	5,49	0,44
Óleo Essencial de Folhas	7,54	0,60
Quercetina	261,23	5,79
Benzofenona	289,80	
Protetor Comercial	72,08	

A partir dos dados de FPS obtidos, nota-se que os extratos e partições absorveram de maneira significativa a radiação UV, em comparação com os padrões. Os óleos das folhas e dos galhos apresentaram uma boa proteção na região do UVA, segundo os critérios de classificação de Boots the Chemists (2004). No entanto, os extratos e suas partições apresentaram uma classificação ultra nessa região. É importante salientar que, segundo Radice *et al.* (2016), a razão UVA/UVB é um bom indicativo de proteção UVA quando o UVB possui resultados significativos de FPS, pois assim, a curva de absorção da radiação UVA passa a apresentar maior correlação com os testes *in vivo*.

Na Figura 39 estão apresentados os espectros de absorção (280 a 400 nm) dos extratos, partições e óleos essenciais de folhas (a) e de galhos (b) de *A. canelilla* e de um protetor comercial.

Figura 39 - Espectros de absorção dos extratos, partições e óleos essenciais de folhas (a) e de galhos (b) de *Aniba canelilla* e de um protetor solar comercial.



Em um estudo recente realizado em nosso grupo de pesquisa, Fonseca Jr *et al.* (2015) avaliaram o FPS de extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. canelilla* a 0,1% (m/m) coletados no período de cheia. Foram encontrados os valores de FPS = 90,25 para o extrato de folhas e de 34,83 para o de galhos, sendo considerados muito ativos. Os óleos essenciais de folhas e de galhos coletados na época da cheia apresentaram FPS de 14,08 e de 6,91, respectivamente. Comparando-se os dados de Fonseca Jr *et al.* (2015) obtidos para o material vegetal coletado no período de cheia, com os obtidos no presente estudo (planta coletada no período da seca), verifica-se que possivelmente a variação sazonal e a temperatura provocaram mudanças de rotas biossintéticas no vegetal, implicando em uma diminuição dos metabólitos ativos no período seco, acarretando em uma diminuição do fator de proteção solar.

Outros estudos já demonstraram a influência sazonal na produção de compostos biologicamente ativos em plantas. Nunes *et al.* (2009) observaram que a variação sazonal influenciou na composição química e na atividade citotóxica da própolis vermelha. Martins *et al.* (2016) analisaram o FPS de várias espécies, incluindo os extratos hidroetanólicos da casca de *A. canelilla*, e confirmaram a presença de substâncias fotoprotetoras, no entanto, com baixo valor de FPS ( $3,0 \pm 0,5$ ) e comprimento de onda crítico de  $\lambda_c$  380.

Um fotoprotetor, para ser indicado como adequado na proteção à radiação UVA, deve apresentar valor de  $\lambda_c$  maior ou igual a 370 nm. Quanto maior o valor do comprimento de onda crítico, maior será a proteção com relação à radiação UVA. No entanto, o comprimento de onda crítico não leva em consideração a intensidade de todo o espectro eletromagnético, possibilitando que um filtro solar com proteção inferior possa apresentar mesmo valor de  $\lambda_c$  que outro, com proteção superior (VELASCO *et al.*, 2011).

#### 4.3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DOS METABÓLITOS DE *Aniba canelilla*

De acordo com o estudo fitoquímico preliminar, os extratos de folhas e galhos de *A. canelilla* apresentam flavonoides, fenóis, taninos, alcaloides e esteroides. As fases diclorometânicas tanto das folhas como dos galhos apresentaram fenóis e esteroides, que são compostos aromáticos interessantes para a fotoproteção.

Diferentes espécies de plantas respondem de forma distinta frente à radiação UVB. Segundo Rayan *et al.* (2002), a via biossintética dos fenilpropanoides responde às situações de estresse ambiental, inclusive ao aumento de radiação UVB, levando a um aumento da concentração de flavonoides nas folhas e flores. Os flavonoides absorvem fortemente na região UVB, e existem evidências de que eles protegem as plantas dos efeitos da radiação, atuando como um filtro solar (REUBER *et al.*, 1996). O espectro de absorção típico dos flavonoides possui dois picos, sendo um na faixa de 240 a 280 nm e outro nos comprimentos de 300 a 500 nm, quando dispersos em etanol (BOBIN *et al.*, 1994).

Os picos presentes nos espectros das fases diclorometânicas (Figura 38), que demonstram maior FPS quando comparadas com as outras fases da partição, representam transições que envolvem combinações de níveis vibracionais e rotacionais do estado fundamental e uma combinação correspondente no nível eletrônico excitado. De acordo com Silverstein *et al.* (2005), quando a molécula absorve luz em seu comprimento de onda mais longo, um elétron é excitado do seu orbital ocupado de maior energia para o seu orbital vazio de menor energia.

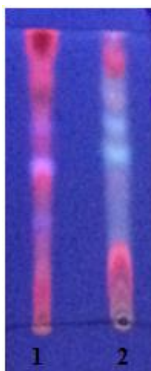
Portanto, verifica-se que os extratos e partições de folhas e galhos de *A. canelilla* apresentam compostos, tais como flavonoides e compostos fenólicos, cujas moléculas apresentam ligações conjugadas que possuem absorção máxima em comprimentos de onda maiores que 200 nm, pois as flavonas e flavonóis oxigenados em seu anel-A apresentam uma alta intensidade na banda entre 240-285 nm e uma fraca intensidade na região 300-550 nm, quando analisados no UV/Vis. Dessa forma, os componentes químicos dos extratos e partições de folhas e galhos de *A. canelilla* justificam os altos valores de FPS observados.

#### 4.3.4 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FASE DICLOROMETANO

Após a análise do FPS nos extratos etanólicos, partições e óleos essenciais, foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) para determinar os possíveis solventes que seriam utilizados na cromatografia em coluna aberta (CCA) para separação dos constituintes químicos da fase diclorometânica de folhas e galhos de *A. canelilla* (amostras que apresentaram os maiores valores de FPS). Os sistemas de eluição escolhidos dispersavam as substâncias na placa com valores de  $R_f$  entre 0,3 e 0,7 para melhor separação das biomoléculas. Nota-se na Figura 40 que no

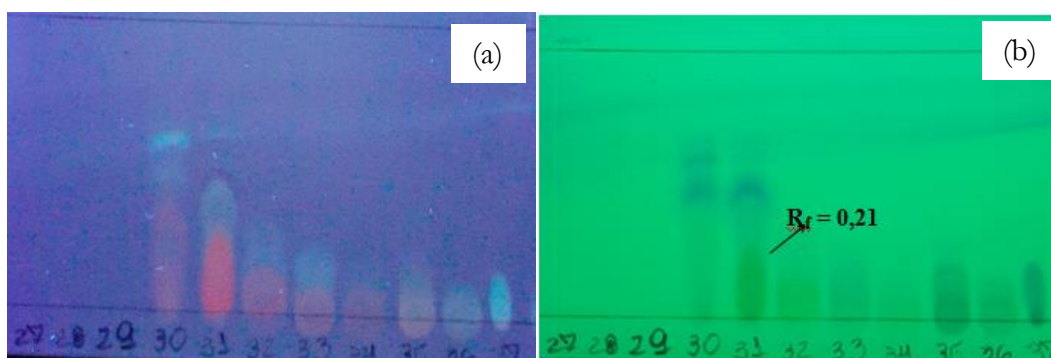
comprimento de onda de 365 nm aparecem distintas cores referentes às possíveis substâncias que absorvem a radiação UVB, as quais são provavelmente, responsáveis pelo FPS dos metabólitos de *A. canelilla*.

Figura 40 - Cromatografia em camada delgada da fase diclorometano de folhas (1) e de galhos (2) de *Aniba canelilla*, utilizando diclorometano/acetato de etila (8:2) como fase móvel e sílica gel como fase estacionária, sob luz UV a 365 nm.



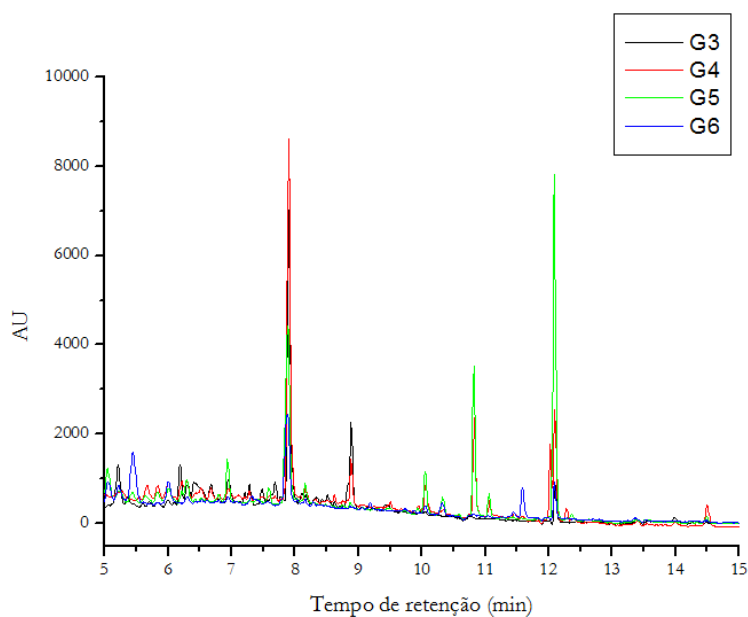
Após ser realizada a cromatografia em coluna de sílica gel 60 (CCA), obtiveram-se 113 frações para os galhos e 140 frações para as folhas. As frações foram analisadas novamente por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 41) e analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o intuito de unir as frações semelhantes.

Figura 41 - Cromatografia em Camada Delgada após a Cromatografia em Coluna Aberta da partição diclorometano dos Galhos (Frações 27-37) eluídas com diclorometano e fase estacionária sílica-gel sob luz UV de 254 nm (a) e 365 nm (b).



Devido à intensidade da luz emitida na fração 31 (G4), esta foi mantida sozinha, conforme pode ser visto no cromatograma obtido por CLAE (Figura 42), onde o composto majoritário apresenta índice de retenção  $IR = 7,893$ .

Figura 42 - Cromatograma das frações G3, G4, G5 e G6 obtidas da fase diclorometânica de galhos de *Aniba canelilla*.



Após todos os frascos terem sido examinados e reunidos, realizou-se novamente a análise do FPS para determinar quais frações ou grupos de frações apresentavam os maiores valores de FPS. Os valores estão dispostos na Tabela 13, para as frações obtidas da fase diclorometânica de folhas e na Tabela 14 para as de galhos.

É possível notar na Tabela 13 que as frações obtidas das folhas apresentam valores superiores de FPS quando comparados com os galhos. A amostra F13 das folhas (frações 54-59) foi a que apresentou o maior FPS entre as demais (152,63); a mesma foi obtida com o eluente diclorometano/acetato de etila (1:1). Portanto, a possível substância se mostra parcialmente polar. Já a fração que apresentou o maior FPS nos galhos foi G4 (86,40), fração 31 isolada durante o desenvolvimento da coluna, obtida com o eluente diclorometano/acetato de etila (8:2).

De acordo com a metodologia de determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria de Mansur *et al.* (1986), todos os extratos e suas partições foram considerados muito ativos, tendo em vista que RDC 30/2012, que determina um FPS mínimo de 6 (seis) para poder ser considerado ativo (ANVISA, 2012). Extratos de plantas que absorvem na região UV apresentam em sua composição uma mistura complexa de metabólitos secundários que absorvem na região ultravioleta, como os flavonóides, taninos, antraquinonas, alcaloides e os polifenóis, contudo a absorção máxima destes compostos não é muito bem definida (MEDINA *et al.*, 2015).

Tabela 13 – Fator de Proteção Solar e razão UVA/UVB obtidos das frações reunidas, após separação por Cromatografia em Coluna Aberta da fase diclorometânica das folhas de *Aniba canelilla*.

Amostra	Fração	FPS	UVA/UVB	Massa (g)	Rendimento (%)
F1	1-7	2,50	0,20	0,0080	1,83
F2	8-9	3,41	0,39	0,0029	0,66
F3	10-15	6,20	0,72	0,0016	0,37
F4	15-20	7,83	0,72	0,0033	0,75
F5	21-26	15,48	0,37	0,0046	1,05
F6	27-28	42,19	1,68	0,0100	2,28
F7	29-32	64,74	1,38	0,0056	1,28
F8	33-39	2,87	-0,12	0,0024	0,55
F9	40	4,89	0,53	0,0050	1,14
F10	41-42	69,86	1,56	0,0027	0,62
F11	43-49	97,19	1,76	0,0155	3,54
F12	50-53	nd	nd	0,0005	0,11
F13	54-59	152,63	1,11	0,0055	1,26
F14	60-63	13,78	1,21	0,0004	0,09
F15	64-73	69,80	1,24	0,0024	0,55
F16	74	nd	nd	0,0001	0,02
F17	75-79	5,94	2,87	0,0013	0,30
F18	80-81	nd	nd	0,0005	0,11
F19	82-85	12,01	2,80	0,0016	0,37
F20	86-92	38,29	1,19	0,0030	0,68
F21	93-94	8,6	2,76	0,0017	0,39
F22	95	67,95	1,31	0,0424	9,68
F23	96	74,29	1,27	0,0190	4,34
F24	97-99	23,48	1,17	0,0121	2,76
F25	100-101	9,92	1,00	0,0109	2,49
F26	102-107	35,45	1,19	0,0191	4,36
F27	108-113	12,79	0,80	0,0164	3,74
F28	114	nd	nd	0,0482	11,00
F29	115-116	5,99	0,83	0,0172	3,93
F30	117-121	10,69	1,09	0,0136	3,10
F31	122-123	8,92	1,07	0,0070	1,60
F32	124-133	9,42	1,24	0,0275	6,28
F33	134-135	0,38	0,51	0,0228	5,20
F34	136-138	1,68	1,52	0,0209	4,77

nd = não detectado

Tabela 14 – Fator de Proteção Solar e razão UVA/UVB obtidos das frações reunidas, após separação por Cromatografia em Coluna Aberta da fase diclorometânica dos galhos de *Aniba canelilla*.

Amostra	Fração	FPS	UVA/UVB	Massa (g)	Rendimento (%)
G1	1-18	2,56	0,01	0,0232	13,54
G2	19-29	14,00	0,37	0,0023	1,34
G3	30	81,60	0,53	0,0031	1,81
G4	31	86,40	1,10	0,0019	1,11
G5	32	nd	nd	0,0007	0,41
G6	33	nd	nd	0,0007	0,41
G7	34	nd	nd	0,0005	0,29
G8	35	nd	nd	0,0013	0,76
G9	36	nd	nd	0,0006	0,35
G10	37	5,63	1,22	0,0029	1,69
G11	38	9,52	1,11	0,0011	0,64
G12	39-41	26,64	1,19	0,0052	3,04
G13	42-51	9,72	0,60	0,0155	9,05
G14	52-61	32,56	0,99	0,0148	8,64
G15	62-63	1,50	0,43	0,0688	40,16
G16	64-71	3,25	0,61	0,0202	11,79
G17	72-73	6,69	1,38	0,0269	15,70
G18	74-84	2,16	1,20	0,0226	13,19
G19	85-95	3,06	0,66	0,0484	28,25
G20	96-113	2,98	0,62	0,1107	64,62

Ebrahimzadeh *et al.* (2014) realizaram um estudo que envolveu cinco espécies diferentes de plantas, avaliando os extratos metanólicos obtidos por ultrassom e por maceração a frio de *Crataegus pentagyna* e *Feijoa sellowiana* como potenciais aditivos para formulações de protetor solar. O maior valor de FPS (2 mg/7 mL de metanol) determinado pelo método de Gharavi *et al.* (1994), foi obtido no extrato de *C. pentagyna* (FPS = 24,47), seguido do extrato de *F. sellowiana* (FPS = 1,30). Além disso, embora exista uma boa correlação entre o FPS e conteúdo fenólico, os autores não encontraram correlação entre o FPS e a concentração de flavonoides.

No trabalho de Khazaeli *et al.* (2011), os autores relatam os efeitos protetores de radiação UV de dezesseis extratos de acetato de etila de plantas medicinais, ricas em flavonoides e outros compostos fenólicos, usando o método de Gharavi *et al.* (1994). Apenas duas espécies, *Dracocephalum moldavica* e *Viola tricolor*, mostraram altos valores de FPS, de 24,79 e 25,69, respectivamente. As mesmas plantas também exibiram as maiores quantidades de flavonoides e compostos fenólicos, que justificam os valores de FPS relatados.

#### 4.3.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS MOLÉCULAS BIOATIVAS

Por apresentarem os mais altos valores de FPS, as amostras F13 (Tabela 13) e G4 (Tabela 14) foram analisadas por espectrometria de massas para caracterização química das moléculas bioativas. No espectro de íons totais da amostra F13 (Figura 43), observam-se dois grandes picos, o íon molecular 146 m/z, característico do ácido cinâmico desprotonado  $[M-H]^-$  e o 103 m/z, fragmento do ácido cinâmico sem o grupo carboxila. Dessa forma, pode-se inferir que a atividade fotoprotetora da fração F13 deve-se ao ácido cinâmico (composto majoritário). Entretanto, as demais moléculas presentes na fração F13, observadas na análise de CLAE (Figura 44), também podem ser responsáveis pelo alto valor de FPS (152,63).

Figura 43 - Espectro de íons totais em modo negativo do ácido cinâmico obtido por espectrometria de massa da amostra F13 (fração obtida da fase diclorometânica de folhas de *Aniba canelilla*).

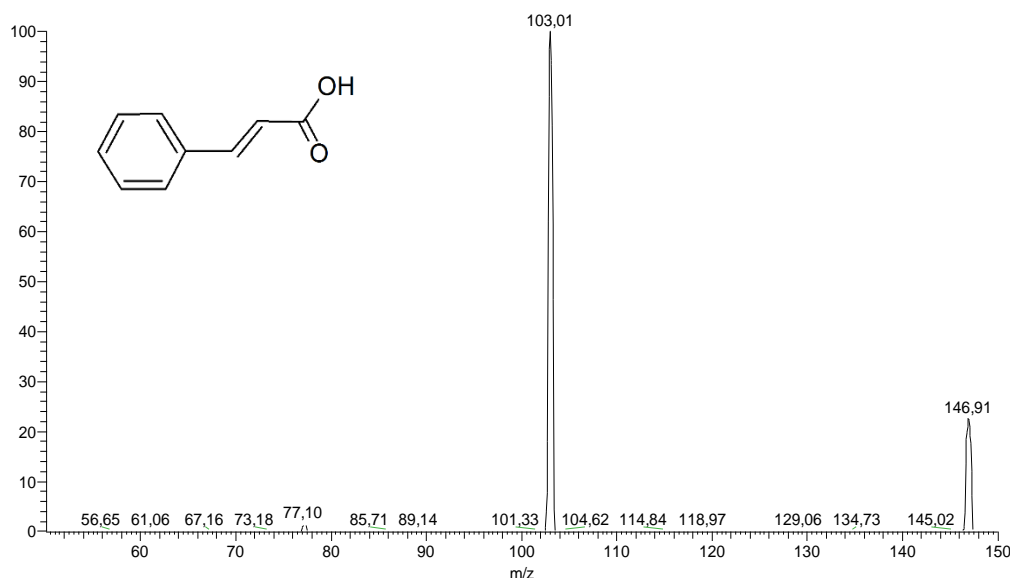
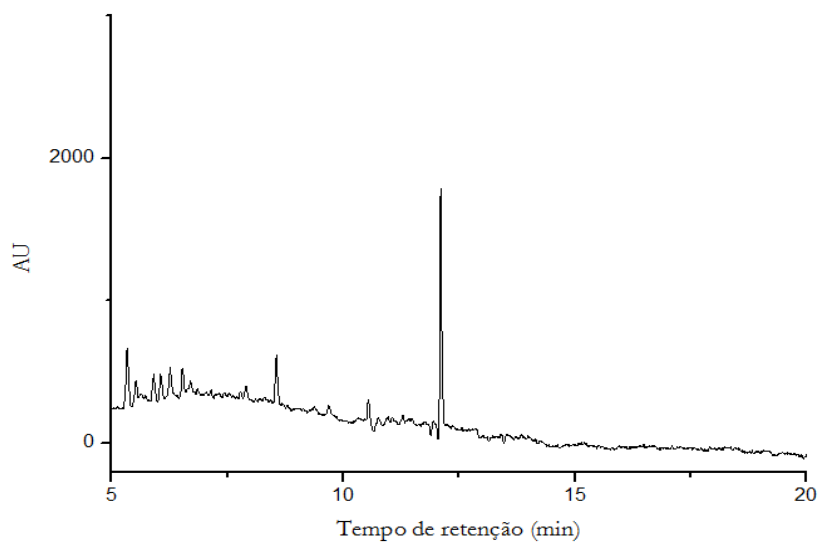


Figura 44 - Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra F13.





O espectro de íons totais da amostra G4 (Figura 45) é característico do ácido siríngico, pois apresenta o íon molecular 197 m/z [(M-H)<sup>-</sup>] e seu íon base 182 m/z [(M-15)<sup>-</sup>] caracterizado pela perda de um grupo metila (CH<sub>3</sub>)<sup>-</sup>, seguido de outra perda de grupo metila (CH<sub>3</sub>)<sup>-</sup>. O pico em 153 m/z é oriundo de uma fragmentação direta do íon molecular [(M-44)<sup>-</sup>] seguido de uma saída do grupo carboxilato (COO)<sup>-</sup>. Neste caso, considerando que a fração G4 apresentou mais de um pico na análise por CLAE (Figura 46), não se pode afirmar que o ácido siríngico é a única molécula detentora da atividade fotoprotetora. Entretanto, pode-se inferir que esta substância é uma das responsáveis pelo alto valor de FPS encontrado na fração obtida de galhos de *A. canelilla*.

Figura 45 - Espectro de íons totais em modo negativo do ácido siríngico obtido por espectrometria de massa da amostra G4 (fração obtida da fase diclorometânica de galhos de *Aniba canelilla*).

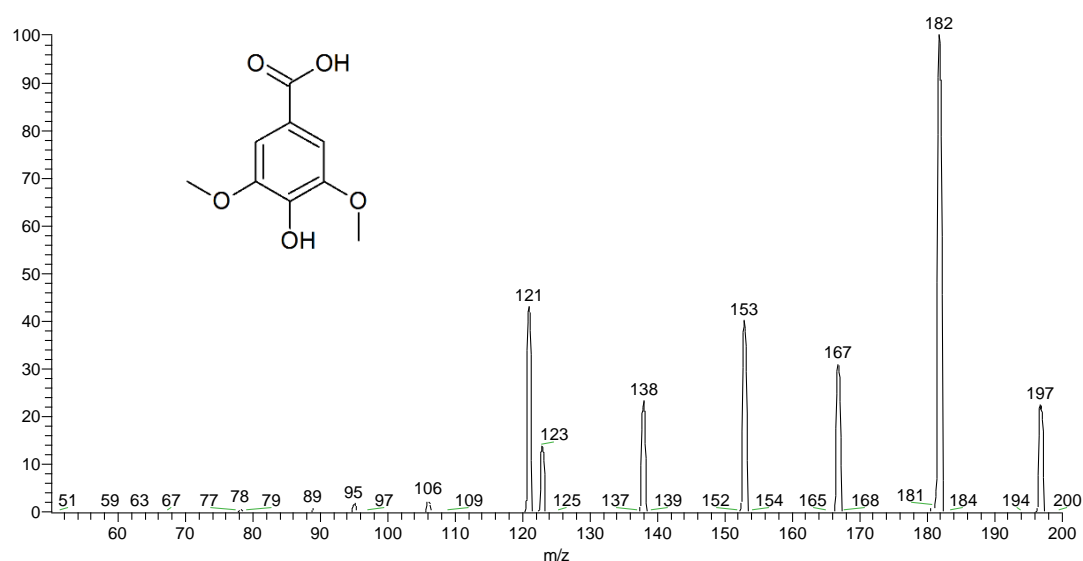
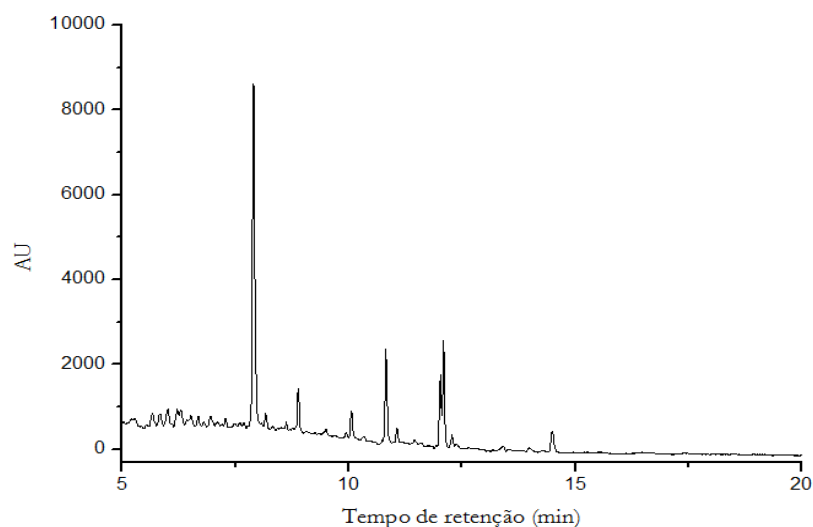


Figura 46 - Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra G4



Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e os derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, e possuem sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), enquanto os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, cinâmico e sináptico fazem parte dos ácidos hidroxicinâmicos, compostos aromáticos com nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; SOARES, 2002).

Nas plantas, os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biossintéticas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato, que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A via de origem determinará o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa forma, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupo hidroxila em posição orto, que se formam a partir do ácido cinâmico. Já a via acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em meta (SIMÕES *et al.*, 2010).

O ácido cinâmico é um ácido fenólico muito conhecido, cujo potencial antioxidante já foi descrito (Soares, 2002). Em um estudo recente, Souza (2016) isolou o ácido cinâmico a partir do extrato da canela do Ceilão e verificou alta atividade antioxidante da fração que continha esta substância. Zeggio (2016) relata outras atividades biológicas do ácido cinâmico, além da antioxidante, tais como antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória. A atividade fotoprotetora do ácido cinâmico também já foi relatada por Bobin *et al.* (1995), Santos (2010) e Ramos (2010), sugerindo que o alto valor de FPS encontrado nas frações obtidas de folhas e galhos de *A. canelilla* seja devido à presença desta substância.

As pesquisas de novos filtros químicos, contendo ativos vegetais têm se revelado muito promissoras, tendo em vista a busca de moléculas ativas com alta proteção a UVA e UVB com baixa toxicidade. Skotarczak *et al.* (2015) relataram que filtros físicos, como dióxido de titânio, não causam reações adversas ou alergias na pele; no entanto, quando ocorre a aplicação oclusiva do produto, a fim de otimizar a refração de UV, pode ser comedogênico. E ainda, segundo Radice e colaboradores (2016), a incorporação de dióxido de titânio em nanoemulsões e filtros UV com filtros químicos sintéticos tem provocando dermatite de contato.

O ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e seus derivados foram reconhecidos por serem responsáveis por muitas reações alérgicas, assim como existem relatos de reações adversas para avobenzona, octocrileno e benzofenona-3. Porém, ainda assim, essas substâncias são amplamente utilizadas em cosméticos (SKOTARCZAK *et al.*, 2015). Em outro estudo (NISHIKAWA, 2012) foi relatada a presença de benzofenona-3 no plasma e urina de voluntários humanos, mesmo depois de quatro dias após a aplicação inicial tópica de protetores solares. Estes dados, além de serem

inaceitáveis para o Regulamento da UE 1223/2009, servem de alarme sobre a difusão de filtros de UV para o sistema circulatório, onde a sua acumulação pode causar efeitos desconhecidos ou reações adversas em outros órgãos.

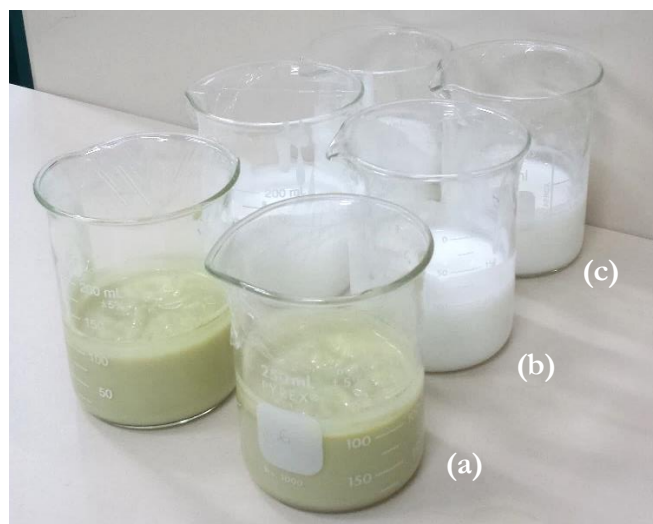
A consciência de que os recursos do planeta não são inesgotáveis está fazendo com que os consumidores mudem seus hábitos de vida, buscando produtos cosméticos mais sustentáveis, mais ecológicos e mais seguros em sua aplicação na pele. Estudos recentes realizados por Sánchez-Quiles e Tovar-Sánchez (2015) relatam que o uso de protetores solares está aumentando, e isso tem gerado um maior risco potencial de poluição das águas, devido a capacidade de muitas substâncias tóxicas entrarem na teia alimentar e bioacumularem.

O mecanismo principal de proteção de filtros químicos é a absorção de radiação UV e posterior emissão da energia com menor risco potencial. Pela absorção de um fóton de UV, uma molécula orgânica vai desde o estado eletrônico fundamental ( $S_0$ ) para o primeiro estado eletrônico excitado ( $S_1$ ). Esta energia absorvida pode ser lançada através de diversos caminhos. Do estado de  $S_1$ , pode ser perdido diretamente por fluorescência, uma transição radioativa, ou através de fotoreações. Também existem perdas em transição radioativa, pela qual a energia absorvida é redistribuída dentro da molécula, cruzamento entre sistemas (CES), e leva a um estado onde a energia migra para modos de vibração da molécula, fazendo uma conversão interna (CI), levando a energia para o estado fundamental  $S_0'$ . O mecanismo de inativação da radiação UV em filtros sintéticos normalmente são por conversão interna, como podem ser observadas nas conversões ceto/enólicas e isomerização cis-trans, cinamatos, benzofenonas, salicilatos, e, raramente, degradação. Produtos naturais possuem moléculas geralmente maiores, contendo cromóforos e grupos funcionais que influenciam diretamente no comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{max}$ ) e, conseqüentemente, a capacidade de absorver a radiação UV (HERZOG, 2002; GIUSTI e WROLSTAD, 2001).

#### 4.3.6 ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

As emulsões desenvolvidas contendo benzofenona, fase diclorometano e controle, foram analisadas após 24 h de seu preparo quanto aos parâmetros organolépticos e físico-químicos. As formulações apresentaram aspecto homogêneo e macio ao toque com coloração branca. As formulações que continham a fase diclorometano apresentaram-se mais esverdeadas (Figura 47).

Figura 47 - Emulsões obtidas após 24 h de sua elaboração com extrato de *Aniba canelilla* (a); com benzofenona (b); e sem ativo fotoprotetor (c).



Após 24 h de formuladas as emulsões foram analisadas quanto aos parâmetros organolépticos: aspecto, cor, odor; e parâmetros físico-químicos: centrifugação, densidade, pH, condutividade, sólidos totais e viscosidade. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas após 24 h do preparo das emulsões.

Análise	Controle	Benzofenona	<i>Aniba canelilla</i>
Aspecto	Creoso e brilhante	Creoso e brilhante	Creoso e brilhante
Cor	Branco	Branco	Verde claro
Odor	Característico dos componentes	Característico dos componentes	Característico de <i>A. canelilla</i> (suave)
Centrifugação	Normal	Normal	Normal
Densidade (g/mL)	0,9677 ± 0,0134 <sup>a</sup>	0,9460 ± 0,0081 <sup>a</sup>	0,9533 ± 0,0040 <sup>a</sup>
pH	3,7225 ± 0,3472 <sup>a</sup>	3,4200 ± 0,3375 <sup>a</sup>	3,7425 ± 0,6186 <sup>a</sup>
Condutividade (μS/cm)	121,625 ± 3,018 <sup>a</sup>	120,200 ± 2,969 <sup>a</sup>	133,550 ± 1,485 <sup>a</sup>
Viscosidade (cP)	134,667 ± 17,267 <sup>a</sup>	157,417 ± 5,200 <sup>a</sup>	100,267 ± 4,283 <sup>b</sup>
Sólidos Totais (%)	3,3830 ± 0,1570 <sup>a</sup>	3,4620 ± 0,1890 <sup>a</sup>	3,2313 ± 0,1286 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam que não há diferença estatística considerando a significância estatística com  $p \leq 0,05$ .

Na análise dos parâmetros organolépticos, foi possível observar que a presença do extrato da fase diclorometânica de *A. canelilla* nas formulações alterou a cor, ficando mais esverdeada, e o odor, pois a formulação adquiriu um leve cheiro característico dos óleos essenciais da planta, o que

não representa prejuízo para a formulação. Para que a formulação adquira a mesma cor que as demais, pode-se extrair os pigmentos verdes presentes no extrato, pois as frações ativas apresentavam-se transparentes em solução, conforme verificado na separação por CCA.

Na análise físico-química das formulações, após o teste inicial da centrifugação, percebeu-se que em nenhuma formulação houve separação dos componentes das emulsões elaboradas, indicando que estas podem seguir para o estudo de estabilidade. Os componentes que não apresentaram diferenças entre as formulações foram pH, densidade, sólidos totais e condutividade.

A densidade é um parâmetro importante, pois a quantidade de produto a ser envasado em um material de embalagem primária, por exemplo, depende principalmente da densidade (MARTINS, 2015). O pH das formulações apresentou-se baixo, indicando que devem ser adicionados corretores de pH nas formulações ajustando-as ao pH ideal para a parte do corpo a ser aplicada.

Dentre os parâmetros físico-químicos, o único que apresentou diferença estatística entre as formulações foi a viscosidade. A diferença observada mostra que os extrato de *A. canelilla* diminuiu um pouco a viscosidade das emulsões, no entanto, não há necessidade de correção, tendo em vista que a viscosidade alcançada permitiu uma boa estabilidade da emulsão elaborada, não sendo observada separação de seus componentes.

As emulsões foram submetidas aos estudos preliminares de estabilidade, por um período de 12 dias, conforme metodologia da ANVISA (2004). As amostras foram examinadas macroscopicamente e submetidas aos ciclos de gelo-degelo, estresse térmico e exposição a luz solar, tendo como controle um lote armazenado à temperatura ambiente em local seco, arejado e protegido da luz. Na Tabela 20 encontram-se os resultados das análises de pH, densidade relativa e condutividade.

A interpretação dos dados obtidos durante o estudo de estabilidade depende de critérios estabelecidos para a finalidade de uso do produto final. Neste ensaio foi adotado o critério de comparação da amostra em teste com uma amostra do produto armazenada a temperatura ambiente, amostra de referência (ANVISA, 2004). De acordo com o resultado da estabilidade preliminar, observou-se que não houve alterações significativas de pH e densidade. Já os valores da condutividade térmica sofreram alteração quando exposto ao estresse térmico e quando exposto a luz solar.

O estudo do pH da formulação é muito importante, tendo em vista que o pH do produto deve ser mantido durante seu prazo de validade, pois a alteração do pH pode significar alteração da estabilidade da formulação (GARCIA *et al.*, 2009), pois sua alteração pode ser devido à degradação de qualquer componente do fitocosmético. Na Tabela 16, observa-se que não houve

alterações significativas do pH em função das diferentes condições submetidas ao longo do tempo. Além disso, a temperatura de armazenamento também não interferiu no pH da formulação.

Tabela 16 - Resultados obtidos das análises físico-químicas após a produção, teste estresse térmico, proteção contra a luz, ciclo gela-degela e exposto a luz solar.

Parâmetro		Controle	Benzofenona	<i>Aniba canelilla</i>
Densidade (g/mL)	(a)	0,9665 ± 0,0015	0,9520 ± 0,0019	0,9603 ± 0,0029
	(b)	0,9208 ± 0,0187	0,9614 ± 0,0038	0,9847 ± 0,0058
	(c)	0,9708 ± 0,0087	0,9625 ± 0,0028	0,9727 ± 0,0018
	(d)	0,9821 ± 0,0007	0,9675 ± 0,0002	0,9747 ± 0,0028
pH	(a)	3,68 ± 0,00	3,60 ± 0,03	3,56 ± 0,00
	(b)	3,45 ± 0,17	3,20 ± 0,00	3,56 ± 0,03
	(c)	3,72 ± 0,11	3,72 ± 0,01	3,65 ± 0,03
	(d)	3,72 ± 0,03	3,69 ± 0,00	3,60 ± 0,04
Condutividade ( $\mu$ S/cm)	(a)	93,200 ± 1,202	91,000 ± 5,657	96,000 ± 3,960
	(b)	157,450 ± 0,990	159,025 ± 0,389	163,650 ± 8,485
	(c)	91,950 ± 1,061	90,900 ± 3,606	96,825 ± 1,874
	(d)	78,575 ± 3,217	81,675 ± 3,500	85,875 ± 8,167

(a) = proteção contra luz, (b) = após estresse térmico, (c) = após ciclo gela-degela e (d) = exposto a luz solar.

A condutividade elétrica apresentou alterações, quando comparada com a amostra de referência. De acordo com Castelli *et al.* (2008), a condutividade é frequentemente usada para determinar a natureza das emulsões e para controlar a sua estabilidade durante o período de estocagem, pois é um parâmetro sensível a pequenas mudanças na estrutura das emulsões (MASMOUDI *et al.*, 2005) e pode estar relacionada com a agregação das partículas e o aumento da coalescência da emulsão.

Silva (2002) apresentou estudos que comprovaram a eficácia de ativos naturais em cosméticos, e relata a importância da associação da tecnologia com a cultura popular, para o estudo e consequente uso de ingredientes naturais em cosméticos. A eficácia dos ativos naturais tem aumentado a pesquisa referente ao isolamento, identificação e quantificação de compostos ativos das plantas e suas atividades biológicas (TEODOR *et al.*, 1998; GALHARDO *et al.*, 2007).

Kale *et al.* (2010) estudaram a atividade fotoprotetora de uma emulsão contendo óleo essencial da resina de *Commiphora mukul*, usando métodos de espectroscopia de transmissão e

espectroscopia de absorção. Os autores relataram que o FPS foi de  $2,23 \pm 0,48$ , concluindo que o creme formulado pode ser considerado como um eficiente protector solar.

Em outro trabalho de Kale *et al.* (2011) o FPS de três formulações contendo respectivamente extrato de *Tagetes erecta*, óleo das sementes de *Moringa oleífera* e óleo da semente de *M. oleífera* com extratos de *Tagetes erecta* foi avaliado, sendo as formulações consideradas potenciais fotoprotetoras, tendo obtido valores de FPS em torno de 2 e razão UVA/UVB em torno de 1.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que *Aniba canelilla* possui componentes nos extratos e nos óleos essenciais que podem ser incorporados em formulações cosméticas fotoprotetoras. Os componentes mais ativos foram isolados dos extratos etanólicos de folhas (ácido cinâmico) e de galhos (ácido siríngico). A atividade fotoprotetora não foi atribuída ao composto majoritário do óleo essencial, o 1-nitro-2-feniletano. As emulsões desenvolvidas mostraram-se promissoras na continuidade do estudo de suas formulações, apresentando compatibilidade química entre os componentes da formulação. Sendo assim, este trabalho apresenta um grande potencial de base científica para outros trabalhos que visem o uso dos recursos naturais e a incorporação de produtos naturais em formulações cosméticas, bem como o desenvolvimento de novas emulsões fotoprotetoras.

## Capítulo 5

---

**Desenvolvimento de um sabonete líquido íntimo contendo óleos  
essenciais de *Aniba canelilla***



## DESENVOLVIMENTO DE UM SABONETE LÍQUIDO ÍNTIMO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE *ANIBA CANELILLA*

### 5.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento científico e tecnológico ao longo dos anos vem oportunizando um grande avanço na pesquisa de produtos naturais. Impulsionado principalmente pelo apelo que a biodiversidade exerce sobre as pessoas, nota-se um grande aumento no uso de produtos naturais em substituição aos sintéticos (FUNARI e FERRO, 2005). A vegetação amazônica tem sido evidenciada neste contexto, devido sua rica biodiversidade e grande potencial biotecnológico, em especial, para obtenção de fitocosméticos (CARVALHO, 2015). As espécies aromáticas e as que produzem óleos alcançam alto valor no mercado, pois são frequentemente usadas como fonte de matéria prima nas indústrias, sendo que as pertencentes à família Lauraceae estão entre as mais utilizadas (BRITO, 2009).

O gênero *Aniba* compreende cerca de 41 espécies cujos representantes se encontram em sua maioria na Amazônia. Dentre elas, a *Aniba canelilla*, popularmente conhecida como casca-preçiosa, produz no caule um óleo essencial (1% do peso seco da planta), rico em 1-nitro-2-feniletano (TAVEIRA *et al.*, 2003; LAHLOU *et al.*, 2005), responsável pelo cheiro de canela da planta. Nitroderivados encontrados em plantas são raros. Segundo Siqueira *et al.* (2010), a biogênese do 1-nitro-2-feniletano envolve a oxidação da fenilalanina seguida por descarboxilação espontânea (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Diversas atividades biológicas já foram descritas para os metabólitos de *A. canelilla*, tais como, vasorrelaxante (INTERAMINENSE *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2013; ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014), cardiovascular (LAHLOU, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2010; INTERAMINENSE *et al.*, 2011), antinociceptiva (LIMA *et al.*, 2009), antioxidante (SILVA *et al.*, 2007; MARTINS, 2016), antimicrobiana (SILVA, 2012), citotóxica (SILVA *et al.*, 2007), citoprotetora (COSKER *et al.*, 2014), anti-inflamatória (VALE *et al.*, 2013), inibitória da acetilcolinesterase (SILVA *et al.*, 2014), hipnótica, anticonvulsiva, ansiolítica (OYEMITAN *et al.*, 2013) e anticorrosiva (DE BARROS, 2015).

A adição de extratos, ceras e óleos essenciais em produtos cosméticos agrega características benéficas aos mesmos, uma vez que apresentam atividades biológicas interessantes, devido à presença de metabólitos secundários como os fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros (SOUZA *et al.*, 2009). Seguindo esta tendência, surge a necessidade de estudos científicos que comprovem os efeitos benéficos desses componentes quando adicionados às diferentes formulações cosméticas, visando garantir a eficácia das mesmas (BALOGH, 2011).

Nesse sentido, com o intuito de favorecer o uso sustentável da biodiversidade amazônica utilizando-se do potencial dos metabólitos secundários de *A. canelilla* para formulação de um fitocosmético, foram investigadas as atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica dos extratos e óleos essenciais desta espécie. Foram investigadas as classes químicas presentes nos metabólitos de *A. canelilla*, bem como a composição dos óleos essenciais. Finalmente, foi formulado um sabonete líquido íntimo, avaliando suas características físico-químicas e sua estabilidade preliminar.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Folhas e galhos finos de *A. canelilla* foram coletados no período seco (setembro de 2014) na Reserva Florestal Adolpho Ducke (3° 05' S, 60° 00' W) em Manaus, Amazonas, no período matutino. Os dados referentes aos índices pluviométricos foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia. Os mapas climáticos analisados indicaram que não houve quaisquer mudanças atípicas referentes ao clima da região no período da coleta do material vegetal (INMET, 2014). As plantas coletadas foram identificadas comparando-as com uma excicata depositada no Herbário do INPA pelo projeto “Potencial biotecnológico da produção sustentável de óleos essenciais e compostos com atividade antifúngica de espécies da família Lauraceae”, edital MCT/CNPq/FNDCT – Ação Transversal/CT-Amazônia/CT-Biotec/Bionorte n° 066/2009.

O material vegetal foi colhido de dez árvores, enviado ao laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da UEA para secagem por 10 dias à temperatura ambiente e à sombra. Folhas e galhos finos foram triturados separadamente em um moinho elétrico facas com tela de 3 mm e foram utilizados para a obtenção do óleo essencial e dos extratos etanólicos.

### 5.2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* foram obtidos por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger modificado, onde 100 g do material vegetal foram destilados com um litro de água destilada a 100°C durante 3,5 h para folhas e 6 h para galhos (CHAAR, 2000; FERRAZ, 2012). Posteriormente, os óleos foram levados à centrifugação para separação da água e secos por percolação em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, obtendo-se assim, os óleos essenciais.

### 5.2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES

O material vegetal seco e triturado foi macerado a frio em álcool etílico 92,8° INPM à temperatura ambiente por 3 ciclos de 48 horas com filtração e renovação do solvente a cada ciclo,

seguido de 20 min no ultrassom (SILVA, 2012; CURSINO, 2011). O filtrado foi submetido à evaporação sob pressão reduzida, a 40°C, em evaporador rotativo. Parte do extrato bruto resultante foi dissolvido em etanol-água (1:3) e submetido à partição líquido-líquido, utilizando *n*-hexano e diclorometano, restando ainda uma fração hidroetanólica que foi levada ao liofilizador (Christ – Alpha 1-2 LD plus) sob pressão de 0,04 mbar e temperatura de -45°C. Assim, o material obtido para análise consistiu em extrato etanólico (bruto), fase *n*-hexânica (partição), fase diclorometânica (partição) e fase hidroalcoólica (partição), de folhas e galhos de *A. canelilla*.

#### 5.2.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

As soluções obtidas a partir dos extratos e partições de folhas e galhos de *A. canelilla*, ressuspensos em dimetil-sulfóxido (DMSO), e as obtidas a partir dos óleos essenciais, ressuspensos em Tween 80, foram testadas em microrganismos que compõem o teste desafio do sistema conservante (*Challenge Test*) proposto pela ANVISA, utilizando as cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 12.031), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16.404), *Escherichia coli* (ATCC 8.739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9.027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6.538). A atividade antimicrobiana de óleos e extratos de *A. canelilla* também foi avaliada contra outros microrganismos patogênicos, como *Colletotrichum guaranicola*, *Alternaria spp.*, *Didymella bryoniae* (cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia do INPA) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19.615).

As cepas bacterianas liofilizadas foram inicialmente hidratadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas por 24 h para reativação. Após esse período, as bactérias foram semeadas em Ágar BHI e reincubadas a 36°C por 24 h. Uma pequena fração de colônias em crescimento foi retirada e apropriadamente diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de MacFarland, que equivale à concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (NCCLS, 2002).

As cepas fúngicas foram reativadas através de sua inoculação em 1 µL de caldo Sabouraud e incubação a 30°C. Após reativação, as culturas foram sub-cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas. Decorrido o período de crescimento, as culturas foram apropriadamente diluídas em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de MacFarland, que equivale à concentração final de 2 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL.

Os ensaios de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, extratos etanólicos e suas partições foram realizados pelo método de cavidade-placa. Os microrganismos foram inoculados em câmara de fluxo através da técnica de *spread-plate*, em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud para fungos e Müller-Hinton para bactérias, onde foram feitas cavidades circulares de

6 mm de diâmetro (BANHOS, 2014). Em seguida, adicionaram-se nas cavidades as soluções testes a 2 mg/mL. Utilizou-se como controle negativo de atividade antimicrobiana as soluções de DMSO e Tween 80, e como controle positivo Cetoconazol 200 mg para fungos e Amoxicilina 875 mg com Ácido Clavulânico 125 mg para bactérias, ambos a 2 mg/mL.

Após 24 horas de incubação a 30°C em estufa tipo BOD, procedeu-se a verificação da formação dos halos de inibição de crescimento e, em caso de atividade positiva, a verificação do diâmetro do halo com o auxílio de um paquímetro. A atividade antimicrobiana foi determinada pela mensuração do halo de inibição e classificada segundo Alves *et al.* (2010), sendo halos inferiores a 9 mm considerados inativos, halos entre 9 e 12 mm pouco ativos, entre 13 e 18 mm ativos, e maiores que 18 mm muito ativos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 5.2.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A atividade citotóxica dos extratos etanólicos, fases hexânicas, fase diclorometânicas, fase hidroalcoólicas e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* foi avaliada através de letalidade contra *Artemia salina* Leach, de acordo com o método proposto por Meyer *et al.* (1982) e McLaughlin *et al.* (1991b).

As soluções testes foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, seguindo-se de diluições seriadas até a concentração de 0,125 mg/mL solubilizando-se em 1% de Tween 80 para óleos e DMSO para extratos e partições. As soluções foram avolumadas com solução salina na mesma concentração do meio de cultivo. Como meio de crescimento, foi utilizada uma solução salina contendo 38 g de sal marinho sintético em água destilada, preparando-se 1 L de solução (3,8%), e para a eclosão, foram adicionados 10 mg de cistos de *Artemia salina*. O crescimento ocorreu em temperatura ambiente, de 25 a 28°C, sob iluminação em lâmpada fluorescente durante 48 horas e aeração constante.

Após as 48 h da eclosão, os náuplios foram transferidos para tubos de ensaio, sendo distribuídas 15 larvas de *Artemia salina* para cada tubo. Nos tubos foram adicionados 5 mL das soluções teste, em triplicata. No controle, a solução teste foi substituída pelo solvente utilizado para solubilizar o óleo ou extrato. Para evitar a mortalidade no grupo controle, foi elaborado um sistema de aeração constante e os tubos de ensaio contendo as larvas de *Artemia salina* foram mantidas por 24 h sob iluminação de lâmpada fluorescente.

Após o período de exposição, foi analisado o número de larvas sobreviventes, tanto nos tubos de controles quanto nos tratamentos. Foram feitas diluições sucessivas das soluções seguindo uma progressão geométrica para a determinação da Concentração Letal que causa morte de 50% de uma população (CL<sub>50</sub>), obtida por meio de regressão linear.

## 5.2.6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS CLASSES QUÍMICAS NOS EXTRATOS, PARTIÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS

Para a prospecção fitoquímica preliminar dos metabólitos presentes em folhas e galhos de *A. canelilla*, foi utilizada a metodologia descrita por Matos (2009) e pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2016), com adaptações. Para cada procedimento foram preparadas soluções a 2 mg/mL em álcool etílico P. A. Os ensaios realizados consistiram em testes para verificar a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas, taninos e compostos fenólicos.

**Alcaloides:** em tubo de ensaio com 2,0 mL de amostra acrescentaram-se três gotas do reagente de Drangendorff para a observação da presença de precipitado (precipitado floculoso, em pelo menos dois tubos é indicativo de alcaloides).

**Esteroides:** foi realizada a reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), misturando 2,0 mL de amostra a 2,0 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada em um funil com algodão coberto com sulfato de sódio anidro em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentaram-se três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado observando-se o desenvolvimento de cores: coloração azul seguida de verde permanente indica presença de esteroides livres.

**Flavonoides:** foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg). Adicionou-se a 2,0 mL de amostra, aproximadamente 0,5 cm de Mg em fita e 2,0 mL de HCl concentrado. O fim da reação é determinado pelo término da efervescência e pode ser considerado positivo se houver o aparecimento da cor vermelha. Além disso, para confirmação dos resultados, foi realizado o teste de alcalinização das amostras, utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3,0 mL da amostra em um tubo de ensaio, até pH 11,0 observando-se a mudança de cor. O aparecimento de cor amarela indica a presença de flavonas, flavonóis e xantonas e a coloração vermelho laranja a de flavonóis.

**Saponinas:** para determinação da presença de saponinas nas amostras foram misturados 2,0 mL de clorofórmio junto a 2,0 mL de extrato e 5,0 mL de água destilada. Em seguida, foi separada a fração aquosa e depois agitada para observação de uma possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas.

**Fenóis e Taninos:** para determinação da presença de taninos nas amostras, em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL de extrato foram adicionadas três gotas de FeCl<sub>3</sub>. Após forte agitação foi observada a mudança de cor ou formação de precipitado abundante. Coloração entre azul e vermelho indica presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

### 5.2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise dos constituintes voláteis foi realizada utilizando cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 series Ultra, utilizando software de tratamento de dados GCMS-QP2010 solution Ver. 2.6., coluna capilar 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) nas seguintes condições de injeção: split de 1:40, temperatura do injetor de 220°C, coluna de 60°C com taxa de aquecimento de 3°C/min até 240°C e detector à 250°C, sendo utilizado o hélio como gás de arraste, numa vazão de 1 mL/min. O detector seletivo de massas operou a 70 eV,  $m/z = 30$  a 500 u.m.a. A identificação foi realizada por meio do cálculo dos índices de retenção dos analitos, utilizando-se a coinjeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos (C8 a C22), comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-05) e com dados da literatura (ADAMS, 2007).

### 5.2.8 FORMULAÇÃO DO SABONETE LÍQUIDO

As matérias-primas utilizadas para formular o sabonete líquido íntimo foram: lauriletersulfato de sódio (24%), perolizante (surfax) (3%), cocoamidopropilbetaína (anfótero) (3%), dietanolamida de ácido graxo de coco (amida 90) (3%), propilenoglicol (3%), metilparabeno (0,15%), propilparabeno (0,05%), mentol cristal (0,3%), cloreto de sódio (solução 10 %) (q.s), água (q.s.p 100%) e EDTA (0,10%). A partir destes materiais foram elaboradas quatro formulações distintas: (i) Branco (sem antifúngico); (ii) com triclosan a 0,05%; com cetoconazol a 0,05%; e (iv) com óleo essencial de *A. canelilla* a 0,05%. As formulações foram preparadas pela mistura dos componentes a 40°C, sendo adicionados os ativos após o arrefecimento natural das amostras.

### 5.2.9 TESTES DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

As formulações foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar: estresse térmico e ciclo gela-degela, sendo monitorados os parâmetros organolépticos e físico-químicos (centrifugação, pH, condutividade, viscosidade, índice de espuma e densidade).

Estresse Térmico: As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos de poliestireno e submetidas ao aquecimento em estufa na faixa de temperatura de 40 a 80°C. O ensaio foi realizado com aumento da temperatura de  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  em  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , mantendo-se por 30 min. em cada temperatura (FERRARI, 1998; 2002). Após a submissão do teste foram avaliados novamente os parâmetros organolépticos e físico-químicos.

Ciclo Gela-Degela: as formulações permaneceram nas temperaturas padronizadas durante 12 dias. O 1º dia correspondeu às 24 h após o preparo das formulações. As amostras foram

submetidas a  $4\pm 2^\circ\text{C}/24\text{ h}$  em geladeira e  $45\pm 2^\circ\text{C}/24\text{ h}$  em estufa, completando-se assim, um ciclo. As leituras dos parâmetros foram realizadas ao final do 6º ciclo (FERRARI, 1998; 2002).

Centrifugação: 10 mL de amostra de sabonete líquido foram colocados em tubos de centrífuga e submetidos à 1000, 2500 e 3500 rpm, mantendo-se por 15 minutos em cada rotação. Avaliou-se de forma visual algum de tipo de alteração.

pH e condutividade: esses valores foram determinados inserindo-se o eletrodo diretamente na diluição aquosa 1:10 (p/p) das amostras homogeneizadas à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  (DAVIS, 1977). As leituras foram realizadas em triplicata para cada formulação.

Viscosidade: foi avaliada em um viscosímetro copo Ford, após a escolha do orifício apropriado de acordo com o tempo de interrupção de escoamento. Em seguida retirou-se a vedação e imediatamente acionou-se o cronômetro. Anotou-se o tempo, e utilizou-se a expressão adequada fornecida pelo fabricante, para o cálculo da viscosidade em centistokes.

Índice de espuma: aferido através de uma proveta de 100 mL colocando-se 5 mL de água destilada, solução de ácido acético (4%) e uma solução do sabonete líquido (1:10). Em seguida, colocou-se 5 mL solução de bicarbonato de sódio a 5%, fazendo-se com que produzisse bolhas, obtidas pela liberação de dióxido de carbono. Anotou-se o volume máximo de espuma formada e o total de volume para a relação de porcentagem (FILHA, 1999).

Densidade específica: foi utilizado picnômetro de 50 mL e uma balança analítica. Com a medida da massa, a densidade foi calculada de acordo com a relação massa/volume.

Parâmetros Organolépticos: foram avaliados cor, odor e aspecto, comparando as formulações após 24 h de sua elaboração e após os testes de estabilidade. Para esta avaliação, levou-se em conta a classificação em: normal, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (ANVISA, 2004).

#### 5.2.10 TESTE DE EFICÁCIA (ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO SABONETE LÍQUIDO)

Os ensaios foram realizados pela técnica de difusão em discos que permite a determinação de halo de inibição de crescimento para a substância em estudo (amostras do sabonete líquido). A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça, e os microrganismos foram transferidos para um tubo contendo solução salina. Ajustou-se a turbidez da cultura em crescimento com solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Colocou-se 100  $\mu\text{L}$  de suspensão da *C. albicans* nas placas de Petri já contendo o meio BDA arrefecido. Em seguida foram feitos furos de diâmetros de 6,0 mm no meio BDA. A cada furo foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada solução teste em estudo com concentração de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após

48 horas de incubação, foram examinadas as placas. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco.

#### 5.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados analisados foram submetidos ao teste t de Student para comparação entre duas médias independentes e emparelhadas, e a ANOVA (Análise de Variância) para comparação de mais de duas médias. Os dados foram tratados com o programa Biostat, Versão 5.0.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados de atividade antimicrobiana de extratos, partições e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* encontram-se na Tabela 17. De acordo com os dados obtidos, nenhum extrato ou partição a 2 mg/mL foi ativo frente aos microrganismos testados. Os fungos *Alternaria sp.* e *C. guaranicola* e as bactérias *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli* e *P. aeruginosa* também não sofreram inibição do crescimento na presença dos óleos essenciais de *A. canelilla*, indicando que essas amostras não apresentam substâncias antimicrobianas contra essas linhagens.

Para o fungo *A. brasiliensis* houve formação de halo de inibição na presença dos óleos essenciais das folhas e dos galhos de *A. canelilla*. Os óleos essenciais avaliados são considerados muito ativos frente a este fungo, uma vez que apresentaram halos de inibição maiores que 18 mm segundo a classificação de Alves *et al.* (2010). Resultado similar foi observado para o fitopatógeno *D. bryoniae* na presença dos óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla*.

Os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* também se mostraram muito ativos contra a levedura patogênica *C. albicans*. A alta atividade dos óleos essenciais de *A. canelilla* pode ser verificada quando se comparam os diâmetros dos halos de inibição do crescimento da levedura *C. albicans* (34,5-38,3 mm) frente à ação do cetoconazol usado como controle positivo (25,2 mm).



Tabela 17 - Atividade antimicrobiana de óleos essenciais, extratos e partições de folhas e galhos de *Aniba canelilla* obtida por difusão em ágar, expressa em média  $\pm$  desvio-padrão da média do diâmetro do halo de inibição (mm).

Amostra	<i>A. brasiliensis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>C. guaranicola</i>	<i>C. albicans</i>	<i>D. bryoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
OEF	28,5 $\pm$ 1,8	-	-	38,3 $\pm$ 2,6	22,8 $\pm$ 1,7	-	-	-	-
OEG	29,5 $\pm$ 2,0	-	-	34,5 $\pm$ 2,2	21,2 $\pm$ 2,1	-	-	-	-
EETF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EETG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FHAF	-	-	-	-	-	NR	NR	-	-
FHAG	-	-	-	-	-	NR	NR	-	-
FHXF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FHXG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FDF	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-
FDG	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-
CET	13,5 $\pm$ 1,4	14,2 $\pm$ 1,0	13,8 $\pm$ 1,2	25,2 $\pm$ 1,9	22,3 $\pm$ 2,2	NR	NR	NR	NR
AMOX	NR	NR	NR	NR	NR	42,0 $\pm$ 2,0	44,0 $\pm$ 2,0	38,0 $\pm$ 2,1	20,0 $\pm$ 1,6

OEF – Óleo essencial das folhas; OEG - Óleo essencial dos galhos; EETF – Extrato etanólico das folhas; EETG – Extrato etanólico dos galhos; FHAF – Fase hidroalcoólica das folhas; FHAG - Fase hidroalcoólica dos galhos; FHXF – Fase hexânica das folhas; FHXG - Fase hexânica dos galhos; FDF – Fase diclorometano das folhas; FDG – Fase diclorometano dos galhos; CET – Cetoconazol (2 mg/mL); AMOX – Amoxicilina + Ácido Clavulânico (2 mg/mL); NR - Não realizado; (-) Não apresenta halo de inibição do crescimento microbiano.

Oger *et al.* (1994), ao analisarem os óleos essenciais e extratos hexânicos das cascas do tronco de *A. canelilla*, relataram a existência de atividade fungistática contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Aspergillus fumigatus*. A atividade antifúngica encontrada foi atribuída à toxicidade do 1-nitro-2-feniletano contra leveduras, especialmente contra *C. albicans* (MIC: 170 µg/mL), enquanto que *A. fumigatus* foi mais resistente (MIC: 1500 µg/mL). Os resultados encontrados no presente estudo (Tabela 17) corroboram os de Oger *et al.*, tendo em vista a atividade dos óleos essenciais contra *C. albicans*. Nota-se ainda que os óleos foram ativos também para o *A. brasiliensis*, assim como para o *A. fumigatus*, no estudo de Oger *et al.*

### 5.3.2 ANÁLISE DAS CLASSES QUÍMICAS PRESENTES NOS EXTRATOS, PARTIÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise fitoquímica preliminar dos extratos etanólicos, partições e óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* revelou a presença de fenóis, taninos, flavonoides e alcaloides. Dentre as cinco classes de metabólitos secundários avaliados, a única que não está presente é a classes das saponinas. Os resultados dos ensaios podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18 - Análise fitoquímica dos extratos, partições e óleos essenciais de folhas e galhos de *Aniba canelilla*.

Classe de Metabólitos	EBG	EBF	FHG	FHF	FDF	FDG	HAF	HAG	OEG	OEF
Fenóis	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Esteroides	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+

EBG = Extrato Bruto Galhos; EBF = Extrato Bruto Folhas; FHG = Fase Hexânica Galhos; FHF = Fase Hexânica Folhas; FDF = Fase Diclorometano Folhas; FDG = Fase diclorometano Galhos; HAF = Fase Hidroalcoólica Folhas; HAG = Fase Hidroalcoólica Galhos; OEG = Óleo Essencial Galhos; OEF = Óleo Essencial Folhas; + presença; - ausência.

O teste realizado para fenóis e taninos forneceu uma coloração escura e azulada, decorrente da formação de complexos coloridos com o íon  $Fe^{+3}$ , indicando a presença de taninos hidrolisáveis em todos os extratos, partições e óleos essenciais. Os taninos são compostos polifenólicos solúveis

em água e em solventes orgânicos polares. Plantas que apresentam taninos em sua composição química tendem a ser utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, problemas no estômago e inflamações (SANTOS e MELLO, 1999). São utilizadas também como antioxidantes em sucos e refrigerantes pela indústria alimentícia por possuírem ação sequestradora de radicais livres (SANTOS e MELLO, 2004) e ação protetora contra danos ao DNA (BARNEJEE *et al.*, 2005). De acordo com Simões (2003), a atividade antimicrobiana observada em plantas está diretamente relacionada com a presença de taninos, uma vez que ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (MONTEIRO *et al.*, 2005). Estes compostos possuem ação comprovada no tratamento de mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus* (HIGINO *et al.*, 2015), e são responsáveis, junto com os flavonóides, pela atividade antimicrobiana do suco de romã (TÜRKYILMAZ *et al.*, 2013).

No teste para determinação da presença de flavonoides os óleos essenciais e o extrato bruto de folhas apresentaram uma coloração vermelha parda ao reagirem com magnésio em meio ácido, indicando a presença de moléculas que contêm o núcleo benzopirona na sua estrutura química (MARTINEZ, 2005). Para o teste em que se utilizou NaOH, o extrato etanólico dos galhos apresentou uma coloração vermelha alaranjada, indicativo da presença de flavonóis. Para o extrato proveniente das folhas observou-se uma coloração amarelada, indicativo da presença de flavonas, flavonóis e xantonas. Os flavonoides são substâncias com núcleo fenólico que possuem alto poder de captação de espécies reativas de oxigênio (EROs) agindo como importantes agentes antioxidantes, capazes de inibir e retardar a oxidação de lipídios e alguns danos causados às células (CHANWITHEESUK *et al.*, 2005). Além disso, esses metabólitos secundários fornecem às plantas ação anti-inflamatória, antialérgica, anti-hemorrágica, antimutagênica e antiespasmódica (WOLLENWEBER *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2001; ZUANAZZI e MONTANHA, 2004; AMARAL *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

A atividade antimicrobiana dos flavonoides é amplamente reportada na literatura. As propriedades curativas do própolis, utilizado há muitos séculos no tratamento de feridas, foram atribuídas principalmente aos flavonoides galangina e pinocembrina (CUSHNIE e LAMB, 2005). A presença de rutina no mel da abelha sem ferrão *Melipona compressipes manausensis* foi descrita como uma das responsáveis pela sua atividade microbiana (PIMENTEL *et al.*, 2013). Os flavonóides possuem capacidade de inibir a germinação de esporos fúngicos, sendo reportados como potentes antifúngicos (SALAS *et al.*, 2011). A atividade antifúngica deve-se provavelmente à capacidade destes compostos em formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas, bem como pela natureza lipofílica dos flavonóides, capaz de romper as membranas dos fungos (ARIF *et al.*, 2011; SALAS *et al.*, 2011). A atividade antifúngica de flavonas purificadas a

partir de cinco diferentes plantas medicinais da família Moraceae foram descritas por Arif *et al.* (2011) como potentes antifúngicos contra *C. albicans*.

A presença de alcaloides em plantas de uso medicinal provoca o estímulo do sistema nervoso central e ação antiviral, anestésica, antimalárica e antitumoral. Porém, estas substâncias podem gerar dependência de uso, e normalmente apresentam alta toxicidade (BARBOSA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010). Dentre as amostras avaliadas, verificou-se a presença de alcaloides no extrato bruto de folhas e nas fases hexânicas de folhas e galhos de *A. canelilla*.

A presença de esteroides foi verificada nos óleos essenciais e nas partições de folhas e galhos de *A. canelilla*. Os esteroides são substâncias bastante abundantes e fazem parte de um grupo fitoquímico proveniente de metabólitos dos triterpenos. Inclusas nos grupos dos esteroides, estão as saponinas, outra classe de metabólitos que possui atividade antifúngica, inclusive para variações de *Candida* sp. (BRUNETON, 1999). Taleb-Conbtini *et al.* (2003) reportaram atividade contra bactérias gram-positivas de esteóides isolados dos extratos de duas espécies de *Chromolaena*. Em outro estudo, Santos *et al.* (2010) também relatam a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas de óleos essenciais de folhas de sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*), das quais foi isolada uma mistura de fitoesteróides ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol).

Segundo Matos (1997), a diferença na presença de algumas classes de metabólitos em plantas da mesma espécie está relacionada a fatores como o clima, solo, temperatura e forma de coleta do material. Outro fato interessante é a influência da concentração dos metabólitos secundários nos resultados, podendo apresentar falsos negativos quando a concentração é muito baixa em relação aos demais metabólitos da amostra.

### 5.3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba canelilla*

A composição química do óleo essencial de folhas e galhos de *A. canelilla* está apresentada na Tabela 19.

Análises de CG/EM do óleo essencial obtido a partir da hidrodestilação das folhas e galhos de *A. canelilla* permitiu detectar 22 substâncias diferentes, sendo 20 constituintes do óleo das folhas e 11 constituintes dos galhos. Estes constituintes foram identificados por meio da comparação dos seus espectros de massa com espectros da literatura, e com da espectroteca eletrônica e seus índices de retenção obtidos por comparação com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares, não sendo possível identificar 2 dos constituintes dos óleos essenciais de *A. canelilla* usando esses métodos.

Tabela 19 - Composição química do óleo essencial de folhas e galhos de *Aniba canelilla*.

Picos	Moléculas	IR	Folhas (%)	Galhos (%)	Identificação
1	Butanoato de etila	800	3,10	3,10	a,b
2	Etilbenzeno	823	0,28	0,22	a,b,c
3	$\alpha$ -pineno	859	0,62	0,60	a,b,c
4	Benzaldeído	875	0,63	-	a,b
5	$\beta$ -pineno	886	0,24	-	a,b,c
6	Limoneno	1027	0,35	0,65	a,b
7	Fenilacetaldéido	1043	0,88	0,99	a,b,c
8	Linalol	1100	0,52	0,83	a,b
9	$\alpha$ -terpineol	1190	0,44	0,56	a,b,c
10	1-nitro-2-feniletano	1304	87,03	90,32	a,c
11	Eugenol	1357	-	0,85	a,b
12	$\alpha$ -copaeno	1375	0,36	-	a,b
13	Z-cariofileno	1406	1,10	-	a,b
14	Cariofileno	1418	1,12	-	a,b
15	$\alpha$ -cariofileno	1453	0,38	-	a,b
16	$\beta$ -selineno	1485	0,69	-	a,b,c
17	$\alpha$ -selineno	1493	0,64	-	a,b,c
18	$\beta$ -bisaboleno	1508	0,65	0,95	a,b,c
19	Óxido de cariofileno	1582	0,68	-	a,b
20	$\alpha$ -muurolol	1644	-	0,91	a,b,c
21	$\alpha$ -cadinol	1654	0,26	-	a,b,c
22	ni	1657	0,32	-	
	Hidrocarbonetos monoterpênicos		1,22	1,25	
	Monoterpenos oxigenados		0,96	1,41	
	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		5,63	0,95	
	Sesquiterpenos oxigenados		0,26	0,91	
	Componentes aromáticos		92,06	95,49	
	ni		0,32	-	
	Total (%)		100	100	

<sup>a</sup>A Identificação foi baseada pelo IR (Índice de retenção) determinado em uma coluna capilar HP-5MS utilizando uma série homóloga de n-hidrocarbonetos (índice Kovats). <sup>b</sup>A Identificação foi baseada na comparação dos espectros de GC-MS e IR com aqueles da biblioteca NIST e aqueles descritos por Adams (2007). <sup>c</sup>A identificação foi baseada na comparação com o IR descritos por Babushok *et al.*, (2011) e os disponibilizados no banco de dados online "The pherobase". ni - não identificado.

No óleo essencial de *A. canelilla* os componentes aromáticos voláteis foram os mais predominantes compondo até 92,06% do óleo das folhas e 95,49% do óleo dos galhos, devido à alta concentração da molécula 1-nitro-2-feniletano nos óleos essenciais desta planta.

Hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, e monoterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados são outros grupos de moléculas encontrados nos óleos das folhas e dos galhos.

A maioria dos constituintes identificados está de acordo com o que tem sido descrito na literatura, onde a molécula de 1-nitro-2-feniletano é identificada como o principal componente do óleo essencial desta espécie (LIMA *et al.*, 2004, MANHÃES *et al.*, 2012). Outros compostos aromáticos voláteis também foram identificados nos óleos estudados, como o etilbenzeno, benzaldeído, fenilacetaldéido e eugenol, os quais também foram identificados no óleo essencial desta mesma espécie em dois estudos anteriores (OGER *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2004), indicando serem compostos característicos do óleo essencial de *A. canelilla*. É importante ressaltar que estes compostos não são comuns na maioria das plantas produtoras de óleos essenciais, pois possuem uma rota de síntese diferente da dos terpenos.

O cariofileno é um sesquiterpenóide de ocorrência comum em muitos óleos essenciais. Ocorre na natureza como mistura dos isômeros isocariofileno,  $\alpha$ -cariofileno (humuleno) e  $\beta$ -cariofileno. O  $\beta$ -cariofileno possui efeito espasmolítico, anestésico local e antiinflamatório (MARTIN *et al.*, 1993). No trabalho realizado por Pedrosa (2012), o óleo essencial bruto de *Ocimum tenuiflorum*, com 18,86% de trans-cariofileno em sua composição, foi eficiente contra *C. albicans* e *S. aureus*.

De acordo com trabalho realizado por Laohaprasit *et al.* (2011), é possível notar que compostos sesquiterpênicos como o cariofileno podem ser extraídos por solventes orgânicos como hexano e diclorometano, ou seja, é possível que nos extratos obtidos existam quantidades significativas desses metabólitos, que conferem a estes capacidade antioxidante, observada nos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2012; MARTINS *et al.*, 2016).

Duarte *et al.* (2005) investigaram óleos essenciais e extratos etanólicos obtidos de 35 plantas medicinais comumente usadas no Brasil para atividade anti *C. albicans*. Os óleos essenciais de 13 plantas mostraram atividade anti *Candida* incluindo *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon martinii*, *C. winterianus*, *Cyperus articulatus*, *C. rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *M. piperita*, *Mentha sp.*, *Mikania glomerata*, *Stachys byzantina* e *Solidago chilensis* com concentrações mínimas inibitórias de 0,25 a 2,0 mg/mL. Portanto, considerando os resultados encontrados no presente estudo, verifica-se que a *A. canelilla* pode ser incluída na lista de espécies com atividade anti *C. albicans*.

#### 5.3.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os resultados de citotoxicidade de óleos essenciais, extratos e partições de folhas e galhos de *A. canelilla* estão expressos na Tabela 20. Não se verificou diferença significativa em nenhum dos

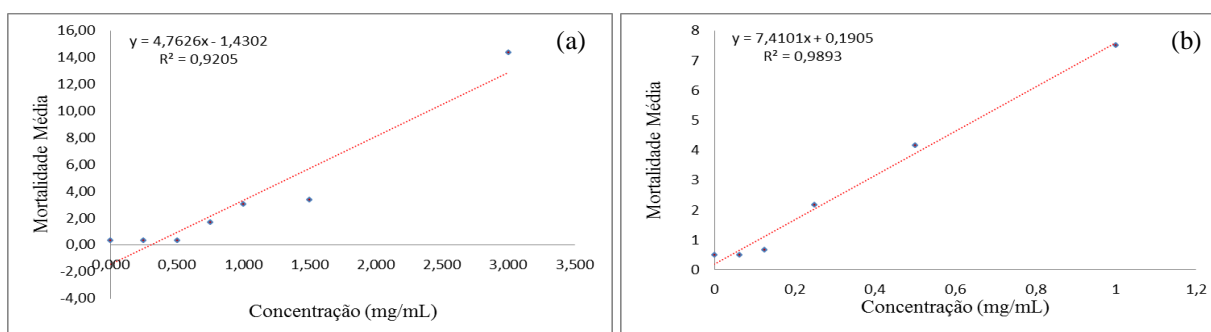
grupos, logo se pode afirmar que o surfactante e o solvente utilizados, respectivamente, na diluição dos óleos essenciais e dos extratos não foram os responsáveis pela mortalidade dos microcrustáceos.

Tabela 20 - Concentração de letalidade média (CL<sub>50</sub>) dos metabólitos de *Aniba canelilla* frente à *Artemia salina*.

Amostras	CL <sub>50</sub> (mg/mL)
Extrato Etanólico das Folhas	1,8751
Extrato Etanólico dos Galhos	0,9476
Fase Hexânica das Folhas	4,5751
Fase Hexânica dos Galhos	11,359
Fase Hidroalcoólica das Folhas	3,2074
Fase Hidroalcoólica dos Galhos	0,8545
Óleo Essencial das Folhas	0,4787
Óleo Essencial dos Galhos	0,4815

O teste do extrato etanólico das folhas foi realizado com uma concentração inicial de 3 mg/mL, devido a pouca atividade apresentada pelo extrato. A CL<sub>50</sub> igual a 1,8751 mg/mL indica que a solução não apresenta atividade citotóxica (MEYER *et al.*, 1982). O coeficiente de determinação obtido no gráfico da Figura 48a demonstra que 92% da mortalidade observada pode ser explicada pelo aumento da concentração da substância avaliada.

Figura 48 - Gráfico de mortalidade de *Artemia salina* exposta aos extratos etanólicos das folhas (a) e dos galhos (b) de *Aniba canelilla*.

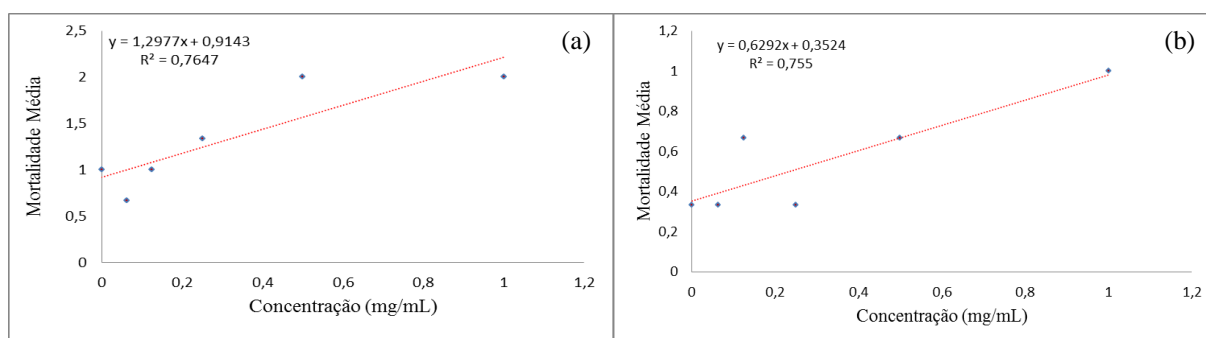


Para os extratos etanólicos dos galhos (Figura 48b), a concentração inicial utilizada foi de 1 mg/mL, pois este apresentou maior índice de mortalidade que o extrato das folhas. A CL<sub>50</sub> de

0,9476 mg/mL indica que a solução apresentou atividade citotóxica (MEYER *et al.*, 1982). Pela análise do  $R^2$ , os resultados de mortalidade apresentaram alta correlação nas condições utilizadas.

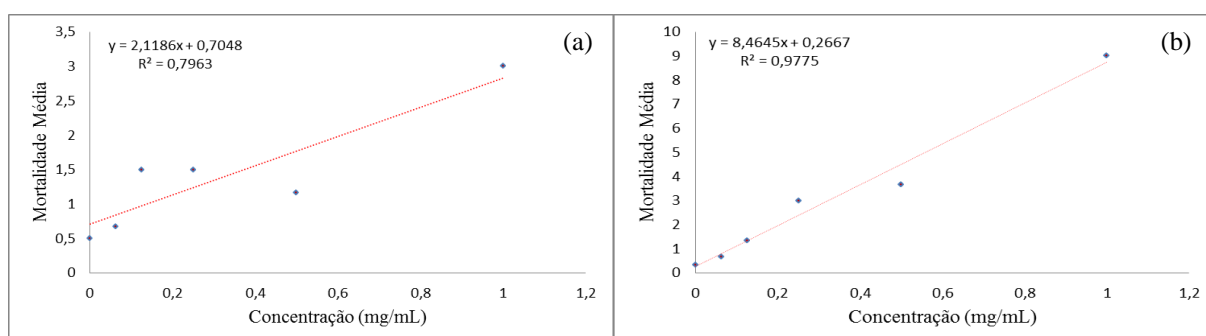
Os resultados obtidos para as fases hexânicas (Figura 49) apresentaram linearidade e baixa mortalidade para todas as concentrações testadas. Nota-se que não houve grande alteração na mortalidade entre os testes de maior concentração e menor concentração. Logo, a fase hexânica não apresentou substâncias com alta citotoxicidade nas condições analisadas. As  $CL_{50}$  de 4,5751 mg/mL para a fase das folhas e de 11,359 mg/mL para a dos galhos confirma a ausência de citotoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

Figura 49 - Gráfico de mortalidade de *Artemia salina* exposta às fases hexânicas das folhas (a) e dos galhos (b) de *Aniba canelilla*.



Os gráficos obtidos para as fases hidroalcoólicas estão apresentados na Figura 3. A  $CL_{50}$  de 3,2074 mg/mL para a fase hidroalcoólica de folhas indica que a solução não apresentou atividade citotóxica (Meyer *et al.*, 1982). Pela análise do  $R^2$  a mortalidade teve boa correlação com as concentrações analisadas, sendo próxima a 80% (Figura 50a).

Figura 50 - Gráfico de mortalidade de *Artemia salina* exposta às fases hidroalcoólicas das folhas (a) e dos galhos (b) de *Aniba canelilla*.



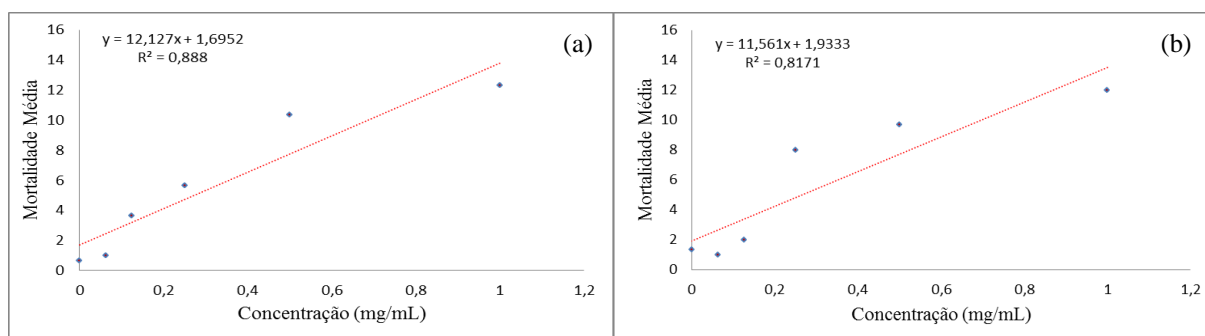


Para a fase hidroalcoólica dos galhos (Figura 50b) foi observada excelente reprodutibilidade entre as réplicas, demonstrando também alta linearidade entre as variáveis. A  $CL_{50}$  igual a 0,8545 mg/mL indica que, segundo Meyer *et al.* (1982) a solução apresenta atividade citotóxica. A alta linearidade indica alta correlação entre a mortalidade e as concentrações utilizadas, tendo-se um coeficiente de determinação de aproximadamente 98%.

Os testes realizados com os óleos essenciais apresentam resultados semelhantes aos das soluções da fase hexânica, com boa linearidade e alta taxa de mortalidade para as concentrações utilizadas. Segundo estudo realizado anteriormente em nosso grupo de pesquisa, soluções do hidrolato (resíduo líquido da hidrodestilação) de *A. canelilla* mostraram atividade citotóxica frente à *A. salina* com  $CL_{50}$  igual a 0,572 mg/mL (SILVA, 2012). Logo, esperava-se que os óleos essenciais também apresentassem atividade citotóxica.

Os gráficos obtidos para as soluções dos óleos essenciais das folhas e dos galhos de *A. canelilla* podem ser observados na Figura 51. As  $CL_{50}$  foram de 0,4787 mg/mL para os óleos extraídos de folhas e de 0,4815 mg/mL para os de galhos. Portanto, segundo Meyer *et al.* (1982), as soluções apresentam atividade citotóxica. Os valores de  $R^2$  foram superiores a 80%, indicando correlação entre a mortalidade e as concentrações utilizadas.

Figura 51 - Gráfico de mortalidade de *Artemia salina* exposta aos óleos essenciais das folhas (a) e dos galhos (a) de *Aniba canelilla*.



Assim como observado no presente estudo, Silva *et al.* (2007) verificou que o óleo essencial extraído da madeira do troco de *A. canelilla* foi ativo contra *Artemia salina*. O autor também observou que os extratos metanólicos da madeira foram igualmente ativos, porém com concentração letal quatro vezes maior.

### 5.3.5 DESENVOLVIMENTO DO SABONETE LÍQUIDO ÍNTIMO

Tendo em vista a atividade antifúngica observada nos óleos essenciais de *A. canelilla*, e o potencial dessa atividade biológica no desenvolvimento de cosméticos, foi formulado um sabonete

líquido íntimo. Vale ressaltar que fitocosméticos elaborados com óleo essencial de preciosa apresentam um caráter inovador, uma vez que essa planta ainda não foi utilizada pela indústria de cosméticos.

Na Tabela 21 estão apresentados os valores dos parâmetros físico químicos resultantes das formulações dos sabonetes líquidos e a análise estatística correspondente.

Tabela 21 - Parâmetros físico-químicos das formulações de sabonetes líquidos.

Parâmetro		Controle	Óleo Essencial	Triclosan	Cetoconazol
Densidade (g/mL)	(a)	1,033 ± 0,005	1,030 ± 0,004	1,036 ± 0,002	1,033 ± 0,003
	(b)	1,035 ± 0,001	1,036 ± 0,001	1,037 ± 0,002	1,037 ± 0,001
	(c)	1,105 ± 0,001*	1,105 ± 0,002*	1,105 ± 0,001*	1,103 ± 0,001*
pH	(a)	7,423 ± 0,037	7,110 ± 0,038	7,243 ± 0,061	7,177 ± 0,055
	(b)	7,533 ± 0,024*	7,402 ± 0,010*	7,423 ± 0,076*	7,463 ± 0,046*
	(c)	7,527 ± 0,024*	7,490 ± 0,017*	7,525 ± 0,023*	7,457 ± 0,033*
Condutividade (mS/cm <sup>3</sup> )	(a)	64,450 ± 11,825	57,017 ± 9,754	75,883 ± 8,371	67,267 ± 11,285
	(b)	55,017 ± 6,996	61,200 ± 7,275	78,370 ± 6,466*	67,267 ± 11,285
	(c)	61,533 ± 7,417	64,933 ± 4,422	62,200 ± 5,861	66,033 ± 5,126
Índice de Espuma (%)	(a)	75,360 ± 1,425	77,423 ± 6,507	74,202 ± 1,418	79,984 ± 3,311
	(b)	77,930 ± 4,549	79,190 ± 7,735	78,368 ± 6,466	79,984 ± 8,956
	(c)	65,236 ± 6,405*	54,420 ± 2,692*	62,023 ± 8,394	58,656 ± 7,072*
Viscosidade (mm <sup>2</sup> /s-cSt)	(a)	718,498 ± 10,251	715,685 ± 13,015	729,993 ± 7,746	712,781 ± 11,150
	(b)	-	-	-	-
	(c)	770,558 ± 5,941*	780,904 ± 2,301*	795,515 ± 9,778*	781,993 ± 22,675*
Centrifugação	(a)	2	1	2	3
	(b)	1	2	1	3
	(c)	1	2	1	3

(a) = Após a formulação, (b) = Estresse Térmico, (c) = Ciclo Gela Degela, 1 = Normal, 2 = Pouco sedimentado, 3 = Sedimentado, - = Sem análise, \* = Diferença significativa em relação à formulação Branco, pelo teste t.

Os dados observados mostram que houve diferença na viscosidade e no índice de espuma durante o estudo de estabilidade, contudo a diferença não foi significativa entre as diferentes formulações. Pianovski (2008) afirma que a viscosidade e a produção de espuma são parâmetros muito valorizados pelos consumidores, devido a impressão de maior concentração que os sabonetes líquidos mais viscosos e que produzem mais espuma passam. Entretanto, estes

parâmetros não estão relacionados com o poder de limpeza ou maior rendimento do produto. De acordo com os resultados obtidos, o parâmetro viscosidade apresentou alteração quando submetido ao teste ciclo gela degela, e tal fato pode ser explicado pela evaporação da água resultante do tempo exposto à temperatura da estufa (ISAAC *et al.*, 2008).

Na avaliação do índice de espuma não se constatou alteração após o teste de estresse térmico. Para o ciclo gela degela observou-se alteração em todas as formulações, menos para a formulação com o antifúngico triclosan, única formulação que se mostrou estável com respeito a este teste. A espuma, assim como a viscosidade, não tem influência no poder de limpeza, porém, comercialmente é importante e dependendo da aplicação do detergente pode tornar-se fator decisivo para a compra (AMARAL, 2007).

A densidade é um parâmetro farmacopéico de controle de qualidade, sendo justificado seu uso quando há um valor já esperado, que possibilite comparação dos limites aceitáveis, já que valores fora desta faixa podem indicar alterações na composição dos sabonetes (ISAAC *et al.*, 2008). Para este trabalho a densidade mostrou-se inalterada após o teste de estresse térmico. As formulações, quando submetidas ao ciclo gela degela, apresentaram diferenças significativas quando comparadas às formulações recém formuladas. Tal fato também pode ser explicado pela evaporação da água contida nas formulações. Com a perda da água há variação de volume e massa, tendo em vista que existe grande quantidade de água na formulação, e a densidade está diretamente relacionada com tais parâmetros.

Os valores de pH observados mantiveram-se constantes durante os estudos de estabilidade. De acordo com Lima (2008) e a Anvisa (2004), apesar do valor do pH não ser uma medida tão sensível à instabilidade quando comparado à condutividade elétrica, a alteração desta podem indicar um processo de instabilidade entre os ingredientes, e tal instabilidade pôde ser observada tanto após o ciclo gela degela como após o teste de estresse térmico. O aumento do pH em uma formulação antifúngica, pode tornar o produto ineficiente, tendo em vista que os microrganismos tornam-se mais ou menos resistentes de acordo com o pH. Assim, um aumento do pH no sabonete líquido, pode favorecer a proliferação da *Cândida* e outros patógenos, além de causar irritabilidade da mucosa ocasionada pela alcalinidade (CAMPOS, 2013). Segundo Bernardis (1998), o pH vaginal é em torno de 4,5, sendo necessária a verificação da interação do pH com a instabilidade da formulação de acordo com o pH da região de uso, já que o pH resultante das formulações elaboradas neste estudo foi neutro.

Para a condutividade elétrica verificou-se uma diminuição significativa apenas para a formulação contendo triclosan. Essa alteração pode estar relacionada com a agregação das partículas e o aumento da coalescência, alterando a estabilidade da formulação (ANVISA, 2004).

Os resultados obtidos com o teste de centrifugação não foram satisfatórios, já que se observou decantação, apesar das formulações apresentarem aspectos homogêneos e boa incorporação dos princípios ativos, sendo necessários estudos mais detalhados dos componentes da formulação.

Na Tabela 22 estão apresentados os resultados obtidos para os parâmetros organolépticos.

Tabela 22 - Parâmetros organolépticos observados nas formulações de sabonetes líquidos.

Parâmetro		Controle	Óleo Essencial	Triclosan	Cetoconazol
Cor	(a)	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
		Translúcido	Translúcido	Translúcido	Translúcido
	(b)	L	L	L	L
	(c)	M	M	M	M
Odor	(a)	Menta	Menta	Menta	Menta
	(b)	N	N	N	N
	(c)	N	N	N	N
Aspecto	(a)	Perolado e Viscoso	Perolado e Viscoso	Perolado e Viscoso	Perolado e Viscoso
	(b)	M	M	M	M
	(c)	I	I	I	I

(a) = Após a formulação, (b) = Estresse Térmico, (c) = Ciclo Gela Degela, N = Normal sem alteração, L = Levemente modificado, M = Modificado e I = Intensamente modificado.

Segundo a Anvisa (2002) o produto deve manter-se íntegro durante todo o teste de estabilidade, mantendo seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos em que pequenas alterações são aceitáveis. Nos resultados obtidos para os parâmetros organolépticos, verificaram-se alterações no aspecto para o teste de estresse térmico e para o ciclo gela degela, neste último mais significativo. Na análise do odor observou-se que nos dois testes aplicados não ocorreu nenhuma alteração perceptível. Para a cor verificou-se que a tendência foi ficar mais transparente, possivelmente devido à degradação do Surfax com a temperatura (GARCIA *et al.*, 2009).

Após a formulação do sabonete líquido, foi realizado um ensaio de atividade antifúngica do fitocosmético frente à *C. albicans*. Os resultados mostram que mesmo incorporado ao sabonete líquido, os ativos mantiveram-se intactos pois verificaram-se halos de inibição do crescimento fúngico para todos os sabonetes formulados, inclusive para o óleo essencial na concentração de 2

$\mu\text{g/mL}$  (controle positivo). Dessa forma, verificou-se a compatibilidade do ativo antifúngico, mesmo após a interação com os demais componentes cosméticos. Para a formulação “controle negativo”, não se constatou atividade antifúngica, mesmo com o conservante microbiano empregado.

#### **5.4 CONCLUSÃO**

Os óleos essenciais obtidos de folhas e galhos finos de *A. camelilla*, constituídos por componentes aromáticos voláteis, monoterpenos e sesquiterpenos, apresentam potencial antifúngico, principalmente contra as leveduras do gênero *Candida*. Após a interação com os componentes da formulação cosmética, os óleos essenciais mantiveram a atividade antifúngica no sabonete líquido. Entretanto, os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade citotóxica, e estudos mais abrangentes devem ser realizados a fim de se conhecer a concentração indicada e segura para uso em cosméticos. A partir da formulação apresentada através dos testes empregados e análise de estabilidade, observou-se instabilidade entre alguns componentes da formulação, principalmente após o ciclo gela degela, sendo necessário o ajuste do pH e otimização da formulação proposta.

## Capítulo 6

---

### Conclusão

## 6 CONCLUSÃO GERAL

A partir da pesquisa realizada com os óleos essenciais, extratos etanólicos e partições de folhas e galhos de *A. canelilla* verificou-se a presença de biomoléculas capazes de inibir os processos de oxidação demonstrados pelo sequestro do radical livre DPPH e pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Os óleos essenciais não apresentaram atividade antioxidante, e dentre os extratos, a fase hidroalcoólica de folhas e de galhos obtidos do período da seca apresentaram os melhores percentuais de inibição do radical livre DPPH e de proteção da oxidação do ácido linoleico.

Os ensaios *in vitro* para avaliar o fator de proteção solar (FPS) demonstraram que os extratos etanólicos, as fases hexânicas, diclorometânicas e hidroalcoólicas, e os óleos essenciais das folhas e galhos apresentam ótimos valores de FPS, com alta absorção no UVB, sendo os mais ativos, as fases diclorometânicas obtidas de folhas e galhos, apresentando altos valores de FPS a 0,1% em solução.

Para a atividade antimicrobiana, dentre todos os componentes obtidos de folhas e galhos, apenas os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica contra *Didymella bryoniae*, *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*, apresentando inibição significativa do crescimento fúngico. Os extratos etanólicos e suas partições não foram ativos contra as cepas testadas.

Para a atividade citotóxica, os óleos essenciais foram os que apresentaram maior atividade, com  $CL_{50}$  abaixo do valor de referência (1,0 mg/mL). Os extratos e as partições apresentaram  $CL_{50}$  próximas ou superiores ao valor de referência, sendo considerados não citotóxicos. Os dados apresentados demonstram a necessidade de maiores investigações quanto ao tipo de toxicidade que os óleos essenciais de *A. canelilla* podem apresentar às células humanas.

De acordo com a triagem fitoquímica, foram detectados compostos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides e esteroides nos óleos essenciais, extratos etanólicos e partições de folhas e galhos de *A. canelilla*. A atividade antioxidante e o FPS presente nos extratos foram atribuídos aos compostos fenólicos e flavonoides, que são as classes de substâncias mais reportadas neste quesito. As atividades antimicrobiana e citotóxica foram atribuídas aos hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, além de hidrocarbonetos aromáticos nitroderivados oriundos da fenilalanina.

As substâncias ativas dos extratos foram extraídas por maceração a frio, seguido de partição líquido-líquido e isoladas com o auxílio das técnicas cromatográficas, CCD, CCA e CLAE e caracterizadas por Espectrometria de Massas. Para a atividade antioxidante, as biomoléculas ativas isoladas foram o ácido protocatecuico e a luteolina, encontradas nos extratos da fase hidroalcoólica das folhas e dos galhos, respectivamente. Para o FPS, as biomoléculas isoladas que apresentaram as maiores atividades foram o ácido cinâmico e o ácido siríngico, obtidas dos extratos das fases

diclorometânicas de folhas e galhos, respectivamente. Para a atividade antifúngica observada, supõe-se que o principal componente ativo seja o composto majoritário 1-nitro-2-feniletano, identificado por CG-EM, com possível sinergismo de outras substâncias presentes no óleo, como o cariofileno.

Os resultados obtidos demonstraram que *Aniba canelilla* possui componentes orgânicos nos extratos e nos óleos essenciais que podem ser incorporados em formulações cosméticas, atribuindo atividades biológicas de interesse. Para a atividade antioxidante foram formuladas emulsões contendo as fases hidroalcoólicas de folhas e galhos que podem substituir o BHT, composto comumente utilizado como antioxidante em cosméticos. Considerando o FPS, foram formuladas emulsões contendo a fase diclorometânica de folhas e galhos que podem potencializar o efeito de proteção contra UVB. Já a atividade antimicrobiana orientou a elaboração de um sabonete líquido íntimo que, após teste de eficácia, foi ativo também contra *C. albicans*. Os fitocosméticos elaborados mostraram-se promissores na continuidade do estudo de suas formulações, apresentando compatibilidade química entre seus componentes.

Sendo assim, este trabalho apresenta base científica para outros trabalhos que visem o uso dos recursos naturais amazônicos e a incorporação de produtos naturais em formulações cosméticas.



## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, L. S.; MOREIRA A. M.; MOURA L. H.; GAVAZZONI M. F. R.; ADDOR, F. A. S. Tratamentos estéticos e cuidados dos cabelos: uma visão médica. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 1, n. 4, p. 178-185, 2009.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing**. 804 p. 2007.
- AHLENSTIEL, T.; BURKHARDT, G.; KÖHLER, H.; KUHLMANN, M. K. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. **Kidney international**, v. 63, n. 2, p. 554-563, 2003.
- AL-GHAZZEWI, F. H.; TESTER, R. F. Impact of prebiotics and probiotics on skin health. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 2, p. 99-107, 2014.
- AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M; BESSA, W.S.; BARNES, R.A.; KAPLAN, M.A.C.; WESSJOHANN, L.A. Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 653-654, 2001.
- AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S, BARBOSA-FILHO, J. M.; REIS, A. A.; NASCIMENTO, F. R. F.; MACEDO, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 696-720, 2006.
- AMARAL, F. P. **Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart)**. 52f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 2007.
- ANDERSON, J. E. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreena. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p.107-111, 1991.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacterianas e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kunt e *Croton blanchetianus* Baill**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde Tecnologia Rural. Universidade Federal de Campina Grande. Patos. Paraíba. 2011.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Série: Qualidade. v. 1, Anvisa, 1 ed., Brasília, 2004.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos.** Anvisa. 1 ed. 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de boas práticas em pesquisa e desenvolvimento para a indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. 36 p. Anvisa, 1 ed. 2007.

ANVISA. Resolução - **RDC** N° 30 de 1° de junho de 2012. Disponível em: <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC-30.pdf> acesso em: 09/11/2016.

ARAÚJO, A. I. F.; LIMA, E. P.; SILVA, G. A.; SANTOS, O. H.; SOARES, T. F. **Plantas nativas do Brasil empregadas em Fitocosmética.** X Jornada de ensino, pesquisa e extensão. JEPEX. UFRPE: Recife, 2010.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática.** 3.ed. Minas Gerais: UFV, 1995.

ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia plena**, v. 4, n. 11, 2008.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 40, n. 4. 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. Ultraviolet radiation protection: current available resoucers in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732-742, 2011.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. A. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.

BANHOS, E. F. **Atividade antimicrobiana de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) e seus fungos endofíticos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 99 p. 2011.

BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Antiinflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 16, n.1, p. 109-34, 2006.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 414 p. 2010.

BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymology**, v. 299, p. 15-27. 1999.

BERNARDIS, F.; MÜHLSCHLEGEL, F. A.; CASSONE, A.; FONZI, W. A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3317-3325, 1998.

BERTHELE, H.; SELLA, O.; LAVARDE, M.; MIELCAREK, C.; PENSE-LHERITIER, A. M.; PIRNAY, S. Determination of the influence of factors (ethanol, pH and aw) on the preservation of cosmetics using experimental design. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 1, p. 54-61, 2014.

BITTENCOURT, A. M. B.; COSTA, V. G.; BIZZO, H. R. Avaliação da qualidade de detergentes a partir do volume de espuma formado. **Química Nova na Escola**, n. 9, p. 43-45. 1999.

BOBIN, M. F., RAYMOND, M., MARTINI, M. C., Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. **Cosmetics and toiletries**, v. 7, p. 44-50, 1995.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetic and Toiletrie**, v. 109, p. 63-78, 1994.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 209-215, 1999.

BOOTS THE CHEMISTS Ltd. (England). **The Revised guidelines to the practical measurement of UVA: UVB ratios according to the boots star rating system**. Nottingham: The Boots CO PLC, 2004.

BORELLA, J. C.; RIBEIRO, N. S.; TEIXEIRA, J. C. L.; CARVALHO, D. M. A. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193-197. 2010.

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

BRASIL, J. L. **Uso de Planejamento Estatístico de Experimentos Aplicados a Sistemas de Adsorção**. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. 2010.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng)**. **Mez**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BRITO, T. S.; LIMA, F. J. B.; ARAGÃO, K. S.; SIQUEIRA, R. J. B.; SOUSA, P. J. C.; MAIA, J. G. S.; FILHO, J. D.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 780–788. 2013.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry medical plants**. 2. ed. Paris: Lauvoisier, p. 1119, 1999.

BUCHILI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmetics and Toiletries**, v. 14, n. 2, p. 54-57. 2002.

CÁCERES, A.; CRUZ, S. Contributions of Natural Ingredients From the Mesoamerican Biodiversity for the Phytocosmetic Industry. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 2, n. 1, 2015.

CALEFFI, R.; HEIDEMANN, T. R.; MOSER, D. K. **Cloreto de Sódio: análise de sua função na formulação de xampus para manutenção de cabelos quimicamente tratados**. São Paulo 2012.

CALIARI, C.C. **Atributos e fatores na decisão de compra de fitoderivados da Amazônia na indústria de higiene pessoal e cosméticos no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Agronegócios). Centros de Estudos e Pesquisas em Agronegócios. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. 2002.

CAMPOS, V. M. C. **Sabonete líquido íntimo** - Resposta Técnica. Disponível em: <http://www.sbirt.ibict.br>. Acesso em: 27 de junho de 2013.

CARRILLO-HORMAZA, L.; PUJOL, A.; ÁLZATE, F.; OSORIO, E.; LARA-GUZMAN, O. Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 272-279, 2015.

CARVALHO, T. P. V. **Mercado de fitoterápicos e fitocosméticos em Manaus**. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. 2015.

CASTELLI, V. C.; MENDONÇA, C. C.; CAMPOS, M.; FERRARI, M.; MACHADO, S. R. P. Development and evaluation of the preliminary stability of O/W emulsion containing ketoconazole 2.0%. **Acta Science. Health Science**, v. 30, n. 2, p. 121-128, 2008.

CEFALI, L. C.; ATAIDE, J. A.; MORIEL, P.; FOGGIO, M. A.; MAZZOLA, P. G. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. **International journal of cosmetic science**, p. 1-8, 2016.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei* Kostermans**. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 125 p. 2000.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 491-497, 2005.

CHHABRA, V.; FERRE, M. L.; KANG, P. K.; TRUESDAIL, S. E.; SHAH, D. O. Microemulsions as na Emerging Technology, **Tenside, surfactants, detergents**, v. 34, n. 3, 1997.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: Conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 88, p. 113-118, 2007a.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. Toxicologia dos cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 144-54, 2007b.

COLE, C. A.; GISOLDI, E. M.; GROSSMAN, R. M. Clinical and consumer evaluations of improved facial appearance after 1 month use of topical dimethylaminoethanol. In: **Annual Meeting American Academy Dermatology**. New Orleans: AAD, 2002. p. 1-4.

COSKER, F.; LIMA, F. J. B.; LAHLOU, S.; PEDRO J. C.; MAGALHÃES, P. J. C. Cytoprotective effect of 1-nitro-2-phenylethane in mice pancreatic acinar cells subjected to taurocholate: Putative role of guanylyl cyclase-derived 8-nitro-cyclic-GMP. **Biochemical Pharmacology**, v. 91, p. 191-201. 2014.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1031 p., 1994.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Version of Clinical Microbiology**, v. 12, p. 564-582. 1999.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. C. E. **Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2008.

CURSINO, L. M. C.; SILVA, I. ; MARIÚBA, L. A. M. ; JEFFREYS, M. F.; LIMA, N. M.; OLIVEIRA, J. L.; NOGUEIRA, P. P. O.; NUNEZ, C. V. Antibacterial activity of *Minuartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation.. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, p. 505-510, 2011.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DAHER, C. C.; FONTES, I. S.; RODRIGUES, R. O.; DAMASCENO, G. A. B.; SOARES, D. S.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B.; FERRARI, M. Development of O / W emulsions containing *Euterpe oleracea* extract and evaluation of photoprotective efficacy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 639–652. 2014.

- DAVIS, H. M. Analysis of Creams and Lotions. In: SENZEL, A. J. (Ed.) **Newburguer's Manual of Cosmetic Analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1977. 32p.
- DE QUEIROZ, S. C.; SANTOS, I. N. S. D. G.; LUSTOSA, S. R. L.; BENEVIDES, G. BI-GEL: DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO CONCEITO DE COSMÉTICOS SE MEMULSIONANTE. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 1/4, p. 61-66, 2013.
- DELL, B. B.; MCCOMB, A. J. Plant resins - Their formation, secretion and possible functions. **Advances in Botanical Research**, v. 6, p. 277-316, 1979.
- DEUSCHLE, V. C. K. N., DEUSCHLE, R. A. N., BORTOLUZZI, M. R., ATHAYDE, M. L. Physical chemistry evaluation of stability, spreadability, in vitro antioxidant, and photo-protective capacities of topical formulations containing *Calendula officinalis* L. leaf extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 63-75, 2015.
- DIFFEY, B. L. **Indices of protection from in vitro assay of sunscreens**. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects. New York: Marcel Dekker. p. 589-600. 1997.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Jornal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316. 2000.
- DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009.
- DUAN, H.; FENG, B.; GUO, X.; WANG, J; ZHAO, G; LIU, W.; CAO, Y; ZHANG, W. J. Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2077. 2013.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, p. 17, 2005.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.
- DWECK, A. C. The internal and external use of medicinal plants. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 148-158. 2009.

EBRAHIMZADEH, M. A.; ENAYATIFARD, R.; KHALILI, M.; GHAFFARLOO, M.; SAEEDI, M.; YAZDANI CHARATI, J. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 1041-1047, 2014.

ELIAS, P. M. Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 9, p. 2131-2133, 2012.

FARIA, A. B.; PERES, D. D.; VLADI, T. M. K.; CONSIGLIERI, O.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 521 – 527. 2012.

FERNÁNDEZ-MONTES, E. A. **Técnicas y procedimientos en formulación magistral dermatológica**. E. Alía, 2005.

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guianensis*)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 142 p., 2002.

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

FERRARI, M.; OLIVEIRA, M. S. C.; NAKANO, A. K.; ROCHA-FILHO, P. A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 626-630. 2007.

FERRAZ, J. B. S.; MESQUITA, T. J. B. **Produção e atividade antifúngica do óleo essencial de pau-rosa (*Aniba roseodora ducke*) de plantios em diferentes estados nutricionais**. I Congresso de Iniciação Científica, 2012.

FILHA, A. M. B.; COSTA, V. G.; BIZZO, H. R. Avaliação da qualidade de detergentes a partir do volume de espuma formado. **Química Nova na Escola**, v. 9, p. 43-45, 1999.



FONSECA JR, E. Q.; CASTILHO, R. B.; SILVA, G. F. Avaliação do potencial fotoprotetor dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *Aniba canelilla* (HBK) MEZ. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1168-1172, 2015.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in Theory and Practice**. Londres: Chapman and Hall, 247p., 1994.

FUJIWARA, G. M.; COSTA, C. K.; ZANIN S. M. W.; MIGUEL, M. D. Avaliação de diversas formulações de xampus de cetoconazol quanto ao emprego de diferentes antioxidantes e solubilizantes. **Revista Visão Acadêmica**, v. 10, n. 2, p. 43 – 57. 2009.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-82. 2005.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. **Cosméticos: a química da beleza**. Sala de Leitura, 38 p. 2009.

GALHARDO, N.C.W.; ISAAC, V.L.B.; PIZZOLITTO, A.C.; MOREIRA, R.R.D.; CORRÊA, M.A. Óleo de pitanga na higiene oral. **Cosmetic & Toiletries**, v. 19, n.5, p.64-65, 2007.

GARCIA, C. C.; GERMANO, C.; OSTI, N. M.; CHORILLI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de malaleuca. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 90, n. 3, p. 236-240. 2009.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GENNARO, A. R. Remington: **The science and practice of pharmacy**. ed. 20, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. 2000.

GHARAVI, S. M.; TAVAKOLI, N.; PARDAKHTI, A.; BAGHAIZADEH, N. Determination of sun protection factor of sunscreens by two different in-vitro methods. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 5, n. 4, 1994.

GIL, E.; CUCA, L.; DELGADO, W. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Ocotea caudata* (Nees) Mez (Lauraceae) from Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 4, 2016.

GIUSTI, M. M.; e WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

GRUPO O BOTICÁRIO. Disponível em: <<http://www.grupoboticario.com.br/Paginas/default.aspx>>. Acessado: agosto/2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford Science Publications, 936p., 2000.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.

HENRIQUE, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis., p. 641-642, 2000.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2379-2383, 1992.

HERZOG, B. Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model. **Journal of cosmetic science**, v. 53, n. 1, p. 11-26, 2001.

HIGINO, S. S.; PEREIRA, A. V.; AZEVEDO, T. K. B.; SANTANA, G. M.; PAULA, A. F. R., TREVISAN, L. F. A.; PEREIRA, M. D. S. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de taninos isolados da jurema vermelha (*Mimosa arenosa* (Willd Poir) sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 115-120, 2015.

HURTADO, T. L. T.; HUERTAS, C. E. M. Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en la evaluación de dos materias primas cosméticas como restauradoras de La cutícula capilar. **Revista Colombiana de Ciência Química Farmacêutica**, v. 39, n. 1, p. 5-20. 2010.

IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 387-93. 2008.

INTERAMINENSE, L. D. F. L.; RAMOS-ALVES, F. E.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 709–716. 2013.

INTERAMINENSE, L. D. F. L.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 661-669. 2010.

INTERAMINENSE, L. D. F. L.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; SILVA, J. K.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 661–669. 2011.

IRACHE, J. M.; EZPELETA, I.; VEGA, F. A. HPLC determination of antioxidant synergists and ascorbic acid in some fatty pharmaceuticals, cosmetics and food. **Chromatographia**, v. 35, n. 3-4, p. 232-236, 1993.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

KALE, S.; GAIKWAD, M.; BHANDARE, S. Determination and comparison of in vitro SPF of topical formulation containing Lutein ester from *Tagetes erecta* L. flowers, *Moringa oleifera*. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1220-1224, 2011.

KALE, S.; GAJBHIYE, G; CHAUDHARI, N. Formulation and in-vitro Evaluation of *Moringa concanensis*, Nimmo. Seed Oils Sunscreen Cream. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, p. 2060-2062, 2010.

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G. W; RODRIGUEZ, E. The Chemistry of Biologically Active Constituents Secreted and Stored in Plant Glandular Trichomes. In: RODRIGUEZ, E. (Ed.). **Biology and Chemistry of Plant Trichomes**. New York: Plenum Press, p. 187-241. 1984.

KHAZAELI, P.; MEHRABANI, M. Screening of sun protective activity of the ethyl acetate extracts of some medicinal plants. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, p. 5-9, 2011.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. **Histologia e biologia celular**. Elsevier Brasil. 2012.

KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KOOP, B. Microbial contamination of medicinal plants. **Planta Medica**, v. 68., p. 5-15. 2002.

KOHLER, R. C. O. **A química da estética capilar como temática no ensino de química e na capacitação dos profissionais de beleza**. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências). Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. Rio Grande do Sul. 2011.

KUMAR, A.; LI, S.; CHENG, C. M.; LEE, D. Recent Developments in Phase Inversion Emulsification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2015.

LACHMAN, L.; KANIG, J. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste, v. 2, p.855-905, 2001.

LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; SIQUEIRA, R. J. B.; FIGUEIREDO, A. F.; INTERAMINENSE, L. D. F. L.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, p. 412-421. 2005.

LAOHAPRASIT, N.; AMBADIPUDI, D. S.; SRZEDNICKI, G. Optimisation of extraction conditions of volatile compounds in 'Nam Dok Mai' mangoes. **International Food Research Journal**, v. 18, ed. 3, p. 1043-1049, 2011.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, p. 969-978. 1988.

LEE, K. Current development in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. **Jornal of Natural Products**, v. 64, p. 273-283. 2004.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: uma abordagem Biossintética. In: LEITE (Ed.). **Fitoterapia-Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 47

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. Tese de Doutorado. Tese

(Doutorado) -Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009

LIMA, A. B.; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K.; MAIA, J. G. S.; CARVALHO, C. T.; SOUSA, P. J. C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, p. 555-559. 2009.

LIMA, C. G.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; PIANNOVSKI, A. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 3, p. 239-245. 2008.

LIMA, G. C.G; COMARELLA, L. Sugestão de desenvolvimento de formulações de xampu-sabonete auxiliar no tratamento da dermatite seborréica. **Revista Uniandrade**, v. 13, n. 2, p. 160 – 174, 2011.

LIMA, M. P.; SILVA, T. M. D.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 329-330. 2004.

LOESTE ARRUDA-BARBOSA, L.; RODRIGUES, K. M. S.; SOUZA-NETO, F. C. V.; DUARTE, G. P.; BORGES, R. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane in rat isolated aortic rings. **Vascular Pharmacology**, v. 63, p. 55-62. 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 544 p. 2002.

LUPE, F. A. **Estudo da Composição Química de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 102 p., 2007.

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; KHAN, B.; RASUL, A.; KHAN, H. M. Shoaib. Fabrication, physicochemical characterization and preliminary efficacy evaluation of a W/O/W multiple emulsion loaded with 5% green tea extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 341-349, June 2013.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MAIA, J. G. S.; TAVEIRA, F. S. N.; ZOHBI, M. G. B.; SANTOS, A. S.; LUZ, A. I. R. **Óleo essencial de casca-preciosa**. XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, p. 197, Florianópolis, 1996.

MAIA, J. G. S.; ZOHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2000.

MAIA, J. G. S.; ZOHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e seus Óleos Essenciais**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

MAIMOM, D. **Estudo de mercado de matéria prima: corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bioinseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica)**. Relatório Final Projeto BRA/96/025 SUDAM/PNUD, Belém, 2000.

MANHÃES, A. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. D.; WIEDEMANN, L. S. M.; FERNANDES, K. S.; SAMPAIO, P. D. T. B. Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of *Aniba canelilla* (HBK)(Lauraceae) in the Central Amazon. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 3, p. 355-362, 2012.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. V.R; MANSUR, M. C. A.; AZULEY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, p. 167-172, 1986.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARTIN, S.; PADILLA, E.; OCETE, M. A.; GALVEZ, J.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*. **Planta medica**, v. 59, n. 06, p. 533-536, 1993.

MARTÍNEZ, A. Flavonoides. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica. **Universidad de Antioquia**, 2005.

MARTINS, D. B. S. **Desenvolvimento e testes de estabilidade de protetor labial com vitamina E**. Monografia – Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, 2015.

MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34-39, 2016.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; DIAS, M. I.; BERNARDO, F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 149-153, 2001.

MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y. L. E.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1, p. 117-131, 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Ftoquímica Experimental**. 2ª Ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997. 141p.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; MUNIZ, L. B.; SILVA, E. Y. Y. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema beta-caroteno/ácido linoléico. **Embrapa Hortaliças**. Comunicado técnico, 2009.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and ractionation. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**, London: Academic Press, v. 6, p. 1-36. 1991.

MEDINA, C. O.; LOUCHARD, B. O.; GONÇALVES, T. Análise espectrofotométrica da atividade fotoprotetora in vitro de extratos das folhas de *Byrsonima sericea*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 3, 2015.

MELO, C. T.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L.; LIMA, V. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, F. M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, B. G. S.; SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effects of (o-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 451-454. 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MERCANTE, R.; CIELO, I. D.; ILVA, F.; RODRIGUE, K. F.; FRANZ, A. C.; HAHN, P.; BUENO, R. K. **Sabonetes líquidos: Fabricando sabonetes líquidos**. Projeto Gerar. Vol: VIII. 22p. 2009.

MESQUITA, T. J. B.; SILVA, G. F. da; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JR, S.; Análise fitoquímica e determinação da capacidade antioxidante em extratos de *Aniba canelilla* (h.b.k.) Mez. p. 2863-2870. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.2. São Paulo: Blucher, 2015.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31-34. 1982.

MILIAUSKAS, G.; VAN BEEK, T. A.; VENSKUTONIS, P. R.; LINSEN, J. P. H.; WAARD, P. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 253-261. 2004.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91-91, 1971.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P., ARAUJO, E.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 501 p. 2000.

MOTTA, E. F. O. **Dossiê Técnico: Fabricação de produtos de higiene pessoal**. Rio de Janeiro: Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.

MOURA, A. C. S.; VILEGA, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, p. 1136-1140, 2011.

MYERS, D. **Surfactant Science and Technology**. VCH Publishers Inc, New York, USA, 1988.

NASCIMENTO G. G. F.; LUCATELLI, J. F. P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256. 2000.



NGUYEN, N. T.; VAN NGUYEN, H.; CARUSO, D.; LEBRUN, M.; TRINH, T. T.; MEILE, J. C. Antibacterial activity of *Litsea cubeba* (Lauraceae, May Chang) and its effects on the biological response of common carp *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of applied microbiology**, 2016.

NOGUEIRA, A. C. S. **Efeito da radiação ultravioleta na cor, na perda protéica e nas propriedades mecânicas do cabelo**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. São Paulo. 2003.

NORIEGA, P.; ROPKE, C. D.; CONSIGLIERI, V. O.; TAQUEDA, M. E. S.; TAVARES, L. C.; WASICKY, A.; BACCHI, E. M.; BARROS, S. B. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1, p. 149-159, 2008.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. D. S. O. D.; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; ROLIM NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxicas e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (suplem.), p.718-723, 2008.

OGER, J. M.; FARDEAU, A.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; FOURNET, A. Novel isoquinoline alkaloids from Bolivian Laureaceae: *Aniba canelilla* (H. B. K.), **Canadian Journal of Chemistry**, v. 71, n. 8, p. 1128-1135. 1994a.

OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez Essential Oil: Analysis of Chemical Constituents, Fungistatic Properties. **Journal Essential Oil Research**, v. 6, p. 493-497, 1994.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, C. H.; BINOTTI, R. S.; ASTIGARRAGA, R. E. B.; GRAUDENZ, G. S.; CONDINO NETO, A. Surfactantes derivados do fruto de coco (*Cocos nucifera* L.) e sensibilidade cutânea. **Revista Brasileira de Alergia Imunopatologia**, v. 28, n.3, p. 155 – 160. 2005.

ORLANDA, J. F. F; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 730-736, 2015.

OYEMITANA, I. A.; ELUSIYANB, C. A.; AKANMUA, M. A.; OLUGBADEC, T. A. Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice. **Phytomedicine**, v. 20, p. 1315-1322. 2013.

PANDOLFO, M. L. M. **O processo de envelhecimento cutâneo – as novas perspectivas frente à evolução da cosmetologia, da estética e das tecnologias de produção de cosméticos**. Trabalho de conclusão do curso (Pós-graduação em Estética e Cosmetologia). Universidade Veiga de Almeida. Rio de Janeiro. 2010.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International journal of pharmaceutics**, v. 366, n. 1, p. 170-184, 2010.

PATIL, R.; RAVINDRA, R. Formulation development and evaluation from garlic oil macerate. **The Inter. J. of Nut. and Wellness**. v. 8, n. 1. 2009.

PATRAVALE, V. B.; MANDAWGADE, S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. **International journal of cosmetic science**, v. 30, n. 1, p. 19-33, 2008.

PEDROSA, F. P. D. C. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Mediciniais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP**. Monografia. Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu. 2012.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249–259. 2008.

PIETRO, R. C. L. R.; SALVAGNINI, L. E.; MIGLIATO, K. F.; RANGEL, V. L. B. I.; CORREA, M. A.; MARONA, H. R. N. Efficacy evaluation of preservatives associated to *Achillea millefolium* extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 75-77. 2006.

PIMENTEL, R. B. Q.; COSTA, C. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; JUNIOR, S. D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2008.

RADICE, M.; MANFREDINI, S.; ZIOSI, P.; DISSETTE, V.; BUSO, P.; FALLACARA, A.; VERTUANI, S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. **Fitoterapia**, v. 114, p. 144-162, 2016.

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E. P.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M. Avaliação da Atividade Antisolar e Estudos Preliminares de Fotodegradação da Própolis. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 5, n. 03, p. 73-84, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REUBER, S.; BORNMAN, J. F.; WEISSENBOCK, G. A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, n. 5, p. 593-601, 1996.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas e Sustentáveis**. Manaus: SEBRAE. 2000.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics e Toiletries**, v. 8, n. 5, p. 47-53. 1996.

RODRIGUES, K.A.F.; DIAS, C.C.; FLORENCIO, J.C.; VILANOVA, C.M.; GONÇALVES, J.R.S.; COUTINHO-MORAES, D.F. Prospecção Fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, n. 2, p. 1-8, 2010.

- RODRIGUES, R. M. Cosméticos verdes: uma tendência mundial. **Revista Racine**, v. 65, p. 28-30. 2001.
- ROGINSKI, V; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. v. 92, p. 235-254. 2005.
- ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Fundamentals of cosmetic product safety testing. **Cosmetics & Toiletries**, v. 111, p. 79-86. 1996.
- ROSEN, M. J. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 2<sup>a</sup> ed.. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado técnico online, n. 127. Fortaleza: Embrapa, 2007.
- RUIVO, J. S. P. **Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em Cosmética e Dermatologia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa. 2012.
- RYAN, K. G.; SWINNY, E. E.; MARKHAM, K. R.; WINEFIELD, C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant Petunia leaves. **Phytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 23-32, 2002.
- SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, pp. 129-141, 2013.
- SALAS, M. P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S. L. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1411-1415, 2011.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 8, p. 121-137. 2002.
- SÁNCHEZ-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.

SÁNCHEZ-QUILES, D.; TOVAR-SÁNCHEZ, A. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism?. **Environment International**, v. 83, p. 158-170, 2015.

SANTANA, J. L.; PEÑA, M.; MARTINEZ, F.; GÓMEZ, A.; CORDONÍO, E.; GARCIA, O.; GARCIA, G.; VARGAS, L. M.; GARCIA, M.; GARCIA, C. Evaluación de la actividad antimicrobiana, fotoprotectora, antielastasa y antioxidante de polifenóis de origen natural, empleados en formulaciones cosméticas. **XV Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos**. Buenos Aires, Argentina. 2001.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby e Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 215-219. 2007.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: EdUFSC, p. 323-354, 1999.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. Da UFSC; Porto Alegre: Ed. Da UFRGS, p. 615-656, 2004.

SANTOS, S. da C.; MELLO, J.C.P de. Taninos In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: EdUFSC, p. 323-354, 1999.

SAVIAN, A. L.; VARELLA, F. T.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, C. B. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.91, p.24-30. 2010.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cosméticos à base de produtos naturais**. Relatório de estudo de mercado. Brasília: ESPM, 2008.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. 2.ed. Florida: CRC Press, 576p. 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, A. G.; TOBIAS, R. **O impacto da utilização de estratégias de marketing social na consolidação da marca Natura**. 2007. Trabalho de Conclusão do Curso de Especialização em Marketing e Comunicação. Centro Universitário de Belo Horizonte–UNI-BH. Belo Horizonte, 2007.

SILVA, G. F. **Estudo do potencial biotecnológico de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez para obtenção de cosméticos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Escola Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2012.

SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9422-9426. 2007.

SILVA, M. F. **Nomes vulgares de plantas amazônicas**. Manaus: INPA, 1977. 222p.

SILVA, N. L., ZOBIOLE, N. N., SILVA, D. B. D., SARTORI, A. L. B., OLIVEIRA, R. J., PINTO, M. E. A.; SIQUEIRA, J. M. D. Chemical constituents and phytotoxic activity of leaves of *Annona nutans*. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 640-644, 2015.

SILVA, N. N. S.; SILVA, J. R. A.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. E. S. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of 1-nitro-2-henylethane, the main constituent of *Aniba canelilla* essential oil. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 84, p. 192-198. 2014.

SILVERSTEIN, R. M; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação dos compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

SIMILI, I. G.; SOUZA, M. C. **A beleza das meninas nas “dicas da Barbie”**. Cadernos de Pesquisa, v. 45, n. 155, p. 200-217, 2015.

SIMÕES, C M O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS: Porto Alegre, p. 821, 1999.

SIQUEIRA, R. J. B.; MACEDO, F. I. B.; INTERAMINENSE, L. D. F. L., DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, T. S.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. G. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 638, p. 90-98. 2010.

SKOTARCZAK, K.; OSMOLA-MAŃKOWSKA, A.; LODYGA, M.; POLAŃSKA, A.; MAZUR, M.; ADAMSKI, Z. Photoprotection: facts and controversies. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 98-112, 2015.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n. 3, p. 727-732, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, F.L.C. **Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicone e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo e água para uso externo de uso mais comum em manipulação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2007.

SOUZA, K. S.; CHAAR, J. S.; OLIVEIRA, K. M. T.; GOMES, E. O.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M.; QUIGNARD, E. L. J.; NUNOMURA, S. M.; TADEI, W. P.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SILVA, D. D.; GALHIANE, M. S.; CHIERICE, G. O. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2007.

SOUZA, T. M.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 15, n.1, p. 36-8. 2005.

SOUZA, V. B. **Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)**. Tese de Doutorado em Ciências. Faculdade de zootecnia e Engenharia de alimentos. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

SOUZA, V. B.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 217–222, 2010.

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, p. 155–164. 1999.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 753-758, 2003.

STAMATAS, G. N.; NIKOLOVSKI, J.; MACK, M. C.; KOLLIAS, N. Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 1, p. 17-24. 2011.

TASSANEYAKUL, W.; RAZZAZI-FAZELI, E.; PORASUPHATANA, S.; BOHM, J. Contamination of aflatoxins in herbal medical products in Thailand. **Mycopathologia**, v. 158, p. 239-244. 2004.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W. M.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 69-75. 2003.

TEODOR, H.; CULEA, M.; CIMPOIU, C.; COT, A. Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plants extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; v.18, n. 1, p. 319-323, 1998.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. **Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais**. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.

TÜRKYILMAZ, M.; TAĞI, Ş.; DERELI, U.; ÖZKAN, M. Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1810-1818, 2013.

UNIOESTE. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. **Sabonetes líquidos: fabricando sabonetes líquidos**. 2009. Projeto Gerart. Volume VIII. Disponível em:



<<<http://projetos.unioeste.br/projetos/gerart/apostilas/apostila8.pdf>>> Acesso em: 15 mar. 2012.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, n. 2-3, p. 99–104. 2001.

VALE, J. K. L.; LIMA, A. B.; PINHEIRO, B. G.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, G. E. P.; SILVA, A. B. F.; SOUSA, P. J. C.; BORGES, R. S. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of 1-nitro-2-phenylethane. **Planta Medica**, v. 79, p. 628-633, 2013.

VALE, J. K. L.; LIMA, A. B.; PINHEIRO, B. G.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, G. E. P.; SILVA, A. B. F.; SOUSA, P. J. C.; BORGES, R. S. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of 1-nitro-2-phenylethane. **Planta Medica**, v. 79, p. 628-633, 2013.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R.; VAN DEN BERG, H.; VAN DER VIJGH, W.; BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 391-395, 2000.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. D.; KANEKO, T.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*)—revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

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* Bentham. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 179-194. 2008.

VILEGAS, W; CARDOSO, C. A. L. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali; 2007. p.157-82.

VIOLANTE, I.M.P.; SOUZA, I.M.; VENTURINI, C.L.; RAMALHO, A.F.S.; SANTOS, R.A.N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2A, p.452-457, 2009.

WAGNER, R. C. C. **A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo.** Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. São Paulo. 2006.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 04, p. 621-629, 2004.

WOLFRAM, L. J. **Hair cosmetics.** In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. (Eds.). Handbook of Cosmetic Science and Technology. New York: Marcel Dekker, 2ª ed., cap. 51, p. 581 – 603. 2001.

WOLLENWEBER, E.; WEHDE, R.; DÖRR, M.; LANG, G.; STEVENS J.F. C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 55, p. 965-970, 2000.

WOOLF, A. Essential oil poisoning. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 37, p. 721-727. 1999.

YANNAS, I. V. **Regeneration of Skin.** In: Tissue and Organ Regeneration in Adults. Springer New York, 2015. p. 89-136.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres.** O programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus, 151 p. 1995.

ZEGGIO, A. R. S. **Própolis catarinense: influência da sazonalidade e da origem geográfica no perfil de metabólitos secundários.** Tese de Doutorado em Biotecnologia e Biociências Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p. 577-614, 2004.