

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS- PPGCF

DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES UTILIZANDO EXTRATO

SECO DE *PASSIFLORA NITIDA* KUNTH

PRISCILLA TOBIAS RIBEIRO

MANAUS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS- PPGCF

PRISCILLA TOBIAS RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES UTILIZANDO EXTRATO

SECO DE *PASSIFLORA NITIDA* KUNTH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS
2015

PRISCILLA TOBIAS RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES UTILIZANDO EXTRATO
SECO DE *PASSIFLORA NITIDA* KUNTH

Dissertação aprovada em 27 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima
Orientador
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Membro
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Cláudia Cândida Silva
Membro
Universidade do Estado do Amazonas

DEDICATÓRIA

**“A minha amada avó
Argemira Tobias de Souza (*in memoriam*),
aos meus pais e irmã.”**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo presente de estar viva e com saúde, ao lado da minha família, dos amigos, tendo um trabalho e com a oportunidade de estar finalizando uma importante etapa na vida acadêmica. Agradeço a Nossa Senhora pela intercessão junto ao Pai e ao Filho para cada benção concedida.

Agradeço aos meus Pais e minha irmã pelo amor e apoio incondicional, por compreenderem minha ausência em diversos momentos, pelo incentivo na busca dos meus ideais. A minha mãe por todo esforço que sempre fez para que eu pudesse ter uma boa educação. Agradeço a toda minha família que apoia e estimula o meu crescimento. Em especial agradeço as minhas tias que são como mães: Noeme, Norma e Nádia, ao seu modo ajudaram na minha formação tanto escolar como pessoal.

Ao meu orientador agradeço por ter aceitado me orientar mesmo sabendo que eu teria que dividir meu tempo entre o trabalho e o mestrado. Obrigada por acreditar em mim. Agradeço pelos ensinamentos, por mostrar com tanta satisfação esse mundo da pesquisa e da docência, pela paciência, por sua disponibilidade em conversar e esclarecer as dúvidas, pela dedicação aos projetos e alunos, pelas cobranças necessárias para que o foco não fosse perdido, pelos questionamentos que me fizeram aprender a buscar respostas. Agradeço pela confiança depositada e por sempre me incentivar.

Ao meu co-orientador agradeço pelos ensinamentos e pela paciência que sempre teve comigo. Por estar presente e ter dado todo suporte necessário para o bom andamento do nosso trabalho, por ser criterioso e questionador fazendo com que eu aprendesse um pouco mais ao buscar uma informação.

Agradeço as minhas melhores amigas e aos grandes amigos pela torcida, pelo incentivo e por entenderem minhas ausências. A Carla Cabral por sempre me escutar e mesmo com todas as atribuições que possuí, no seu corrido dia a dia, se dispôs a me ajudar

nesta reta final e a Suelen, colega de trabalho, que apesar do pouco tempo que nos conhecemos muito me ajudou.

Agradeço à diretoria da Pharmakos D`Amazônia, empresa que trabalho, em especial ao Diretor-Geral Schubert Pinto pelo apoio no decorrer do mestrado, por compreender as muitas vezes que precisei sair antes do meu horário para a realização de algum teste, pela colaboração com alguns materiais necessários para o desenvolvimento do projeto. Agradeço aos meus colegas de trabalho que me ajudaram durante esse processo e me deram o suporte para que eu pudesse me ausentar.

Agradeço aos professores com quem trabalhei pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar. Aos professores responsáveis pelos laboratórios no qual o trabalho foi desenvolvido, em especial agradeço a Professora Dra. Tatiane Pereira de Souza, Professora Dra. Cláudia Cândida da Silva, Professor Dr. Adriano Araújo, Professor Dr. Valdir Veiga. Aos técnicos do laboratório de tecnologia farmacêutica Lilian e Newton, a técnica do laboratório de farmacotécnica Doroteia, pelo apoio que recebi dentro dos laboratórios. Aos vigilantes que sempre tiveram o cuidado de aguardar eu entrar no carro quando eu saia muito tarde da faculdade. E a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Aos amigos do grupo de pesquisa tecnologia e controle de qualidade de medicamentos e cosméticos com os quais eu pude contar desde o início do trabalho. Agradeço imensamente a ajuda e o apoio de todos vocês. Não posso deixar de agradecer, em particular, aqueles que participaram mais diretamente no desenvolvimento deste trabalho, a Janayna Libório que desde a minha entrada no grupo se dispôs a me ajudar e muito me ensinou. A Valérya Nóbrega uma grande parceira que muito colaborou com o trabalho, companheira inclusive de fins de semanas e feriados dentro do laboratório, a você meu muito obrigada, de coração. A Bárbara Salgado parceira no desenvolvimento das formulações e estudo de estabilidade, muito bom trabalhar com você, foi um trabalho intenso e de grande aprendizado.

Aos colegas do laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Biophar, em especial a Jéssica Nogueira, grande companheira na luta da cultura em células. Aos colegas que fiz na faculdade nesses dois anos de mestrado, a Talita Machado e Chanderlei Tavares que me ajudaram em momentos que eu nem sabia para quem pedir ajudar.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, por proporcionar essa possibilidade de crescimento profissional. E aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos repassados.

À Universidade Federal do Amazonas pelo espaço cedido e aos colegas da universidade que colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao CNPq e FAPEAM pelo suporte financeiro.

Resumo

A *Passiflora nitida* é uma espécie da flora amazônica ainda pouco estudada que somada ao seu potencial antioxidante, relatado na literatura, devido principalmente à presença de fenóis e flavonoides, desperta o interesse para aplicação em um produto. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma formulação semissólida com atividade rejuvenescedora e clareadora da pele. A droga vegetal foi coletada na Embrapa-AM, o extrato seco obtido por aspersão em *spray dryer* foi preparado em três diferentes concentrações (droga vegetal-solvente). Na caracterização da matéria-prima vegetal testes como perda por dessecação, granulometria por tamisação, teor extrativo, teor de cinzas, triagem fitoquímica foram realizados com a droga vegetal. Com o extrato seco foram realizados os testes de granulometria a laser, análise da área superficial específica, fluorescência de raios-x, análises térmicas, resíduo seco, teor de fenóis e flavonoides totais, DPPH, ABTS, atividade de inibição da tirosinase, atividade quelante e potencial redutor. Na sequência, foram desenvolvidas formulações semissólidas e realizado os testes de pré-estabilidade, estabilidade preliminar, estabilidade acelerada, estudo reológico, espalhabilidade. Posteriormente, foram realizados testes em cultura de células para avaliar a citotoxicidade e a capacidade de reduzir a melanogênese e inibir a tirosinase. Também foi determinado o teor de flavonoides totais por espectrofotometria UV-Visível tanto no extrato seco como na formulação. Na caracterização da droga vegetal a perda por dessecação foi de 9,08 %, o pó foi classificado como grosso. O teor extrativo foi de 17,16 % e o teor de cinzas foi de 5,43 %. Na triagem fitoquímica o resultado foi fortemente positivo para heterosídeos flavônicos. O extrato seco foi classificado como pó finíssimo, com diâmetro médio de partículas de 25,06 μm e poros do tipo mesoporos. Os elementos químicos encontrados pela técnica de fluorescência de raios-x foram Ca, K, Cl, S, P, Si, Mg, Na e Br. Na análise térmica, temos quatro eventos térmicos observados na curva de DSC e quatro eventos de perda de massa na curva de TG/DTG. Para o extrato seco a 7,5% o resultado de fenóis totais foi de 18,9 %, flavonoides totais de 4,1 %. A CI_{50} do DPPH foi de 31,5 $\mu\text{g/mL}$, CI_{50} do ABTS foi de 21,8 $\mu\text{g/mL}$, CI_{50} da inibição de tirosinase foi de 437 $\mu\text{g/mL}$. O extrato não apresentou atividade quelante e o potencial redutor foi de 29,7 % na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. No desenvolvimento das formulações, dezoito bases foram manipuladas, a partir das quais várias formulações foram testadas na pré-estabilidade. Quatro formulações seguiram para estabilidade preliminar e estabilidade acelerada. A formulação selecionada na estabilidade acelerada foi a LB12 com 3% de *Passiflora nitida*. A LB12 3% apresentou comportamento pseudoplástico com tixotropia e boa espalhabilidade. O extrato seco e a formulação não apresentaram citotoxicidade e ambos apresentaram capacidade de reduzir a melanogênese. Entretanto, não houve inibição da tirosinase em cultura de células. O teor de flavonoides totais foi de 1,2 % para o extrato seco e de 0,2% para a formulação. O extrato seco de *Passiflora nitida* possui, *in vitro*, atividade antioxidante e capacidade de redução da melanogênese. Os resultados possibilitam o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade do extrato seco, e fornecem dados como: formulação, especificações físico-químicas e estabilidade, para a regularização do produto cosmético junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Desta maneira, conseguimos obter um produto cosmético semissólido com o bioativo amazônico - extrato seco de *Passiflora nitida*, seguro, estável e com as atividades antioxidante e clareadora da pele, comprovadas *in vitro*.

Palavras-chave: *Passiflora nitida*, extrato seco, formulação, antioxidante, melanogênese.

Abstract

The *Passiflora nitida* is a species of Amazonian flora still little studied that added to its antioxidant potential, reported in the literature, mainly due to the presence of phenols and flavonoids, arouses the interest for use in a product. The objective of this study was to develop a semi-solid formulation with rejuvenating activity and whitening of the skin. The plant drug was collected at Embrapa-AM, the dry extract obtained by sprinkler in spray dryer was prepared in three different concentrations (plant-drug solvent). In the characterization of the raw material plant tests as loss on drying, particle size by sieving, extractive content, ash content, phytochemical screening were performed with the plant drug. With the dry extract was made using laser particle size tests, analysis of specific surface area, fluorescence x-rays, thermal analysis, dry residue, phenol and total flavonoids, DPPH, ABTS, tyrosinase inhibition activity, chelating activity and reducing potential. Further, semisolid formulations were developed conducted the pre-test stability, primary stability, accelerated stability, rheological studies, and spreadability. Subsequently, tests were performed in cell culture to evaluate the cytotoxicity and the ability to reduce melanogenesis and inhibiting tyrosinase. It was also determined the total flavonoid content by UV-Visible esctrofotometria both the dry extract as in the formulation. In characterizing the plant drug loss on drying was 9.08%, the powder was classified as coarse powder. The extractive yield was 17.16% and the ash content was 5.43%. In the phytochemical screening results were strongly positive for flavônicos glycosides. The dry extract was classified as fine powder with average particle diameter of 25.06 μm and pores of the mesopore type. The chemicals found by the fluorescence X-ray technique are Ca, K, Cl, S, P, Si, Mg, Na and Br. In the thermal analysis, there are four thermal events observed in the DSC curve and four loss event mass in the TG / DTG curve. For the dry extract 7.5% the result of total phenols was 18.9%, total flavonoid 4.1%. IC_{50} of DPPH was 31.5 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} of ABTS was 21.8 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} inhibition of tyrosinase was 437 $\mu\text{g/mL}$. The extract showed no chelating activity and reducing potential of 29.7% at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. In the development of formulations, eighteen bases were manipulated and from below, various formulations were tested in pre-stability. Four formulations followed for primary stability and for accelerated stability. In accelerated stability LB12 with 3% *Passiflora nitida* was the formulation selected, the rheological profile showed pseudoplastic behavior with thixotropy and good spreadability. The dry extract and the formulation showed no cytotoxicity, ability to reduce both showed melanogenesis, but did not inhibit tyrosinase in cell culture. The total flavonoid content was 1.2% for dry extract and 0.2% for the formulation. The dried extract of *Passiflora nitida* has in vitro antioxidant activity and capacity reduction of melanogenesis. The results provided the establishment of dry extract of the quality control parameters, and provide the data as: formulation, physical and chemical specifications and stability, for the regularization of the cosmetic product at the National Health Surveillance Agency Sanitária- ANVISA. In this way, managed to get a semi-solid cosmetic product with Amazon bioactive, - *Passiflora nitida* dry extract, safe, stable and with the antioxidant activities and whitening of the skin, proven in vitro.

Keywords: *Passiflora nitida*, dry extract, formulation, antioxidant, melanogenesis.

Lista de Figuras

Figura 1 - Foto do fruto da <i>Passiflora nitida</i>	23
Figura 2 - Esquema da atuação da tirosinase na regulação da melanina.....	28
Figura 3 - Comportamentos reológicos.....	34
Figura 4 - Comportamento tixotrópico e histerese.....	36
Figura 5 - Esquema do processo de secagem por aspersão.....	37
Figura 6 - Histograma determinação granulométrica p tamisação e curva de passagem.....	64
Figura 7 - DSC do ESPN sob atmosfera de ar sintético (50 mL.min ⁻¹) e taxa de aquecimento de 10 °C. min ⁻¹	70
Figura 8 - TG e DTG do ESPN sob atmosfera de ar sintético (50 mL.min ⁻¹) e taxa de aquecimento de 10 °C. min ⁻¹	71
Figura 9 - Avaliação de inibição da tirosinase no extrato seco de <i>P. nitida</i> a 7,5% e do padrão ácido kójico.....	73
Figura 10 - Gráfico do potencial redutor em concentrações diferentes do ESPN 7,5.....	74
Figura 11 - Aspecto esfarelado da base LB10.....	76
Figura 12 - Aspecto de pomada da base LB9.....	76
Figura 13 - Demonstração de fórmulas estáveis após o teste de centrifugação.....	77
Figura 14 - Demonstração de instabilidade nas formulações após o teste da centrifugação....	77
Figura 15 - Determinação do pH das formulações na estabilidade preliminar.....	80
Figura 16 - Determinação da densidade relativa das formulações na estabilidade preliminar.	81
Figura 17 - Determinação do pH no estudo de estabilidade acelerada.....	82
Figura 18 - Determinação da densidade relativa no estudo de estabilidade acelerada.....	83
Figura 19 - Formulação selecionada na estabilidade acelerada – gel creme com 3% de extrato seco de <i>P. nitida</i> (LB12 3%).....	86

Figura 20- Reograma da formulação LB12 3%.....	87
Figura 21- Comportamento tixotrópico do gel creme LB12 3%	87
Figura 22- Gráfico da Espalhabilidade do gel creme LB12 3% em função do peso das placas.....	89
Figura 23- Gráfico da Viabilidade celular do extrato seco de <i>P. nitida</i> e do gel creme LB12 3% em célula B16F10.....	90
Figura 24- Capacidade redução da melanogênese pela <i>P. nitida</i> em células B16F10.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação das matérias-primas usadas na formulação das bases pilotos.....	55
Tabela 2 - Relação das bases pilotos com as variações de polímeros, emulsionantes e emolientes testadas.....	56
Tabela 3 - Caracterização da droga vegetal das folhas da <i>P. nitida</i>	64
Tabela 4 - Triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas <i>P. nitida</i>	66
Tabela 5 - Caracterização das partículas do extrato seco da <i>P. nitida</i>	67
Tabela 6 - Concentração dos elementos químicos no extrato seco da <i>P. nitida</i> obtidos por WDXRF.....	69
Tabela 7 - Estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i> no extrato seco da <i>P. nitida</i>	72
Tabela 8 - Determinação subjetivas das características organolépticas na estabilidade preliminar.....	79
Tabela 9 - Valores da viscosidade das formulações durante a estabilidade acelerada.....	84
Tabela 10 – Avaliação subjetiva das características organolépticas no estudo de estabilidade acelerada.....	85

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABHIPEC= Associação Brasileira da Indústria da Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ABTS = 2,2-Azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)

ANVISA= Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASAP= Área Superficial e Tamanho de Poros

BET = Brunauer, Emmett e Teller

BHT = Butil Hidroxi Tolueno

CETENE= Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCT= Dopacroma Tautomerase

DHI = Dihidroxiindólicos

DOPA = β -3,4-Dihidroxifenilalanina

DPPH = 1,1- Difenil-2-picril-hidrazil

DSC= Differential Scanning Calorimetry

DTG = Termogravimetria Derivada

DV = Droga Vegetal

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Absortividade Específica

EDTA= Ácido etilenodiaminotetracético

Ei= Espalhabilidade

EMBRAPA= Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESPN = Extrato Seco de *Passiflora nítida*

FB = Farmacopeia Brasileira

FD= Fator de Diluição

HPPC= Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

IBMX= Isobutilmetilxantina

ICAQ= Indol-2-carboxílico

INPA= Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

IQ= Indol-5,6-quinona

LB = Lote Base

L-DOPA= L-diidroxifenilalanina

m = Massa

MPV = Matéria-prima Vegetal

NE= Não Estimulada

PBS= Tampão fosfato salino

PD= Perda por Dessecação

PMSF= Fenilmetilsulfonilflúor

S_{BET}= Área Superficial

TFT= Teor de Flavonoides Totais

TG = Termogravimetria

THF = Tetraidrofurano

TPP= Proteína Relacionada à Tirosinase

UEA=Universidade do Estado do Amazonas

UFAM= Universidade Federal do Amazonas

USP = United States Pharmacopeia

UV= Ultravioleta

v = Volume

WDXRF= Wave Dispersive X-Ray Fluorescence

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Uso de Plantas Medicinais.....	21
2.2 Gênero Passiflora.....	22
2.3 <i>Passiflora nitida</i> KUNTH.....	22
2.4 Flavonoides	24
2.5 Atividade Antioxidante	25
2.6 Pele e Melanogênese	26
2.7 Uso de cosméticos no Brasil e no Mundo	29
2.8 Desenvolvimento de formulações com ativo de origem vegetal	30
2.9 Reologia	33
2.10 Extrato seco por atomização (<i>Spray Dryer</i>)	36
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Material.....	40
4.2 Caracterização da Droga Vegetal.....	40
4.2.1 Análise granulométrica por tamisação.....	40
4.2.2 Determinação da Perda por Dessecação.....	41
4.2.3 Teor de Extrativos.....	41
4.2.4 Cinzas Totais.....	42
4.2.5 Triagem Fitoquímica	42
4.2.5.1 Pesquisa de alcalóides.....	42
4.2.5.2 Pesquisa de ácidos orgânicos.....	43
4.2.5.3 Pesquisa de fenóis.....	43
4.2.5.4 Pesquisa de flavonóides.....	43
4.2.5.5 Pesquisa de cumarinas.....	43
4.2.5.6 Pesquisa de antraquinonas.....	44
4.2.5.7 Pesquisa de triterpenos e/ou esteróides.....	44
4.2.5.8 Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	44
4.2.5.9 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	45

4.2.5.10 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	45
4.2.5.11 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens.....	45
4.2.5.12 Pesquisa de taninos.....	45
4.2.5.13 Pesquisa de aminogrupos.....	46
4.2.5.14 Pesquisa de ácidos voláteis.....	46
4.2.5.15 Pesquisa de ácidos fixos.....	46
4.3 Obtenção da Solução Extrativa.....	47
4.4 Obtenção do extrato seco por atomização (Spray Dryer).....	47
4.5 Caracterização da solução extrativa.....	47
4.5.1 Determinação do valor do pH	47
4.5.2 Determinação da Densidade Relativa.....	47
4.5.3 Determinação do Resíduo Seco.....	48
4.6 Caracterização do Extrato Seco de <i>P. nitida</i> (ESPN).....	48
4.6.1 Análise de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz	48
4.6.2 Área superficial específica e diâmetro dos poros	49
4.6.3 Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Ondas	49
4.6.4 Análise Térmica.....	50
4.6.4.1 Calorimetria exploratória diferencial ou DSC.....	50
4.6.4.2 Termogravimetria (TG).....	50
4.6.5 Determinação do teor de fenóis totais	51
4.6.6 Determinação do teor de flavonoides totais	51
4.6.7 Atividade sequestrante do radical DPPH	52
4.6.8 Ensaio de varredura do radical ABTS	52
4.6.9 Teste de inibição sobre a Tirosinase	53
4.6.10 Avaliação da atividade quelante de ferro	54
4.6.11 Potencial Redutor	54
4.7 Desenvolvimento das formulações e estudo de estabilidade	55
4.7.1 Desenvolvimento de bases semissólidas e incorporação do ESPN.....	55
4.7.2 Estudo de pré –estabilidade	56
4.7.3 Estabilidade Preliminar	56
4.7.4 Estabilidade Acelerada	57
4.7.5 Parâmetros avaliados no estudo de estabilidade.....	57
4.7.5.1 Determinação do pH	57
4.7.5.2 Determinação da densidade relativa.....	57

4.7.6 Perfil reológico e determinação da viscosidade	58
4.7.7 Espalhabilidade.....	58
4.8 Ensaio em cultura de células.....	59
4.8.1 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue.....	59
4.8.2 Cultivo, estímulo da melanogênese e lise celular.....	60
4.8.3 Dosagem da melanina em B16F10.....	61
4.8.4 Atividade da Tirosinase B16F10.....	61
4.9 Teor de Flavonóides Totais por espectrofotometria UV-Vísivel.....	61
4.10 Análise estatística.....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 Caracterização de Droga Vegetal.....	63
5.1.1 Análise granulométrica por tamisação.....	63
5.1.2 Determinação da Perda por Dessecação.....	64
5.1.3 Teor de Extrativos.....	65
5.1.4 Cinzas Totais.....	65
5.1.5 Triagem Fitoquímica.....	65
5.2 Caracterização da solução extrativa a 7,5%.....	66
5.3 Caracterização do ESPN.....	67
5.3.1 Análise de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz (granulometria a laser).....	67
5.3.2 Área superficial específica e diâmetro dos poros.....	67
5.3.3 Análise de fluorescência de raios-X por dispersão de ondas.....	68
5.3.4 Calorimetria exploratória diferencial ou DSC.....	69
5.3.5 Termogravimetria (TG e DTG).....	70
5.3.6 Resíduo Seco do ESPN 7,5.....	71
5.3.7 Determinação de Teor de Fenóis e Flavonóides Totais.....	71
5.3.8 Determinação da Atividade Antioxidante – DPPH e ABTS.....	72
5.3.9 Avaliação da inibição da tirosinase.....	73
5.3.10 Atividade Quelante do ESPN 7,5.....	74
5.3.11 Potencial Redutor do ESPN 7,5.....	74
5.4 Desenvolvimento e estudo de estabilidade das formulações.....	75
5.4.1 Desenvolvimento das bases, incorporação do extrato e pré-estabilidade.....	75
5.4.2 Estabilidade Preliminar.....	78

5.4.3 Estabilidade Acelerada.....	81
5.4.4 Reologia da LB12 3% do ESPN 7,5.....	86
5.4.5 Espalhabilidade da LB12 3% do EPN 7,5.....	88
5.5 Estudo de cultura em células.....	89
5.6 Teor de Flavonóides totais por espectrofotometria UV- Visível.....	92
6. CONCLUSÕES.....	93
7. PERSPECTIVAS.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICES.....	111
A Equipe Científica Executora.....	111
B Produção Científica.....	112

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em sua biodiversidade, apresentando destaque em relação às plantas superiores para as quais detém aproximadamente 22% da biodiversidade mundial (RATES, 2001; BRASIL, 2006). Apesar de muitos estudos relacionados ao gênero *Passiflora*, algumas de suas espécies como a *Passiflora nítida* (*P. nitida*) é pouco estudada. Mas, o potencial antioxidante relacionado à presença de fenóis e flavonoides nas folhas de *P. nitida*, descrito pelo grupo de pesquisa Produtos Naturais da UFAM, é de grande valia para compor um cosmético (LIMA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010; MONTEFUSCO-PEREIRA *et al.*, 2013).

A busca por uma pele jovem, isenta de rugas e manchas é cada vez maior. Este perfil estimula os pesquisadores a conhecer melhor os mecanismos responsáveis pelo envelhecimento e hiperpigmentação da pele, bem como, a busca de novos ativos para uso cosmético, principalmente, os provenientes de recursos naturais (BATISTELA *et al.*, 2007; NEMA *et al.*, 2011).

O envelhecimento cutâneo resultante da exposição contínua à luz solar provoca ressecamento, aspereza, flacidez, rugas e pigmentação irregular da pele, assim como, a superprodução e acúmulo de melanina na epiderme promove as desordens pigmentares (RYOO *et al.*, 2010; ZHONG *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de um produto contendo como ativo o extrato vegetal requer um rigoroso estudo, em todas as etapas de produção, a fim de garantir a qualidade, segurança e eficácia do produto final. Dessa forma, há várias problemáticas na elaboração de um fitoterápico, desde a sua constituição química complexa, bem como as características da matéria-prima, a dependência dos fatores agrônômicos. O que dificulta a definição das

especificações para avaliação da qualidade da matéria-prima e também do produto final (FARIAS *et al.*,2003).

Além dos problemas relacionados à matéria-prima vegetal, o desenvolvimento de uma formulação requer muito estudo e trabalho. É necessário estudar as matérias-primas que serão utilizadas e definir as suas concentrações, pensar nas possíveis incompatibilidades entre os excipientes, elaborar a técnica de fabricação, acompanhar a estabilidade da formulação.

O presente trabalho é uma parceria empresa-universidade com o objetivo de desenvolver um produto cosmético com o bioativo extrato seco de *P. nitida*, com segurança e eficácia. Neste contexto, é necessário caracterizar a Matéria-prima Vegetal (MPV) a fim de estabelecer parâmetros de controle de qualidade, avaliar atividade antioxidante, a capacidade de reduzir a melanogênese e a citotoxicidade, além de realizar os estudos de estabilidades no produto acabado, preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uso de plantas

As plantas medicinais são usadas como fonte de medicamento desde os tempos antigos. Existem muitos manuscritos sobre o uso etnobotânico de ervas, por exemplo, o manuscrito egípcio “*Ebers Papyrus*” de 1500 a.C. continha informações sobre 811 prescrições e 700 drogas. O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais é importante no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos; inclusive vários fármacos comercialmente importantes são de origem vegetal (DUARTE, 2006; SHARMA & SAKAR, 2013).

As pesquisas químicas e farmacêuticas ao longo do Século XX possibilitaram o alívio para males que assolaram a humanidade por séculos, como: a tuberculose, a sífilis, entre outras. Entretanto, uma boa parte da população, seja pela pobreza ou pela dificuldade de acesso aos tratamentos medicinais modernos, depende, essencialmente, das plantas para o cuidado primário da saúde. Para essa população, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos (ALKERELE, 1993; CALIXTO, 2000; VEIGA Jr, 2008).

O Brasil é um país rico em sua biodiversidade, detém de 15 a 20% da biodiversidade mundial. As plantas são utilizadas como substrato para a fabricação de medicamentos, e também em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. (BRASIL, 2006).

Além deste acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006).

2.2 Gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* é o mais importante gênero da família Passifloraceae, abrange aproximadamente 500 espécies e cresce extensivamente em regiões subtropicais e tropicais. No Brasil, a *Passiflora* é conhecida como maracujá, na Europa e América do Norte como fruto da paixão (SACCO, 1980; ZUCULOTTO *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Algumas características morfológicas são típicas deste gênero como hábito escandente, folhas alternas, estípulas, gavinhas, nectários extraflorais e corola composta de uma ou várias séries de filamentos ou lobos no ápice do hipanto (JUDD *et al.*, 2002; PLOTZE *et al.*, 2005).

Dentre essas espécies, as mais estudadas são: a *Passiflora alata* (*P. alata*) e a *Passiflora edulis* (*P. edulis*), as quais possuem monografia na Farmacopéia Brasileira 5ª ed (2010). O extrato das folhas da *P. alata* e *P. edulis* é utilizado como ativo no registro de formulações farmacêuticas brasileiras (ZUCULOTTO *et al.*, 2012). A *P. edulis* é a mais popular e largamente usada nos países da Europa e América como sedativo e tranquilizante (SILVA *et al.*, 2013). Nas espécies *P. edulis*, *P. alata* e *P. incarnata* estudos revelaram a presença dos flavonoides C-glicosilados, principalmente, da orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina como compostos majoritários (ZUCULOTTO *et al.*, 2009; ABOURASHED *et al.*, 2002).

São várias as propriedades farmacológicas atribuídas pela literatura ao gênero *Passiflora*, como, por exemplo, ansiolítica, sedativa, anti-inflamatória, antinociceptiva e anti-hipertensiva, diurética (DHAWAN *et al.*, 2004; RUDNICKI *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2012).

2.3 *Passiflora nitida* KUNTH

Na vasta biodiversidade amazônica encontramos a *P. nitida*, seu fruto silvestre (figura 1), comestível e de sabor exótico, apresenta componentes com potencial funcional como

fibras, vitaminas, carotenoides e componentes inorgânicos (cálcio, ferro, fósforo) flavonoides, esteroides e ácidos graxos (MORAES *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2012). É conhecido popularmente como maracujá do mato, maracujá suspiro, maracujá de rato (JUNQUEIRA *et al.*, 2007).



Figura 1 - Foto do fruto de *Passiflora nitida*
Fonte: Autora

Cresce espontaneamente na vegetação secundária, beira de rios e estradas, seus frutos são consumidos *in natura*. A *P. nitida* está dispersa por todo o norte da América do Sul. No Brasil está amplamente distribuída nos Estados do Amazonas, Pará, Piauí, Mato Grosso, Bahia, Tocantins, Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal (HOPKINS & SOUZA, 1999; JUNQUEIRA *et al.*, 2007, COHEN *et al.*, 2008).

Sobre sua morfologia externa, trata-se de uma herbácea ou lenhosa de folhas de superfície cartáceas a coriáceas, opacas e envernizadas. Apresenta nervuras terciárias distintamente percurrentes, retas e oblíquas. Suas nervuras secundárias apresentam glândulas terminais um pouco proeminentes, as margens são levemente dentadas (HOPKINS & SOUZA, 1999).

A *P. nitida* é usada na medicina tradicional para tratar distúrbios gastrointestinais, outras atividades farmacológicas relatadas na literatura são: atividade hipoglicemiante da farinha do mesocarpo desidratado, antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante e

antiagregante plaquetário dos extratos obtidos das folhas (BENDINI *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012).

Montefusco-Pereira *et al.* (2013) estudaram a inibição da síndrome metabólica, demonstrando que o extrato hidroetanólico das folhas de *P nitida* é agente ativo no tratamento de desordens causadas pelo estresse oxidativo, inflamação e hiperalgesia. Teixeira *et al.* (2013) relata a ação inibitória da lipase pancreática e efetiva atividade no tratamento alternativo em dislipidemias e obesidade visceral. Os extratos das folhas de *P nitida* apresentam grande potencial antioxidante, e esta atividade está atribuída às substâncias fenólicas e flavonoides presentes nas folhas desta espécie (LIMA *et al.*, 2009).

2.4 Flavonoides

Os flavonoides são compostos derivados a partir dos fenilpropanoides, os quais são conhecidos como unidades formadoras de compostos fenólicos de maior complexidade. Especificamente em relação à sua biossíntese, os flavonoides são formados através da condensação de duas rotas: ácido chiquímico e acetil-CoA, onde, respectivamente, há uma conjugação entre a molécula de 4-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA, originando a chalcona, principal composto intermediário da via de biossíntese dos flavonoides subsequentes (ZUANAZZI *et al.*, 2011; KHANAM *et al.*, 2012).

O núcleo fundamental dos flavonoides é constituído por 15 átomos de carbono que são distribuídos em três anéis A, C e B do tipo C₆-C₃-C₆ respectivamente. Diferenças no estado de oxidação do anel C caracterizam as principais classes de flavonoides, como: flavonóis, flavonas, flavanois (catequinas), flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. A variabilidade estrutural entre estes compostos está na estruturação dos anéis das agliconas, referentes ao seu estado de oxidação/redução, seu padrão, posição dos radicais hidroxilas, e também nas

diferenças entre os substituintes dos grupamentos hidroxila (DORNAS *et al.*, 2007; ZUANAZZI *et al.*, 2011).

Os flavonoides participam de importantes funções nos vegetais, como no seu crescimento e na defesa contra ataque de patógenos. Estão presentes na maioria das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, folhas, raízes e flores. As principais fontes são os frutos como: uva, maçã, frutas cítricas e as hortaliças como: tomate, espinafre, brócolis (DORNAS *et al.*, 2007).

As principais atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides C-glicosídeo são: antioxidante, anti-inflamatória, antiúlcera, anti-hiperglicêmica, e ação no sistema nervoso central (TALHI & SILVA, 2012).

A atividade antioxidante e anticancerígena atribuída aos flavonoides são determinadas pela presença de um número de hidroxilas em uma determinada posição e uma ligação dupla na posição $C_2 - C_3$ (BAE *et al.*, 2012). A atividade antioxidante também pode estar relacionada à capacidade de quelar metais, outra atividade ligada aos flavonoides é a proteção contra os danos na pele causados pelos raios ultravioletas (KODAMA *et al.*, 2010).

2.5 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações, eliminam os radicais livres e previnem os danos causados por eles. Os radicais livres têm sido há algum tempo relacionados à etiopatogenia de doenças graves como o câncer e o envelhecimento, por isso, ativos antioxidantes têm sido alvo de interesse para o tratamento e prevenção de patologias (RATNAN *et al.*, 2006).

A causa do estresse oxidativo está no desequilíbrio da balança entre o sistema protetor e a produção de radicais livres. O excesso de espécies reativas causa danos celulares como

perda de função e até mesmo morte celular. Desta maneira, o antioxidante é usado para proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres (SILVA *et al.*, 2013).

Atualmente, a busca por produtos naturais como fonte antioxidante é uma forte tendência, dentre as substâncias naturais potencialmente antioxidantes, os polifenóis têm recebido atenção especial devido às suas propriedades redutoras e estrutura química (LIMA *et al.*, 2009).

Uma vez que radicais livres e espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico, o peróxido e os superóxidos atuam como estimuladores da melanogênese por diversos mecanismos, substâncias antioxidantes que removam essas moléculas podem também inibir a síntese de melanina (CHANG, 2009; SCHAULLREUTER *et al.*, 2007). A maioria dos trabalhos que trata de inibição da tirosinase relaciona essa ação a uma atividade antioxidante. No entanto, esses antioxidantes, podem não estar inibindo a enzima, eles podem estar reduzindo novamente o produto da reação catalisada pela tirosinase ao seu precursor (CHANG, 2009).

As metodologias de avaliação da atividade antioxidante podem ser classificadas em duas categorias: baseadas na reação de transferências de elétrons, nesta englobam o método de quantificação de fenóis Folin-Ciocalteu, quantificação de flavonoides, DPPH e ABTS ou baseada na transferência de átomos de hidrogênio como método de inibição do anion radical superóxido (HUANG *et al.*, 2005).

2.6 Pele e melanogênese

A pele é a camada mais externa do corpo, assim, constitui uma barreira contra agressões externas, impede a perda de água e proteínas para o exterior, age como órgão sensorial e excreção de eletrólitos. Além disso, participa do sistema imunológico, da produção

de vitamina D3 e regulação da temperatura. A pele é constituída de três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (BAUMANN, 2004; RAWLINGS *et al.*, 2008).

A epiderme é composta por cinco camadas (basal, espinhosa, granulosa, lúcida e a córnea). A camada mais profunda e mais importante é a camada basal, germinativa, pois nela estão as células capazes de divisão mitótica, responsáveis pela regeneração da epiderme. Na camada basal estão situados os melanócitos, células que formam a melanina (KEDE & SABATOWICK, 2004).

A derme, localizada abaixo da epiderme, tem origem mesodérmica e é formada por fibras colágenas, elásticas, substância amorfa produzida pelos fibroblastos. É nesta região que ficam os vasos, nervos, músculos eretores do pelo e os anexos cutâneos (QUINN, 2004). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como isolante térmico, reserva energética e na proteção contra choques mecânicos (CAMARGO, 2008).

A Melanina é um biopolímero único, pigmentado, sintetizado por células especializadas conhecidas como melanócitos durante a melanogênese (OH *et. al.*, 2010). É responsável pela pigmentação dos olhos, dos cabelos e da pele, também está associada à proteção da pele contra a radiação solar (OLIVERIA *et. al.* 2014). A melanogênese é um processo complexo regulado por vários fatores intrínsecos e extrínsecos (HUANG *et al.*, 2012). Ocorre nos melanócitos, dentro dos melanossomos e pode ser estimulados por estres, inflamação, radiação ultravioleta (UV) e hormônios (HUANG *et. al.*, 2011).

Nos melanossomos, pelo menos três enzimas são necessárias para a produção de melanina: a tirosinase, as proteínas relacionadas à tirosinase (TRPs) e a dopacroma tautomerase (DCT). A TRP 1 é a glicoproteína mais abundante no melanócito e participa de reações subseqüentes à tirosinase controlando a síntese de melanina, no entanto, ela ocorre apenas nos eumelanossomos. A dopacroma tautomerase é uma enzima que atua nas etapas subseqüentes a ação da tirosinase convertendo a melanina em seus diferentes tipos. Das três

enzimas a mais importante é a tirosinase (figura 2) devido às reações que catalisa (SIMON *et al.*, 2009; YAMAGUCHI & HEARING, 2009).

A tirosinase (E.C.1.14.18.1) é uma enzima limitante na produção da melanina e tem como cofator ativo o cobre, uma monooxidase amplamente distribuída em bactérias, fungos, plantas e animais (GARCÍA-MOLINA *et al.*, 2013).

A tirosinase catalisa a hidroxilação da tirosina para 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), e segundo, catalisa a oxidação da DOPA para dopaquinona (PARKA *et al.*, 2011). A dopaquinona entra em duas vias separadas, levando à síntese de eumelanina ou feomelanina. A TRP-1 e TRP-2 participam da síntese da eumelanina (VILLAREAL *et al.*, 2010).

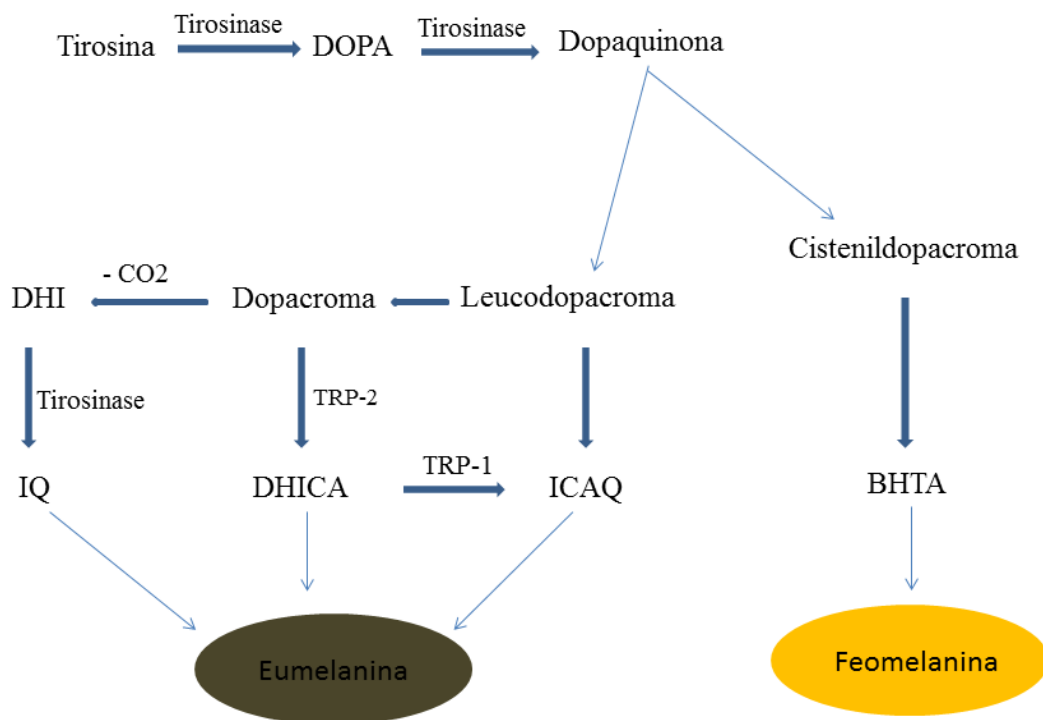


Figura 2 – Esquema da atuação da tirosinase na regulação da melanina

FONTE: Adaptado de Chang *et al.*, 2009.

Legenda: TRP: proteínas relacionadas a tirosinase, dopa: 3,4- dihidroxifenilalanina; DHICA: 5,6-di-hidroxi-indol-2- ácido carboxílico; DHI: 5,6- dihidroxi-indol; ICAQ: indol-2-carboxílico acid-5,6-quinona; IQ: indol-5,6-quinona; HBTA, 5-hidroxi-1,4-benzotiazinil-alanina.

A radiação UV é um dos fatores ambientais implicados na alteração da síntese de melanina. A produção excessiva de melanina em resposta ao seu efeito fotoprotetor ou

propriedades fototóxicas geram efeitos nocivos à pele, aumentando, por exemplo, o risco de melanoma maligno, especialmente em indivíduos de pele clara. Relata-se que a radiação UV-A (400-315nm) desencadeia a melanogênese em associação com o estresse oxidativo (LIU *et al.*, 2012).

A maioria das desordens pigmentares raramente é associada com doenças sistêmicas, entretanto, podem ser uma fonte de desconforto e grande estresse emocional para os pacientes (ROSE, 2009). Dentre os diversos tipos de manchas pigmentadas formadas na pele humana, as mais comumente observadas são as sardas, lentigos solares e melasma (IRIYAMA *et al.*, 2011).

2.7 Uso de cosméticos no Brasil e no mundo

A utilização em grande escala de produtos cosméticos data do antigo Egito como, por exemplo, o uso do verde malaquita como sombra, o extrato vegetal de *henna* para tingir o cabelo e o uso do leite de cabra durante o banho para amaciar a pele. Ao final do século XIX estavam consolidadas, no mercado internacional, diversas empresas produtoras de cosméticos, o que coincidiu com a melhoria das instalações sanitárias e o avanço das inovações tecnológicas (ABDI, 2009).

No século XX, o desenvolvimento tecnológico e o conhecimento científico se aprimoraram, as formulações se tornaram mais eficientes e seguras. Começa a evolução da cosmética firmada em bases científicas, em informações técnicas, formulações criteriosamente preparadas em laboratórios (cujos dispêndios em pesquisa se elevam a cada ano), com exigências fiscais quanto à qualidade e segurança do produto (ABDI, 2009).

Segundo a ABIHPEC (2014), o setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) é um dos que mais cresce e de maior investimento em inovação. O crescimento de 1996 a 2013 foi acima da inflação, perto de 10% ao ano e o faturamento líquido de impostos

sobre vendas passou de 4,9 bilhões de reais em 1996 para 38 bilhões de reais em 2013. Assim, o Brasil manteve o título de terceiro mercado consumidor do mundo em 2013. A indústria de HPPC é o segundo setor em inovação, ficando atrás apenas do setor farmacêutico.

Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA como: 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. (BRASIL, 2014)

2.8 Desenvolvimento de formulações com ativo de origem vegetal

A administração de agentes terapêuticos necessita da sua incorporação em uma forma farmacêutica, caracterizada normalmente pelo estado físico de apresentação, constituída de componentes farmacologicamente ativos e de adjuvantes farmacêuticos. A escolha da forma farmacêutica mais apropriada para um produto fitoterápico deve considerar a eficácia e a segurança do componente ativo e assegurar sua qualidade (TOLEDO *et al.*, 2003).

As preparações farmacêuticas semissólidas incluem as pomadas, pastas, emulsões cremosas, géis, unguentos. São geralmente desenvolvidas para exercer ação local, aplicadas na pele ou membrana mucosa, embora também possam ser empregadas para administração transdérmica. Apresentam como propriedade comum a capacidade de adesão à superfície de aplicação por um período razoável de tempo antes de serem removidas. Esta adesão deve-se ao comportamento reológico plástico que permite os semissólidos manter a sua forma e aderir como um filme até a aplicação de uma força externa que o faça deformar e fluir (IDSON & LAZARUS, 2001; FERREIRA, 2008)

As emulsões são muito utilizadas na área farmacêutica, pela capacidade de veiculação de princípios ativos hidrossolúveis e/ou lipossolúveis, pela diminuição da irritabilidade dérmica de certos fármacos e, principalmente, pela boa aceitação por parte do paciente. Este fenômeno explica-se pelo fato de a emulsão possuir facilidade no processo de aplicação e remoção em caso de alergia. As emulsões são amplamente usadas para a hidratação da pele (CASTELI *et al.*, 2008; RIEGER, 2001; MILAN *et al.*, 2007).

Uma emulsão é um sistema que consiste em duas fases líquidas imiscíveis, uma das quais se encontra dispersa no meio de outra na forma de finas gotículas. Um terceiro componente, o agente emulsificante, é necessário para estabilizar as emulsões, os agentes emulsionantes podem ser aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros (ATTWOOD, 2005; BILLANY, 2005).

A composição básica de uma emulsão envolve: a fase aquosa na qual deve ser solubilizados todos os componentes hidrossolúveis da formulação. A fase oleosa constituída por óleos ou ceras. O agente emulsificante que proporciona estabilidade à emulsão, reduzindo a tensão superficial entre o óleo e a água e retardando a separação das fases. O antioxidante para evitar a degradação por oxidação dos óleos e gorduras, ex: BHT. Conservantes que previnem o crescimento de fungos e bactérias. Sequestrante, substância que complexa íons metálicos, por exemplo, o EDTA-Na. Corantes e essência são opcionais (FERREIRA, 2008).

As emulsões contendo emulsionante não iônico são amplamente empregadas em formulações cosméticas devido às suas características como, por exemplo, compatibilidade com pH cutâneo, estabilidade frente a diferentes valores de pH e possibilidade de incorporações de diferentes substâncias ativas (MILAN *et al.*, 2007).

Os géis são sistemas semissólidos em que uma fase líquida está confinada dentro de uma matriz polimérica tridimensional, formada por um polímero natural ou sintético. A composição básica envolve o agente gelificante ou espessante (exemplo: gomas, derivados de

celulose, carbômeros), veículo (água, água e álcool), conservantes, estabilizantes, e umectantes como opcional. Os géis apresentam propriedade reológica pseudoplástica e tem como vantagem o pressuposto de que o fármaco não irá se ligar ao polímero e, desta maneira, facilita a liberação do fármaco (IDSON & LAZARUS, 2001; BARRY, 2005).

Para o desenvolvimento de uma formulação estável é necessário conhecer as propriedades físico-químicas dos ativos, excipientes e suas combinações. Este estudo para cada formulação é chamado de estudo de pré-formulação. (MAMEDE *et al.*, 2006)

O passo determinante no desenvolvimento de uma formulação cosmética envolve o estudo de estabilidade, tem por objetivo de prever alterações físicas, físico-químicas, químicas e microbiológicas que possam ocorrer desde a fabricação até ao fim da data de validade do produto, bem como, fornecer informações para a melhoria da formulação, em caso de manifestações de instabilidade e/ou de incompatibilidade entre os ingredientes (BRASIL, 2004; NISHIKAWA *et al.*, 2007; BABY *et al.*, 2008).

Na área cosmética não existe nenhum protocolo oficial para os testes de estabilidade. No entanto, a ANVISA publicou em 2004 o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos que fornece subsídios para o estudo da estabilidade (BRASIL, 2004).

O guia de estabilidade recomenda realizar o teste de centrifugação antes de iniciar as etapas do estudo de estabilidade, se aprovado no teste de centrifugação o produto pode seguir para as etapas da estabilidade: preliminar, acelerada e longa duração. A estabilidade pode ser avaliada pela determinação do valor do pH, viscosidade, densidade, condutividade elétrica, umidade, tamanho de partículas, entre outros (BRASIL, 2004).

Na estabilidade preliminar o objetivo é auxiliar na escolha das formulações, por meio de condições extremas de temperaturas (ciclos de gelo e degelo) a fim de acelerar possíveis incompatibilidades e sinais de instabilidade, a duração é de aproximadamente 15 dias. A estabilidade acelerada tem duração aproximada de 90 dias, usa condições menos extremas de

temperaturas e serve para auxiliar na determinação da estabilidade da formulação. E para acompanhar o produto durante toda sua validade é realizado a estabilidade de longa duração (BRASIL, 2004).

Uma forma de agregar valor a um produto natural é transformá-lo em um fitocosmético que pode ser definido como um cosmético que contém ativo de origem vegetal seja um extrato, óleo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto (ISAAC *et al.*, 2008).

2.9 Reologia

A avaliação das características reológicas de cremes e loções é de fundamental importância, pois serve como auxílio na avaliação da qualidade e estabilidade da formulação (BORGHETTI & KNORST, 2006).

A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo (sistemas líquido, semissólidos e sólidos) quando submetido a uma tensão. A reologia envolve conceitos de viscosidade, elasticidade e plasticidade, taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento (WOOD, 2001).

A viscosidade é a medida da resistência interna de uma substância ao fluxo quando submetida a uma tensão. Diz-se que a deformação é elástica se o material adquire sua forma inicial, ou plástica se a deformação permanece. Existem os materiais com propriedades intermediárias, conhecidos como viscoelásticos (WOOD, 2001).

Para quantificar a reologia, a tensão de cisalhamento é medida em função da taxa de cisalhamento, e a representação gráfica entre tensão *versus* taxa de cisalhamento é denominada reograma (ALVES, 2006). Desta maneira, a viscosidade pode ser calculada pela formulação a seguir, a unidade usual é centiPoise (cP) e no Sistema Internacional miliPascal.segundo (mPa.s).

$$\eta = \tau / \gamma$$

De acordo como o comportamento assumido pelo sistema estudado os fluxos podem ser newtonianos ou não newtonianos. O fluxo newtoniano (figura 3) caracteriza-se por apresentar viscosidade constante independente da taxa de cisalhamento (ALVES, 2006). Normalmente são materiais quimicamente puros ou soluções com soluto de massa molar reduzida (WOOD, 2001).

Os fluidos não newtonianos não apresentam uma relação linear direta entre tensão e taxa de cisalhamento aplicado. Nos fluidos não newtonianos a viscosidade varia com a velocidade do cisalhamento ou taxa de cisalhamento. É um comportamento observado em grande número de sistemas como suspensões, emulsões, pomadas e géis. (MARRIOTT, 2009). Os fluidos não newtonianos podem apresentar diferentes comportamentos, determinando diferentes tipos de reograma como: plástico de Bingham, pseudoplástico, dilatantes (figura 3).

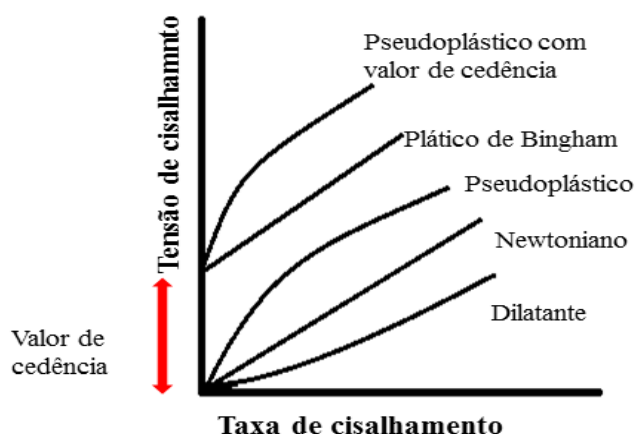


Figura 3 - Comportamentos reológicos

FONTE: Adaptado de KAWATARA *et al.*, 1996.

Várias formulações farmacêuticas e cosméticas apresentam o comportamento pseudoplástico, especialmente géis e emulsões (KIM *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2004; MILAN *et al.*, 2007).

No comportamento pseudoplástico o fluxo é iniciado e a viscosidade varia com o aumento da tensão, ou seja, o material começa a fluir quando uma tensão de cisalhamento é aplicada, a deformação pode ocorrer com certa dificuldade, mas uma vez iniciada torna-se progressivamente mais fácil com o aumento sucessivo da força ou tensão aplicada (WOOD, 2001; ALVES, 2006).

Os materiais que exibem esse tipo de fluxo incluem dispersões aquosas de hidrocoloides ou quimicamente modificadas. A presença de moléculas longas, de elevada massa molecular, em solução resulta no embaraçamento destas moléculas em associação com o solvente imobilizado. Pela influência da tensão as moléculas tendem a tornar-se desembaraçadas e alinhar-se na direção do fluxo. Desta forma, passam a oferecer menor resistência ao fluxo, aliado a este fato, ocorre a liberação de água que estava aprisionada, contribuindo para a diminuição da viscosidade (MARRIOTT, 2009).

Quando a tensão diminui a estrutura pode ou não se recuperar imediatamente. Se houver recuperação imediata, os ramos ascendentes e descendentes dos reogramas são idênticos e se sobrepõem. Contudo, se a estrutura não se recupera, imediatamente, o reograma descendente apresentará valores de tensão inferiores aos do reograma ascendente para cada valor de taxa de cisalhamento. Materiais desse tipo apresentam tixotropia, representada pela histerese (figura 4) que é caracterizada pela área formada entre as curvas ascendentes e descendentes obtidas no reograma (WOOD, 2001).

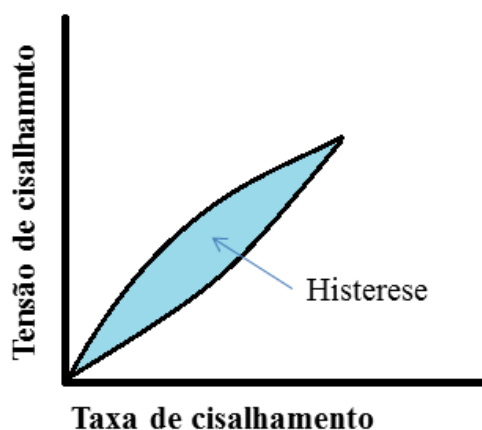


Figura 4 - Comportamento tixotrópico e histerese
 FONTE: Autora

A tixotropia é um fenômeno que indica o desmonte da estrutura tridimensional e tem especial interesse na tecnologia farmacêutica de semissólidos, pois produtos tixotrópicos tornam-se mais fluidos quando submetidos a uma pressão externa e, conseqüentemente, espalham-se mais facilmente na região onde são aplicados. (MAZZARINO E KNORST, 2007).

2.10 Extrato seco por atomização (*Spray Dryer*)

Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresentam no mínimo 95% de resíduo seco, calculado como percentagem de massa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)

O processo de secagem por atomização, figura 5, consiste de três etapas fundamentais: Na primeira fase, o fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação de partículas sólidas. Com a transferência de calor do ar aquecido às gotículas, o líquido da superfície evapora-se rapidamente. As partículas solidificadas geralmente apresentam o mesmo tamanho e forma da gotícula que as originou. Na última etapa, o produto de secagem é transportado por uma

corrente de ar sendo posteriormente coletado (RANKELL *et al.*, 2001; OLIVEIRA & PETROVICK; 2010)

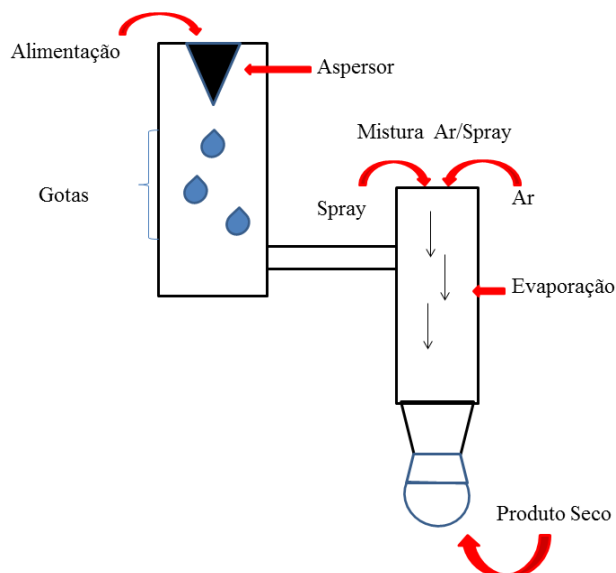


Figura 5 - Esquema do processo de secagem por aspersão

FONTE: Autora

As variáveis devem ser controladas visando à obtenção de rendimento e de teor de umidade adequados, estabilidade química, minimização da aderência de partículas na câmara de secagem e características tecnológicas específicas. Os fatores que influenciam o processo de secagem são: influência do material de entrada e as influências do processo operacional (OLIVEIRA & PETROVICK; 2010).

Com relação ao material de entrada o uso de adjuvante na secagem é um fator importante, sua correta seleção, a concentração usada. Em relação ao processo, um dos parâmetros de maior importância é a temperatura do ar de entrada, o aumento na temperatura do material de entrada facilita o processo de secagem, pois normalmente reduz a tensão superficial e a viscosidade, facilitando a formação de gotículas (SOARES, 2002). A temperatura de entrada deve estar acima do ponto de ebulição do solvente utilizado (OLIVEIRA & PETROVICK; 2010).

O método de secagem por atomização é considerado um dos mais importantes processos para a indústria farmacêutica, especialmente, por causa das vantagens apresentadas como a capacidade de produção de pós com tamanho de grânulos mais uniformes, aplicabilidade a produtos termolábeis, produção de pó com quantidade mínima de solvente residual (ARARUNA *et al.*, 2013).

O tempo de permanência do material no interior da câmara de secagem é relativamente pequeno, o que torna este processo adequado para a secagem de produtos termolábeis, como os extratos vegetais. O pó obtido por esta tecnologia geralmente é solúvel em água e muito apreciado pela sua fluidez, atribuída à forma esférica das partículas obtidas (SILVA *et al.*, 2012).

Para as finalidades industriais o extrato seco apresenta várias vantagens em relação às formas líquidas, maior estabilidade, maior facilidade no manuseio, no transporte e no armazenamento (COUTO *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver formulações semissólidas com finalidade antienvelhecimento e clareadora da pele utilizando o extrato seco das folhas da *P. nitida*.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a Droga vegetal;
- Caracterizar os extratos secos de *P. nitida*, obtidos por aspersão, e definir uma concentração de trabalho;
- Avaliar o potencial antioxidante e a atividade inibição da tirosinase *in vitro* no extrato seco de *P. nitida*;
- Desenvolver cremes e gel-creme e avaliar a estabilidade para a seleção da melhor formulação;
- Realizar o perfil reológico da formulação selecionada;
- Avaliar a citotoxicidade e a capacidade de redução da melanogênese no extrato seco de *P. nitida* e na formulação selecionada.
- Definir uma metodologia analítica para o controle de qualidade do extrato seco de *P. nitida* e formulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As folhas foram obtidas de cultivo na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, localizada na estrada AM 010, Km 29, Manaus-Itacoatiara. A coleta foi realizada pelos mateiros da Embrapa em agosto de 2012 sob orientação do Dr. Francisco Célio Maia Chaves, engenheiro agrônomo e pesquisador da Embrapa.

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçado a 40° C por cinco dias e depois foram trituradas em moinho de facas. A Droga Vegetal (DV) foi acondicionada em recipientes opacos, à temperatura ambiente. A exsicata está depositada no herbário do Instituto nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA sob nº 209547.

4.2 Caracterização da Droga Vegetal

4.2.1 Análise granulométrica por tamisação

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), cerca de 25,0 g da DV foram pesados e submetidos à passagem através de tamises com abertura de malha de 2,00; 1,00; 0,850; 0,710; 0,600; 0,500; 0,425; 0,355 0,250 mm e coletor. A tamisação foi realizada, em tamisador, a 60 vibrações por segundo durante 15 min. As frações retidas nos tamises e o coletor foram pesados e os dados analisados por método gráfico. Foi construído o histograma de distribuição, a fim de se obter a distribuição das partículas do pó. Os resultados expressam a média de triplicatas. O tamanho médio das partículas foi calculado por método aritmético, conforme a equação:

$$d \text{ médio} = \frac{\sum (AM \cdot Fr\%)}{100\%} \quad (1)$$

Onde: d médio = diâmetro médio aritmético (mm); AM = abertura média de malha (mm) e a Fr% = fração retida percentual em cada tamis (Allen *et al.*, 2007).

4.2.2 Determinação da perda por dessecação

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), 0,5 g da amostra foi pesado e colocado em pesa-filtro, previamente tarado. O pesa-filtro foi levado para a estufa a $105 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, retirada a tampa, deixando-o também na estufa, por um período de 2 horas. O pesa-filtro foi esfriado em dessecador por 20 minutos e pesado. Este procedimento foi repetido até peso constante. Em seguida, foi calculada a diferença de peso entre a amostra inicial e a final determinando-se a perda por dessecação. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3 Teor de extrativos

Seguindo a metodologia de BUNDESVEREINIGUNG (1986), 1,0 g da DV foi transferido para um erlenmeyer e foi adicionado 100 mL de água destilada, e o conjunto foi pesado e submetido à extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento, pesou-se novamente o conjunto, reconstituiu-se a massa inicial com água destilada e filtrou-se desprezando os primeiros 20 mL do filtrado. Cerca de 20 g do filtrado, pesados, foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporados à secura em banho-maria, com agitação ocasional. Após a evaporação, o pesa-filtro, contendo a amostra, foi levado à estufa $105 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante, calculando-se o teor de sólidos. O resultado foi expresso em triplicata e o teor extrativo foi calculado segundo a equação abaixo:

$$TE = (gxFD \times 100) / (m - pd) \times 100 \quad (2)$$

Onde; TE= teor de extrativos (% m/m); g= massa (g) do resíduo seco, FD= constante igual a 5; m= massa da amostra inicial (g); pd= perda por dessecação da amostra (m/m).

4.2.4 Cinzas Totais

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), 3 g da amostra foram pesados, transferidos e distribuídos uniformemente em cadinhos, previamente tarados. As amostras foram incineradas em mufla a 500 °C até que todo carvão fosse eliminado, em seguida os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.5 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia de MOREIRA (1979). Pelo método de maceração preparou-se um extrato hidroalcoólico a 20% e outro extrato aquoso a 20% da droga vegetal em estudo. A partir desses extratos foi determinada a presença dos seguintes grupos químicos:

- Extrato hidroalcoólico 20%: alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, flavonoides, cumarinas, antraquinonas e triterpenos e/ou esteroides.
- Extrato aquoso 20%: glicosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogenéticos, gomas, taninos e mucilagens, taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos, ácidos voláteis e ácidos fixos.

4.2.5.1 Pesquisa de alcalóides

Foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcaloides (Mayer, Dragendorff, Bouchardart e Berthrand) da seguinte forma: levou-se a secura 25 mL do extrato hidroalcoólico em banho-maria, seguido de dissolução do resíduo em um mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se o extrato clorídrico em cinco tubos de ensaio (um mL em cada tubo) e adicionou-se em cada um os reativos mantendo o quinto tubo como branco. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Para contraprova, 15 mL do

extrato hidroalcoólico foram transferidos para um funil de separação e alcalinizados com hidróxido de amônio até pH 10. Efetuou-se extração com a mistura éter/clorofórmio (3:1) e submeteu-se o extrato às mesmas reações de alcaloides.

4.2.5.2 Pesquisa de ácidos orgânicos

O excedente da solução etérea da pesquisa de alcaloides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

4.2.5.3 Pesquisa de fenóis

Utilizou-se um volume de 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos adicionando 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração entre o azul e o vermelho confirma a presença de fenóis.

4.2.5.4 Pesquisa de flavonoides

Os flavonoides foram pesquisados pela reação de Shinoda, ou reação de cianidina. Em um tubo de ensaio transferiu-se um volume de 5 mL de extrato hidroalcoólico e adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. A formação de cor alaranjada indica presença de flavonóis.

4.2.5.5 Pesquisa de cumarinas

Foi transferido para um béquer 15 mL de extrato hidroalcoólico depois foi acidificado até pH 1, concentrado em banho-maria a 60°C até 7 mL. Foram adicionados ao resíduo 5 mL de água deionizada e extraído em funil de separação com éter etílico em 3 porções de 5 mL. O volume do extrato orgânico foi reduzido para 5 mL em banho-maria a 60 °C. Aplicou-se 3

gotas do extrato etéreo em 2 pontos de um papel de filtro previamente marcado, deixando secar para em seguida adicionar 1 gota de hidróxido de sódio 1N em cada mancha. Cobriu-se uma das manchas com moeda e observou-se em luz UV de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

4.2.5.6 Pesquisa de antraquinonas

Foi levado à fervura 10 mL do extrato alcoólico por 7 minutos sob refluxo, adicionando 1,5 mL de ácido sulfúrico 10%. Após o resfriamento foi transferido para um funil de separação junto com 15 mL de água destilada e fez-se 3 extrações com 5 mL de tolueno. O extrato toluênico foi concentrado a 5 mL e transferido para um tubo de ensaio. Agitado com 5 mL de solução reagente de hidróxido de sódio. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas.

4.2.5.7 Pesquisa de triterpenos e/ou esteroides

Foram evaporados 10 mL do extrato alcoólico e extraído por 3 (três) vezes sucessivas com 3 mL de diclorometano. Concentrou-se os extratos obtidos a um volume de 3 mL e transferiu-se para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente adicionaram-se 3 gotas de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul passando a verde demonstra a presença de esteroides e /ou triterpenos.

4.2.5.8 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 3 porções de 3 mL do extrato aquoso em 3 tubos de ensaio e foram neutralizados com solução de hidróxido de potássio 5% até obter o pH 5,5 (pH do extrato aquoso), 7,0 (neutro) e 9,5 (básico). Mudança na coloração das porções neutralizadas indica presença de heterosídeos antociânicos.

4.2.5.9 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitou-se os 3 tubos obtidos no ensaio anterior energicamente durante 5 minutos. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%.

4.2.5.10 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Transferiram-se 10 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Adicionaram-se 1 mL de ácido sulfúrico 1N e então prenderam-se com auxílio de uma rolha uma tira de papel picro-sódico dentro do tubo. Levou-se o tubo de ensaio ao banho Maria em temperatura de 60 °C por 30 minutos. A formação de cor vermelha no papel indica a presença de heterosídeos cianogenéticos.

4.2.5.11 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

A duas porções de 5 mL do extrato aquoso foram adicionadas 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10%. A formação de precipitado é indicativa da presença de gomas, taninos e mucilagens.

4.2.5.12 Pesquisa de taninos

Foi adicionado 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. Na formação de precipitado escuro, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 mL e nele acrescentou-se 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. Levaram-se a mistura para o refluxo por 1 hora. Após seu resfriamento, filtrou-se a solução e o material retido foi lavado com água destilada e álcool.

Se no material retido no filtro houver a formação de cor pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, indica a formação de taninos condensados. Se

no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10 gotas de cloreto férrico 1%, houver formação de precipitado escuro ou azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.5.13 Pesquisa de aminogrupos

Foram concentrados 10 mL de extrato aquoso à metade a temperatura de 50 °C. Em um papel de filtro, colocou-se 5 gotas do extrato concentrado e após secar, o papel foi nebulizado com solução butanólica de ninhidrina. Em seguida foi aquecido em estufa a 90-100 °C por 15 minutos. Se houver o aparecimento de cor azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.2.5.14 Pesquisa de ácidos voláteis

Foi acidificado 10 mL do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1 N e levado para ferver em um tubo de ensaio em banho-maria. Com papel indicativo de pH mediram-se a acidez dos vapores.

4.2.5.15 Pesquisa de ácidos fixos

Foi transferido 20 mL de extrato para um balão de destilação juntamente com 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1N. Levando o conteúdo ao refluxo por 30 minutos, após resfriar foi acidificado com ácido sulfúrico 1N e extraído 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, filtrados e levado à secura. O resíduo foi aquecido durante 10 minutos a 100 °C e após, adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1N, filtrou-se novamente e transferiu-se para um papel de filtro 3 gotas de modo a obter uma mancha de 1 cm de diâmetro. Secou-se o papel em estufa a 100 °C por 10 minutos e então foi tratado com o Reagente de Nessler.

4.3 Obtenção da Solução Extrativa

Para o preparo da solução extrativa foram utilizadas as folhas de *P. nitida*, a solução extrativa de 5 %, 7,5 % e 10 % (m/v) foi obtida utilizando-se, respectivamente, 50 g, 75 g e 100 g de DV para 1000 ml de solvente hidroetanólico a 20% (v/v). Os extratos líquidos foram macerados por 48h, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Depois foram submetidos à filtração com gazes e algodão e, posteriormente, a filtração a vácuo.

4.4 Obtenção do extrato seco por atomização (Spray Dryer)

O volume de 1000 mL da solução extrativa 5%, 7,5% e 10% (m/v) foi submetido à secagem em Spray Dryer LM MSD 1.0 da empresa Labmaq do Brasil Ltda. Nas seguintes condições: temperatura de entrada e saída de 115/80 °C, fluxo de 85%, vazão de 11 mL/min. E assim foram obtidos os extratos secos de *P. nitida* nas concentrações de 5 %, 7,5 % e 10 %.

4.5 Caracterização da solução Extrativa

4.5.1 Determinação do valor do pH para solução extrativa

Seguindo a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª ed (2010), após a calibração com solução tampão de pH 7,0 e 4,0, o eletrodo foi lavado com água e inserido diretamente na amostra líquida à temperatura de 25°C.

4.5.2 Determinação da densidade relativa para solução extrativa

Seguindo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), foi utilizado o método do picnômetro, onde o mesmo foi pesado vazio e depois pesado com a amostra, após a remoção do excesso das substâncias se necessário. O picnômetro também foi pesado com água. A

obtenção do peso da amostra ocorreu pela diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O cálculo da densidade relativa foi determinando pela razão da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20°C.

4.5.3 Determinação do resíduo seco para solução extrativa

Seguindo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010) com modificações, foi transferido 2 mL ou 2g de extrato para os pesa-filtro. O pesa-filtro com amostra foi levado para evaporar até secar em banho-maria e dessecar em estufa a 100- 105 °C, por 3 horas. Depois, deixado em dessecador por 30 minutos para esfriar e pesado. Levado para a estufa por uma hora, deixado em dessecador e depois pesado, o procedimento foi repetido até peso constante. Calculado o resíduo seco em porcentagem sobre a massa ou sobre o volume.

4.6 Caracterização do Extrato Seco de *P. nitida* (ESPN)

4.6.1 Análise de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz (granulometria a laser)

A amostra foi dispersa em uma solução de tensoativo Triton 100 X a 0,02 % e em seguida submetidas a ultrassom por 3 minutos. Para análise da distribuição granulométrica foi utilizado um analisador de distribuição de partícula Microtac, modelo S3500, com tempo de medida de 10 segundos, fluxo de 70 %, distribuição por volume e utilizando o método Fraunhofer. Análise realizada em Parceria com o Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

4.6.2 Área superficial específica e diâmetro dos poros (S_{BET})

A análise foi realizada usando a técnica de adsorção de nitrogênio aplicando-se o modelo proposto por Brunauer, Emmett e Teller [BET] (MAXIMIANO *et al.* 2010; USP 30). Uma amostra de aproximadamente 200 mg do ESPN foi transferida para o tubo de amostra e foi degaseificada por 72 h a 120 °C para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material. Foi utilizado um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros – ASAP 2420 Micromeritics, munido de software próprio para determinar a área superficial (S_{BET}) e porosidade. Análise realizada em Parceria com o Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

4.6.3 Fluorescência de raios-X por dispersão de ondas

As amostras foram impregnadas em papel de filtro, próprio para análise. Uma amostra do papel de filtro em branco teve seus dados coletados, para servir de referência durante o processo de análise. As amostras tiveram seus dados coletados nas mesmas condições do papel de filtro. Foram analisados também a água utilizada no preparo dos extratos, bem como amostras de algodão, álcool e papel de filtro usado na filtração dos extratos.

Para todas as análises, foi empregado o método de fluorescência de raios-X por dispersão de onda (WDXRF), utilizando-se o equipamento modelo Rigaku® Supermini, com tubo de paládio, tempo de exposição de 200 s, com potência de 200 W. As condições foram ajustadas, levando-se em consideração a matriz da amostra, o porta amostras, e o suporte da amostra. Todos os elementos foram identificados por suas energias $K\alpha$ e/ou $K\beta$ (K. JANSSENS, 2003).

Padrões de referência geológicos tais como GBW 3125, 7105 e 7113 foram utilizados para calibração do equipamento. Através de softwares matemáticos relacionam-se os picos de emissão com as respectivas concentrações de um determinado elemento.

Para cada elemento encontrado foi realizada a quantificação utilizando-se padrões externos de sais de pureza conhecida, diluídos em ácido bórico, também de pureza conhecida, em pelo menos seis concentrações pré-determinadas, os quais foram submetidos às mesmas condições de análise das amostras. Análise foi realizada em parceria com o grupo de Pesquisa Crowfoot da Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

4.6.4 Análise Térmica

Os estudos de análise Térmica foram realizados em parceria com a Universidade Federal de Sergipe, no laboratório do Professor Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo.

4.6.4.1 Calorimetria exploratória diferencial ou DSC

A Calorimetria exploratória diferencial foi realizada utilizando DSC-60, operado a uma temperatura de 25-500 ° C. Aproximadamente 3 mg de amostra foram colocadas em cápsulas de alumínio plana, em seguida, submetido a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sob atmosfera de ar sintético (50 mL.min⁻¹). O calorímetro foi calibrado com um padrão de referência de índio e zinco. Os ciclos de aquecimento e de refrigeração-aquecimento foram realizados a fim de confirmar os fenômenos térmicos.

4.6.4.2 Termogravimetria (TG)

A caracterização termoanalítica através da curva TG foi realizada em duplicata por meio de termobalança, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa da amostra de cerca de 5 mg ($\pm 0,4$), acondicionada em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 30 a 600 °C na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

4.6.5 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação de fenóis totais presentes no extrato seco das folhas de *P. nitida* foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo SINGLETON E ROSSI (1965) com modificações. Primeiramente foram preparadas soluções de 1 mg/mL dos extratos secos de 5 %, 7,5 % e 10 % (m/v). Em placas de 96 poços foram adicionados 50 µL de Folin-Ciocalteu (Sigma) a 10 µL de extrato/ácido gálico/ água. Para eliminar a leitura referente à cor dos extratos e do ácido gálico foi preparado o branco com 10 µL do extrato ou do ácido gálico a 50 µL de água. A microplaca foi incubada a 37 °C por 8 minutos e realizada primeira leitura no leitor de Elisa DTX 800 (Beckman Coulter) a 715 nm. Após essa leitura, foram adicionados 240 µL de Carbonato de sódio a 0,4%. A placa foi incubada por três minutos e realizou-se a segunda leitura. O teste foi realizado em triplicata. O teor de polifenóis em mgEAG/mg do extrato foi calculado a partir da fórmula gerada pela curva de ácido gálico e convertida para ser expressa em termos de porcentagem por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ Fénois Totais} = (\text{mgEAG} / \text{mgextrato}) \times 100 \quad (3)$$

4.6.6 Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada, segundo metodologia utilizada por CHANG *et al.* (2002), com modificações. Primeiramente, os extratos foram diluídos em etanol na concentração de 0,5 mg/mL. Em seguida, foi adicionado 30 µL de extrato ou padrão - quercetina (diluída em etanol 80% na concentração de 0,5 mg/mL) e 90 µL de etanol em cada cavidade da microplaca. Logo após, foi adicionado 6 µL de cloreto de alumínio a 10% e 6 µL de acetato de potássio (1 mol/L), ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, adicionou-se mais 168 µL de água destilada. E para o branco, foram utilizados 30 µL de extrato e/ou padrão (quercetin) e 270 µL de etanol. A placa, então, foi incubada por 30 min

em temperatura ambiente e, em seguida, foi realizada a determinação da absorbância no comprimento de onda de 405 nm, em leitor ELISA (DTX 800, Backman Counter). O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram obtidos utilizando-se, primeiramente, a diferença das absorbâncias das amostras e do padrão pela absorbância dos respectivos brancos. Logo após, foi calculada a determinação da concentração de flavonoides em percentagem.

$$\text{Flavonoides Totais \%} = (\text{Abs Amostra} - \text{Abs branco} / \text{Abs Padrão} - \text{Abs branco}) \times 100 \quad (4)$$

Onde: Abs = absorbância

4.6.7 Atividade sequestrante do radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da capacidade dos antioxidantes, presentes nas amostras, em sequestrar o radical estável DPPH, segundo metodologia utilizada por MOLYNEUX (2004), com modificações. Foi adicionado primeiramente, em cada cavidade da microplaca 270 µL de DPPH (1 mg/mL) e 30 µL das soluções das amostras e/ou padrão (quercetin), na concentração de 100 µg/mL, com suas respectivas diluições. Para o controle, foram utilizados 270 µL de DPPH e 30 µL de etanol. A placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente no escuro e a leitura realizada em 517 nm. Os cálculos de inibição foram feitos mediante formula a seguir:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times [1 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs controle}) / \text{Abs controle}] \quad (5)$$

Onde: Abs = absorbância

4.6.8 Ensaio de varredura do radical ABTS

A determinação de atividade antirradical seguiu a metodologia descrita por RE *et al.* (1999) com pequenas modificações. Inicialmente foi preparada a solução de ABTS pela reação de 0,7 mM do radical ABTS dissolvido em 5 mL de água deionizada com 5 mL de

persulfato de potássio e a mistura reacional foi incubada em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 12 horas. Obteve-se a solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Em seguida a solução foi diluída em proporção de 1:7 da solução/ água deionizada e então ajustada para uma absorbância de $1,000 \pm 0,1$ em um comprimento de onda 630 nm. Foram adicionadas uma alíquota 30 μL da amostra e 270 μL da solução de ABTS na microplaca, em triplicata. No grupo controle os mesmos volumes do diluente e de ABTS. As amostras e controle foram incubados por 15 minutos na ausência de luz, logo após realizou-se a leitura em leitor de microplacas. O padrão utilizado nesta determinação foi a quercetina. Os cálculos de inibição foram feitos mediante fórmula a seguir:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times [1 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs controle}) / \text{Abs controle}] \quad (6)$$

4.6.9 Teste de inibição sobre a tirosinase

Avaliação da inibição da tirosinase pelos extratos seguiu o método descrito por HEARING VJ Jr, 1987. Os extratos foram preparados na concentração de 10mg/mL e testados como descrito a seguir: Foi adicionado, na microplaca, 20 μL do inibidor [extrato, diluente (controle) ou padrão (ac. Kójico)]. Em seguida adicionou-se 80 μL da solução da enzima tirosinase e levou para incubar por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se 100 μL do reagente de cor DOPA e levado para leitura imediata nos tempos de 5/ 10/ 15 e 20 minutos, incubando a placa a 37 °C. Ler a placa no método tirosinase no leitor de ELISA e os cálculos da inibição foi realizado mediante a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (\text{Abs } T_{20\text{Am}} - \text{Abs } T_{0\text{Am}} / \text{Abs } T_{20\text{Ct}} - \text{Abs } T_{0\text{Ct}}) \times 100 \quad (7)$$

Onde: Abs= absorbância, Am+ amostra, Ct= controle

4.6.10 Avaliação da atividade quelante de ferro

A atividade quelante de ferro da *P. nitida* foi avaliada de acordo com metodologia proposta por EBRAHIMZADEH *et al.* (2008). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 200 µL do padrão (EDTA) / extrato / controle negativo (diluyente) juntamente com 10 µL de solução de Cloreto Férrico (FeCl_2) a 2 mM, incubando-se por 5 minutos à temperatura de 37 °C e em seguida realizada a primeira leitura (A1) em leitor de Elisa DTX 800 Beckmar Coulter. Após a leitura A1, foi adicionado 10 µL de Hidroxilamina hidrocloreada 300 mM e 30 µL de Ferrozine 5 mM, incubando-se por 15 minutos temperatura de 37 °C, sendo realizada em seguida a segunda leitura (A2). O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a equação:

$$\text{Atividade(\%)} = 100 - \frac{(A_2 - A_1 \text{ amostra})}{(A_2 - A_1 \text{ controle})} \times 100 \quad (8)$$

4.6.11 Potencial Redutor

A análise foi realizada seguindo a metodologia de OYAIKU (1986), 1 mL da amostra a 20 mg/mL foi misturada com 2,5 mL de tampão fosfato e 2,5 mL de ferricianeto de potássio. A mistura foi incubada a 50 °C por 20 min e depois adicionado 2,5 mL de ácido tricloroacético e levado para centrifugar por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi misturado com 2,5 mL de água destilada e com 0,5 mL de solução de cloreto férrico (0,1%). A absorbância foi medida em 700 nm. O ácido ascórbico (20 mg/mL) foi utilizado como padrão e o branco foi preparado sem o padrão e a amostra. O cálculo do aumento do Potencial redutor foi feito com a equação a seguir:

$$\text{Potencial Redutor \%} = (\text{Abs A} - \text{Abs B} / \text{Abs B}) \times 100 \quad (9)$$

Onde A= amostra; B= branco

4.7 Desenvolvimento das formulações e estudo de estabilidade

4.7.1 Desenvolvimento de bases semissólidas e incorporação do ESPN

Foram desenvolvidas formulações semissólidas como gel creme e creme, com a finalidade de verificar a melhor base para incorporação do extrato seco de *P. nitida* (ESPN), garantindo eficácia e segurança do produto acabado, assim como, o melhor aspecto final ao produto.

As principais matérias-primas utilizadas e suas funções estão listadas na tabela 1.

Matéria-prima	Função	Matéria-prima	Função
Ácido cítrico	Acidificante	Manteiga de Cupuaçu	Emoliente
Álcool cetílico	Emoliente e agente de consistência	Manteiga de Karité	Emoliente
Álcool ceto-estearílico 30:70	Agente de consistência	Metilparabeno	Conservante
Álcool ceto-estearílico etoxilado 20 OE	Emulsionante não-iônico	Microemulsão de Silicone	Emoliente
BHT	Antioxidante	Monoestearato de glicerila	Agente de consistência
Carbopol	Espessante	Óleo de castanha	Emoliente
Ciclometicone	Emoliente	Fenoxietanol com parabenos	Conservante
Co-Polímero acriloldimetiltaurato, vinilpirrolidona e amônio	Espessante	Álcool cetoestearílico/ Monoestearato de sorbitano etoxilado	Emulsionante não iônico
EDTA	Quelante	Propilenoglicol	Umectante
Estearato de octila	Emoliente	Propilparabeno	Conservante
Glicerina	Umectante	Trietanolamina	Neutralizante
Hidroxietilcelulose	Espessante	Triglicerides caprílico	Emoliente
Imidazolidinil Uréia	Conservante	Vaselina líquida	Umectante

Tabela 1 - Relação das matérias-primas usadas na formulação das bases pilotos

As bases desenvolvidas foram identificadas com as iniciais LB, seguidas de numeração de 1 a 18, veja as bases na tabela 2. As formulações foram preparadas em banho-maria, em temperatura entre 70 e 80 °C, mediante agitação.

Código	Tipo de formulação	Código	Tipo de formulação
LB1	Gel creme com aristoflex 2%	LB10	Gel creme com natrosol 10% - Modificação: emulsionante/ emolientes
LB2	Gel creme com natrosol 1,5%	LB11	Gel creme com natrosol 3% - Modificação: emulsionante/ emolientes
LB3	Gel creme com carbopol 0,5%	LB12	Gel creme com aristoflex 1,5% - Modificação: emulsionante/ emolientes
LB4	Gel creme com natrosol 10%	LB13	Gel creme com aristoflex 0,75% - Modificação: emulsionante/ emolientes
LB5	Gel creme com natrosol 10% - modificação da técnica de manipulação	LB14	Creme com óleo de castanha 1%
LB6	Gel creme com aristoflex 1,5%	LB15	Creme com manteiga de cupuaçu 2%
LB7	Gel creme com natrosol 1%	LB16	Creme com manteiga de Karité 2%
LB8	Gel creme com natrosol 3%	LB17	Creme com manteiga de cupuaçu 1%
LB9	Gel creme com natrosol 5%	LB18	Creme com manteiga de cupuaçu 1%

Tabela 2- Relação das bases pilotos com as variações de polímeros, emulsionantes e emolientes testados.

4.7.2 Estudo de pré-estabilidade

Seguindo a recomendação do Guia de estabilidade de produtos cosméticos, todas as formulações desenvolvidas foram submetidas ao teste de centrifugação, 3.000 rpm durante 30 minutos. O produto deve permanecer estável, qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

4.7.3 Estabilidade Preliminar

As amostras foram submetidas a condições extremas de temperatura, sendo a primeira avaliação realizada no tempo zero (t0) e em seguida, as análises foram diárias.

As formulações em teste foram submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. As amostras foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, aquecimento em estufas 45°C (± 2), resfriamento em freezer a -5°C (± 2), em ciclos alternados. O testes ocorreu por de 12 dias, um total de 6 ciclos.

4.7.4 Estabilidade Acelerada

Por conseguinte aos testes de Estabilidade Preliminar, os testes de estabilidade normal ou exploratório e também chamado de estabilidade acelerada têm duração aproximada de 90 dias, podendo se estender por 6 meses ou até 1 ano, dependendo do produto (BRASIL, 2004).

As formulações foram preparadas em duplicatas para serem submetidas a temperaturas diferentes, uma preparação foi mantida em estufa a 37°C (± 2) e a outra em refrigerador a 5°C (± 2). O teste teve a duração de 90 dias, as amostras foram analisadas nos tempos: 0 e 24 h, no 7º 15º, 30º, 60º e 90º dias, os parâmetros analisados foram as características organolépticas: cor, aspecto e odor, pH e densidade durante todo teste. A viscosidade foi analisada nos tempos 0 e 90, considerando a velocidade fixa em 0,5 rpm.

4.7.5 Parâmetros avaliados no estudo de estabilidade

4.7.5.1 Determinação do pH

Seguindo a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª ed (2010), após a calibração com solução tampão de pH 7,0 e 4,0, o eletrodo foi lavado com água e inserido diretamente na diluição aquosa 1:10 (p/v) das amostras homogeneizadas à temperatura de 25 °C.

4.7.5.2 Determinação da densidade relativa

Seguindo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), foi utilizado o método do picnômetro, onde o mesmo foi pesado vazio e depois pesado com a amostra, após a remoção do excesso das substâncias se necessário. O picnômetro também foi pesado com água. Obtido o peso da amostra pela diferença da massa do picnômetro cheio e vazio, calculou-se a densidade relativa determinando a razão da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C.

Geralmente para os semissólidos, a densidade relativa é determinada empregando-se picnômetro de metal. (BRASIL, 2008)

4.7.6 Perfil reológico e determinação da viscosidade

O estudo preliminar do perfil reológico foi obtido com o equipamento Reômetro Brookfield modelo R/S +, utilizando o sensor placa 50, taxa de cisalhamento de 1 a 100 s⁻¹ e temperatura controlada à 25 °C.

A determinação da viscosidade pontual nas formulações foram obtida utilizando o Viscosímetro Rotacional Digital Brookfield, modelo DV-II +, spindle F e velocidade de 0,5 rpm.

4.7.7 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada por método adaptado de BORGHETTI & KNOST (2006). Para determinação da espalhabilidade uma placa-molde circular de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,3 cm), com orifício central de 1,3 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa suporte de vidro (20 cm x 21 cm). Sob essa placa posicionou-se uma folha de papel milimetrado. Cada amostra analisada foi introduzida no orifício da placa e a superfície foi nivelada com espátula. Após, a placa-molde foi cuidadosamente retirada. Sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso pré-determinado, aguardando o intervalo de um minuto cada. Após esse tempo foi calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado e régua.

Este procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas, em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 10 placas. Os resultados foram expressos em

espalhabilidade (E_i) da amostra em função do peso aplicado, a temperatura ambiente, de acordo com a equação abaixo:

$$E_i = d^2 \times \pi / 4 \quad (10)$$

Onde: E_i = espalhabilidade da amostra para peso (mm^2); d = diâmetro médio (mm)

A espalhabilidade máxima foi considerada como o ponto no qual a adição de peso não ocasionou alterações significativas nos valores da espalhabilidade, e o esforço limite corresponde ao peso que resulta na espalhabilidade máxima.

4.8 Ensaios em cultura de células

4.8.1 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue

O alamar blue, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, que como ocorre com os sais de tetrazólio, reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por AHMED e colaboradores (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade celular em células da linhagem B16F10 após exposição por 72 h ao ESPN e formulação LB12 -3%. Em placa de 96 poços, células B16F10 foram semeadas na concentração de 1×10^4 células por poço. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações das amostras. As concentrações testadas inicialmente nas células foram 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Passado o tempo de tratamento pretendido (72 h) foram adicionados 10 μL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura sem soro fetal

bovino), ou seja, da resazurina na respectiva triplicata de tratamento. Como branco da reação foram lidos os poços com célula e extrato sem resazurina. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração do extrato. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado para cada tipo celular (3 h para B16F10) realizou-se a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\%viabilidade\ celular = \frac{\Delta Ft}{\Delta Fc} \times 100 \quad (11)$$

Onde: ΔFt = (fluorescência da célula + meio + extrato + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + extrato). ΔFc = (fluorescência da célula + meio + DMSO + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + DMSO)

4.8.2 Cultivo, estímulo da melanogênese e lise celular

Em placas de petri 60 x 15 mm foram cultivadas células B16F10 na densidade de 3×10^4 células/mL num total de 5 mL. Após 24 horas de incubação em estufa de CO_2 , foi trocado o meio de cultivo por meio contendo Isobutilmetilxantina (IBMX) 25 μ M, para estímulo da melanogênese na linhagem por 24 h. Decorridas as 24 h de estímulo, o meio foi substituído por meio contendo as soluções com a amostra de *P. nitida* a 50 μ g/mL. Após 48 h de tratamento, as células foram coletadas, separadas para microtubos parte da suspensão de células contendo 1×10^6 células, as quais foram usadas para a dosagem de melanina. O restante da suspensão de células foi lisada para obtenção de proteínas necessárias para o teste de atividade da tirosinase. Em ambas as soluções os pellets obtidos foram lavados com PBS e lisados com Triton-X 1 % contendo inibidor de proteases PMSF (Fenilmetilsulfonilflúor) 1%, centrifugando em seguida a 4 °C, a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi separado para a avaliação da atividade da tirosinase.

4.8.3 Dosagem da melanina em B16F10

Os pellets de B16F10 obtidos a partir de 1×10^6 células foram solubilizados em NaOH 1 N contendo 10 % de DMSO em banho seco a 95 °C durante 1 hora. A absorbância das soluções de melanina obtidas foram mensuradas a 405 nm usando um leitor de placas de ELISA. A quantidade de teor de melanina foi calculada após comparação com uma curva padrão de melanina sintética (0 – 200 µg/mL).

4.8.4 Atividade da tirosinase B16F10

Após a lise celular e obtenção do sobrenadante, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. Após a quantificação, as proteínas obtidas foram diluídas em placas de 96 poços para concentração final de 100 µg/mL. A absorbância inicial foi mensurada (A1) em 475 nm. Em seguida foram adicionados 100 µL do reagente de cor L-DOPA (L-diidroxifenilalanina) a 3mg/mL, procedendo-se imediatamente a leitura em leitor de micro placa. A placa foi incubada a 37 °C e lida a cada 30 minutos durante 90 minutos, onde foi obtida a absorbância final (A2) mensurada no mesmo comprimento de onda da A1. A porcentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme indicado abaixo, onde A2= absorbância 2 e A1= absorbância 1.

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_{1amostra})}{(A_2 - A_{1controle})} \times 100 \quad (12)$$

4.9 Teor de Flavonoides Totais por espectrofotometria UV-Visível

Seguindo a metodologia farmacopeica, a solução estoque foi preparada pesando 0,4g do ESPN / DV / formulação e colocando em um balão de fundo redondo de 50 mL. Adicionado 20 mL de etanol a 50 % (v/v), aquecido sob refluxo por 30 minutos. A mistura foi

filtrada para balão volumétrico de 50 mL utilizando algodão. O algodão retornou para o mesmo balão de refluxo, adicionou-se 20 mL de etanol a 50 % (v/v), e aqueceu-se em refluxo por 30 minutos. A solução foi filtrada, usando papel de filtro, para o balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com etanol a 50% (v/v). A solução amostra foi preparada com 0,8 mL da solução estoque adicionada ao balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 0,8 ml de cloreto de alumínio 2% (p/v) em etanol a 50% (v/v), completando o volume com o mesmo solvente. O branco foi preparado sem o cloreto de alumínio. A leitura foi realizada em 397 nm, 30 minutos após seu preparo, utilizando o branco para ajuste do zero. O teor de flavonoides totais foi calculado como apigenina, em porcentual (p/p), seguindo a equação abaixo:

$$\text{TFT} = A \times \text{FD} \times 100 / E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \times (100 - \text{PD}) \quad (13)$$

Onde: A = Absorbância, FD = fator de diluição (625), $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = absortividade específica (365,3), m = massa da droga, PD = perda por dessecação (% p/p).

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA *One Way* e pelo teste *t-Student*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Droga Vegetal

5.1.1 Análise granulométrica por tamisação

Pela análise do histograma (figura 6), verificamos que a maior parte das partículas encontra-se na faixa granulométrica entre 0,25 – 0,71 mm. Seguindo a classificação descrita na FB 5ª ed. (2010), o pó obtido pela moagem das folhas da *P. nitida* pode ser classificado como pó grosso, o qual se refere aquelas partículas que passam em sua totalidade pelo tamis de malha 1,70 mm e no máximo 40% pelo tamis de malha 0,35 mm. O tamanho médio das partículas da DV pulverizada foi de $0,5 \pm 0,087$ mm (figura 6).

A avaliação granulométrica é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo (MIGLIATO *et al.*, 2007). Segundo SHARAPIN (2000), pós de natureza mais grossa são os mais recomendados para a maioria das DV, pois pós muito finos podem comprometer a extração (SHARAPIN, 2000; FONSECA *et al.*, 2010). Isto porque as partículas finas são mais coesivas que as partículas grosseiras, as quais são mais afetadas pelas forças gravitacionais (STANIFORTH, 2005).

Portanto, o pó obtido pela moagem das folhas da *P. nitida* apresentou resultado satisfatório com relação ao tamanho de partículas, ao estar compreendido na faixa de 1,70 a 0,35 mm, é considerado um pó grosso, o que favorece a extração dos compostos ativos.

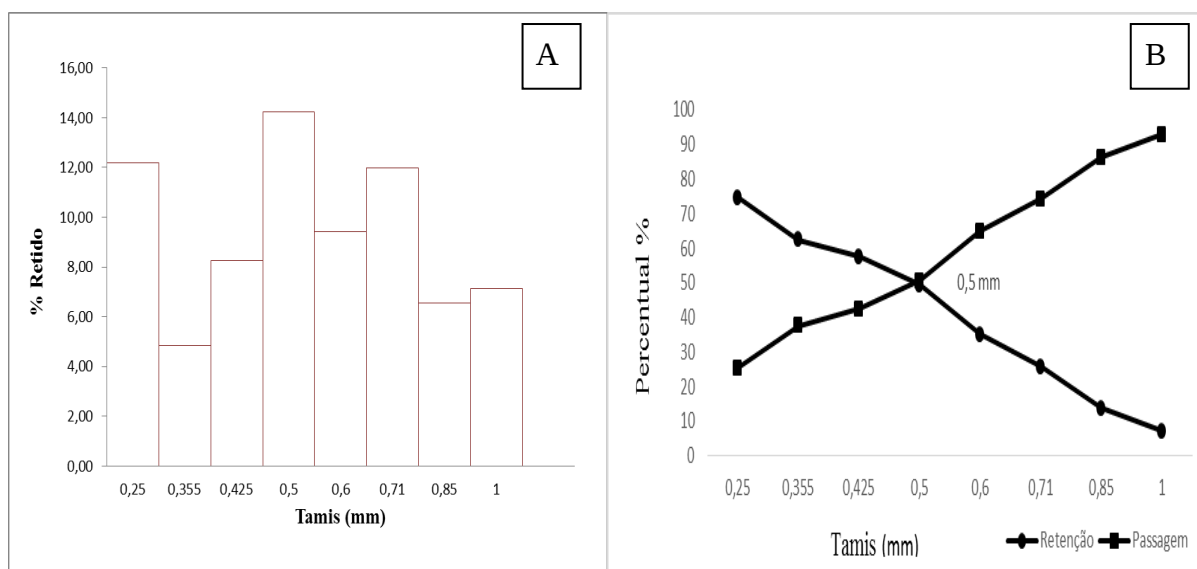


Figura 6 - Histograma da determinação granulométrica por tamisação (A) e curva de passagem e retenção (B)

5.1.2 Determinação da Perda por Dessecação

A média da perda por dessecação encontra-se na tabela 3, este resultado está em conformidade com a especificação de limite de umidade para DV (8 a 14%) estabelecida pela Farmacopeia Brasileira 4 ed. (1988).

Como o teor de umidade é um importante parâmetro a ser avaliado quando se trabalha com plantas, já que o excesso de água residual pode permitir o desenvolvimento de fungos e bactérias, além de favorecer a ação de enzimas cuja atividade pode levar à degradação dos constituintes químicos (FONSECA *et al.*, 2010). E a presença de excesso de água residual está relacionada diretamente com o correto armazenamento da matéria-prima (MIGLIATO *et al.*, 2007). O resultado encontrado está dentro dos parâmetros estabelecidos, a perda de massa de aproximadamente 9% minimiza a contaminação microbiana e degradação química, além de demonstrar o correto armazenamento do material.

Teste	Média $\pm$ DP	CV %
Perda por Dessecação	9,08 $\pm$ 0,08	0,9
Teor Extrativo	17,16 $\pm$ 0,05	0,32
Teor de Cinzas Totais	5,43 $\pm$ 0,11	1,99

Tabela 3 - Caracterização da Droga Vegetal das folhas da *P. nitida*

5.1.3 Teor de Extrativos

O resultado está descrito na tabela 3. Esta análise foi empregada como um ensaio auxiliar na caracterização físico-química da droga vegetal e está relacionada aos compostos hidrossolúveis presentes na matéria-prima, como açúcares, aminoácido, heterosídeos flavonoídicos e outros (BARNI *et al.*, 2008). Demonstra a eficiência da água como líquido extrator.

5.1.4 Cinzas Totais

A determinação do teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes (BARNI *et al.*, 2008). O resultado encontrado para teor de cinzas está na tabela 3. Utilizando como referência a Farmacopeia Brasileira 5. Ed. (2010) que estabelece o limite máximo de 10% para cinzas totais para a *P. alata* e *P. edulis*. O resultado menor que 10% para a *P. nitida* é um bom resultado, pois quanto mais baixo o resultado, menor a quantidade de contaminantes inorgânicos não voláteis presentes na amostra.

5.1.5 Triagem Fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica estão descritos na tabela 4. Na triagem fitoquímica da *P. nitida* os compostos positivos encontrados foram: fortemente positivo para os heterosídeos flavônicos, positivos para fenóis, cumarianas, saponinas e taninos. O resultado está de acordo com os compostos encontrados em outras espécies do gênero *Passiflora* descritos na literatura (DHAWAN, 2004; RUDNICK, 2007; SILVA, 2012).

GRUPO QUÍMICO	RESULTADOS
ALCALÓIDES	-
ÁCIDOS ORGÂNICOS	+
FENÓIS	++
HETEROSÍDEOS FLAVÔNICOS	+++
Reação de Taubock ou Oxalato-bórica	+++
Reação de Shinoda	++
Reação de Pacheco	+++
CUMARINAS	++
ANTRAQUINONA	-
ESTERÓIS	+
TRITERPENOS	-
Heterosídeos Antociânicos	-
Heterosídeos Saponínicos	++
Heterosídeos Cianogenéticos	+
Gomas, taninos e mucilagens	++
Pesquisa de taninos	++
Pesquisa de aminogrupos	-
Pesquisa de ácidos voláteis	+
Pesquisa de ácidos fixos	++
+ Positivo fraco/ ++ Positivo/ +++ Fortemente Positivo/ - Negativo	

Tabela 4 - Triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas da *P. nitida*

5.2 Caracterização da solução extrativa a 7,5%

A solução extrativa é um líquido de cor marrom, com valor médio de pH de 5,56 ($\pm 0,02$), densidade relativa de 0,9851 g/mL ($\pm 0,0001$) e densidade absoluta 0,9845 g/mL, a condutividade foi de 83 mV ($\pm 0,82$) e resíduo seco de 1,12% ($\pm 0,02$). A caracterização foi realizada em triplicata.

5.3 Caracterização do ESPN

5.3.1 Análise de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz (granulometria a laser)

A faixa de distribuição granulométrica, a porcentagem de retenção e o tamanho médio de partículas do ESPN a 5 / 7,5 e 10 (relação droga-solvente) estão dispostos na tabela 5.

Amostras	Distribuição do tamanho de partículas	Percentual de Retenção	Tamanho médio de Partículas	Área Superficial	Diâmetro dos Poros
ESPN 5	$95\% \leq 77,77 \mu\text{m}$	81%	$27,35 \mu\text{m}$	$2,5 \text{ m}^2/\text{g}$	$226,5 \text{ \AA}$
ESPN 7,5	$95\% \leq 59,74 \mu\text{m}$	78%	$25,06 \mu\text{m}$	$2,74 \text{ m}^2/\text{g}$	$225,3 \text{ \AA}$
ESPN 10	$95\% \leq 229,6 \mu\text{m}$	54%	$37,68 \mu\text{m}$	$2,35 \text{ m}^2/\text{g}$	$221 \text{ \AA}$

Tabela 5 - Caracterização das partículas do extrato seco de *P. nitida*

Conforme o tamanho médio de partículas encontrado, o ESPN classifica-se como pó finíssimo, de acordo com a classificação dos pós pela Farmacopeia Brasileira 5 ed (2010), ou seja, é aquele que passa totalmente pelo tamis de abertura nominal de malha $125 \mu\text{m}$..

A redução no tamanho de partículas é desejável, pois influencia em diversos fatores como velocidade de dissolução, uniformidade de conteúdo, estabilidade. E para formulações de uso tópico a redução evita a sensação arenosa. (ALLEN, 2007; YORK, 2005). O menor tamanho de partícula foi encontrado no ESPN 7,5.

5.3.2 Área superficial específica e diâmetro dos poros (S_{BET})

Os resultados estão descritos na tabela 5. A literatura descreve que a redução do tamanho de partículas conduz a um aumento da superfície específica do pó (ALLEN, 2007; YORK, 2005), fazendo a correlação dos resultados da área superficial específica de $2,5 \text{ m}^2/\text{g}$, $2,74 \text{ m}^2/\text{g}$, $2,35 \text{ m}^2/\text{g}$, com o diâmetro dos poros de $226,5 \text{ \AA}$, $225,3 \text{ \AA}$ e $221 \text{ \AA}$, e com o

resultado encontrado na granulometria a laser de pó finíssimo, as três concentrações de ESPN apresentaram uma elevada área superficial específica e poros do tipo mesoporos.

A porosidade de um material determina propriedades físico-químicas importantes como adsorção, resistência mecânica, característica de dissolução, molhabilidade (SCHOONMAN *et al.*, 2001; PORTE *et al.*, 2011). O ESPN apresentou bom resultado quanto a porosidade, pois é interessante para um extrato seco, em pré-formulação ou em formulação, que a porosidade esteja na faixa de 20 – 500 Å, que é a classificação de mesoporos, por conferir aumento da área superficial específica, maior coesão entre as partículas e molhabilidade, características importantes a serem consideradas na etapa de desenvolvimento das formulações.

5.3.3 Análise de fluorescência de raios-X por dispersão de ondas (WDXRF)

Muitos dos nutrientes encontrados nas plantas são absorvidos do solo, dentre estes podem existir metais pesados ou outros elementos que causem doenças ou toxicidade, desta forma, para garantir o uso seguro de uma matéria-prima vegetal a identificação e quantificação dos elementos presentes é de grande importância. (RUDIGER *et al.*, 2009)

Utilizando a técnica de fluorescência de raios-X por dispersão de ondas é possível analisar e identificar vários elementos de forma rápida. Em todas as três concentrações analisadas do ESPN foram encontrados os elementos químicos Ca, K, Cl, S, P, Si, Mg, Na e Br, provavelmente originais do solo do qual foi retirada a planta. Esperava-se que as concentrações dos elementos aumentassem com o aumento da concentração do extrato. Mas pode-se perceber claramente, na tabela 6, que o extrato de 7,5 % apresenta uma concentração maior dos elementos observados.

Acredita-se que este fato esteja relacionado com a relação droga-solvente que na concentração 7,5% promove melhor extração. Outros dados apresentados neste trabalho, tais

como: granulometria a laser, teor de fenóis e flavonoides, demonstram o mesmo padrão de comportamento, corroborando com os dados de WDXRF. Assim, podemos observar que a concentração de 7,5 % pode ser considerada como importante para a extração.

Elementos	% m/m		
	ESPN 5 %	ESPN 7,5 %	ESPN 10 %
Ca	0.00366	0.01207	0.005
K	0.03364	0.06786	0.04016
Cl	0.01355	0.0273	0.01933
S	0.01166	0.02064	0.01409
F	0.00491	0.00851	0.00609
Si	0.00045	0.00126	0.00062
Mg	0.02015	0.02762	0.01586
Na	0.0003	0.00045	0.00023
Br	0.00081	0.00162	0.00134

Tabela 6 - Concentração dos Elementos Químicos no extrato seco de *P. nitida* obtidos por WDXRF

5.3.4 Calorimetria exploratória diferencial ou DSC

A curva DSC do ESPN 5 % apresentou quatro eventos térmicos (figura 7), o primeiro associado à perda de água, o segundo e o terceiro relacionado à decomposição térmica e o quarto evento associado à eliminação do material carbonáceo, estes resultados podem ser confirmados pelo TG que apresenta quatro eventos de perda de massa. Já o ESPN 10% apresentou eventos endotérmicos bem definidos entre 25 °C e 200 °C, os quais podem ser confirmados nas curvas de TG/DTG.

Na curva DSC do ESPN 7,5 % observamos dois eventos endotérmicos, o primeiro entre 25 °C e 100 °C e o outro acima de 400 °C. Mas, a curva TG/DTG do ESPN 7,5 % mostrou quatro eventos de perda de massa. Desta maneira, os dois eventos intermediário, na curva DSC do ESPN 7,5 %, são uma junção de eventos endotérmicos e exotérmicos, o que impossibilita a observação clara das mudanças ocorridas na linha de base.

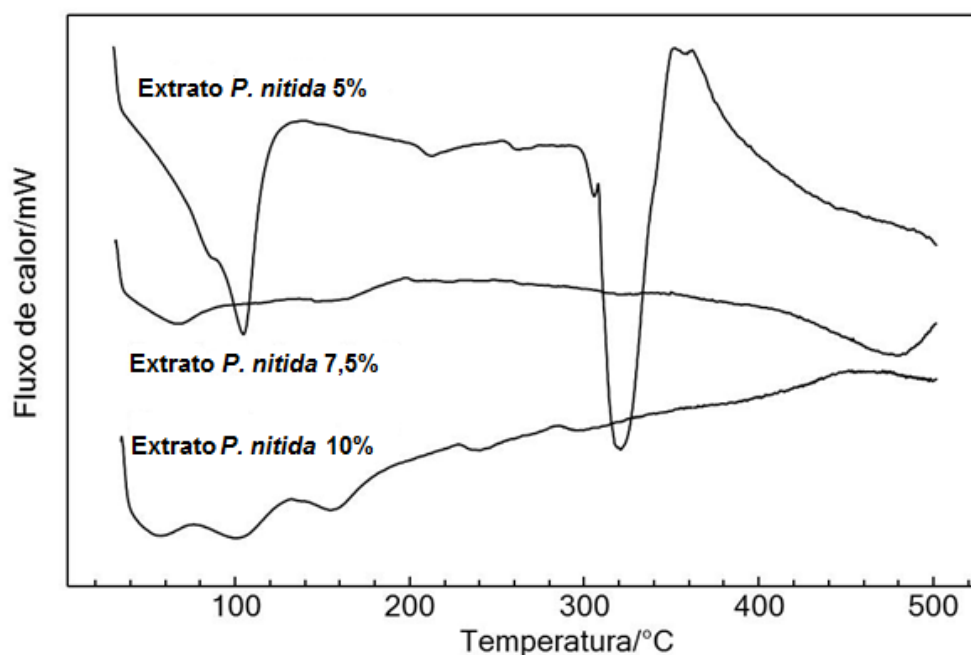


Figura 7 - DSC do extrato seco de *P. nitida* sob atmosfera de ar sintético ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

5.3.5 Termogravimetria (TG e DTG)

As curvas TG/DTG das três concentrações estudadas do ESPN (figura 8) evidenciaram quatro eventos de perda de massa, o primeiro evento ocorreu entre 25 e 150°C e é atribuído à perda de água superficial, este resultado está de acordo com os eventos endotérmicos apresentado na curva do DSC. É possível observar mais três eventos térmicos na curva TG/DTG, após a desidratação. O primeiro está associado à decomposição térmica de compostos orgânicos e ocorre entre 150 e 400 °C. Entre 400 e 600 °C ocorre a segunda etapa da decomposição térmica com a formação de material carbonáceo. O último evento ocorre acima de 600 °C e está relacionado à eliminação do material carbonáceo formado na etapa anterior. Contudo, há uma diferença na curva do ESPN 10 %, ela apresenta uma derivada tendendo a zero devido à eliminação contínua de produtos de decomposição.

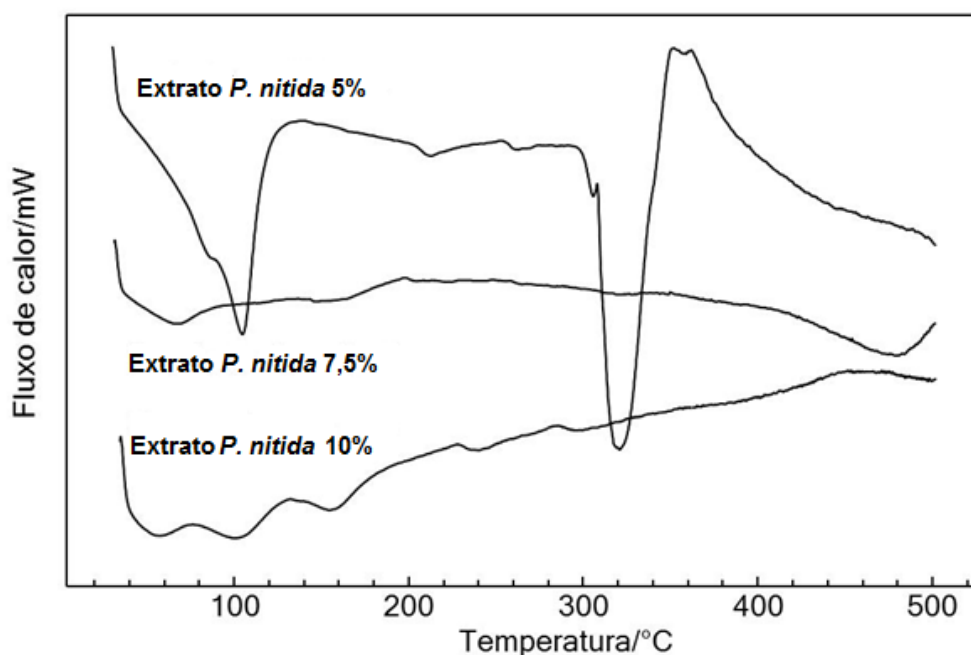


Figura 8 - TG e DTG do extrato seco de *P. nitida* sob atmosfera de ar sintético ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

5.3.6 Resíduo Seco do ESPN 7,5

A média do resíduo seco foi de $94,24\pm 0,14$, ficando um pouco abaixo da especificação farmacopeica que é de 95%. O uso de adjuvante de secagem pode auxiliar na melhora deste resultado.

5.3.7 Determinação de Teor de Fenóis e Flavonóides Totais

Na tabela 7 constam os resultados obtidos para o teor de fenóis e flavonoides totais, realizando o comparativo entre as concentrações do extrato seco o que apresentou melhores resultados foi o ESPN 7,5 % tanto para fenóis como para flavonoides totais, entretanto, a diferença entre os extratos secos não é significativa, na análise estatística pelo ANOVA, $p > 0,05$ tanto para o teor de fenóis como para o de flavonoides. É interessante também observar que o fato de se aumentar a concentração da droga vegetal não significa necessariamente que teremos um extrato seco com maior quantidade de fenóis e flavonoides. O resultado

encontrado para o ESPN 10 % comprova essa afirmação, uma vez que os teores foram inferiores quando comparados com os extratos a 5 % e 7,5 %. Isso acontece devido à saturação do meio durante o processo de extração.

TESTES	ESPN %				PADRÃO		
	5%	DP	7,5%	DP	10%	DP	Ac. Ascórbic
Fenóis (%)	16,7	0,35	18,9	2,62	17,9	1,78	
Flavonóides (%)	3,3	0,67	4,1	0,47	3,9	0,54	
CI50 (µg/mL) DPPH	23,5	0,66	31,5	3,75	25,9	1,65	2,7
CI50 (µg/mL) ABTS	14,9	0,23	21,8	1,69	20,4	2,45	4,8

Tabela 7 - Estudo da atividade antioxidante *in vitro* no extrato seco de *P. nitida*

5.3.8 Determinação da Atividade Antioxidante – DPPH e ABTS

Na tabela 7 encontramos os resultados da atividade antioxidante dos ESPN. O estudo mostra que existe uma atividade antioxidante. Porém, quando comparado ao ácido ascórbico, utilizado como padrão, os resultados do ESPN foram ± 10 vezes maior para DPPH e ± 5 vezes maior para ABTS. Entretanto, a atividade antioxidante encontrada no ESPN foi muito boa, em relação aos valores relatados para outras espécies do gênero *Passiflora*, por exemplo, artigos relatam que a *P. edulis* apresenta DPPH entre 875 e 1100 µg/mL e a *P. incarnata* entre 76 a 282 µg/mL (SILVA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). No estudo realizado por Bendini *et al.* (2006) a *P. nitida* apresentou uma boa atividade antioxidante em relação a outras espécies de passiflora estudadas.

A atividade antioxidante da *P. nitida* possivelmente está relacionada aos fenóis e flavonoides presentes em sua composição. Os compostos fenólicos são usualmente correlacionados a atividade antioxidante devido, sua propriedade de doar hidrogênios permitindo uma varredura nos radicais livres (YILMAZ *et al.*, 2013). Os flavonoides são compostos fenólicos polihidroxilados que têm a propriedade antioxidante de eliminação dos radicais livres e ação quelante de metais, além de promover a inibição de várias enzimas (ZIAULLAH *et al.*, 2013). Trabalhos anteriores já demonstraram a atividade antioxidante de

alguns flavonoides como orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e outros, usando CLAE em associação aos resultados das análises de DPPH (DEMIRKIRAN *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2012).

5.3.9 Avaliação da inibição da tirosinase

Na avaliação da inibição da tirosinase as CI_{50} (concentração inibitória média) encontradas para as concentrações de ESPN de 5; 7,5 e 10 % foram de: 654,4; 436,9; 400,1 $\mu\text{g/mL}$ (figura 9), o resultado do padrão que é o ácido kójico foi de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$. Mesmo com a diferença entre o padrão e o extrato é certo que o ESPN apresenta atividade inibidora da tirosinase. Esta atividade está provavelmente relacionada aos flavonoides. O modo de inibição da tirosinase pelos flavonoides é, geralmente, uma inibição competitiva na oxidação da L-DOPA. Os flavonoides são os metabólitos secundários de plantas mais investigado que mostram inibição da tirosinase, por exemplo, a quercetina, a vitexina e isovitexina já possuem estudos mostrando essa atividade (TEIXEIRA *et al.*, 2013; ZIAULLAH *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2011; CHANG, 2009).

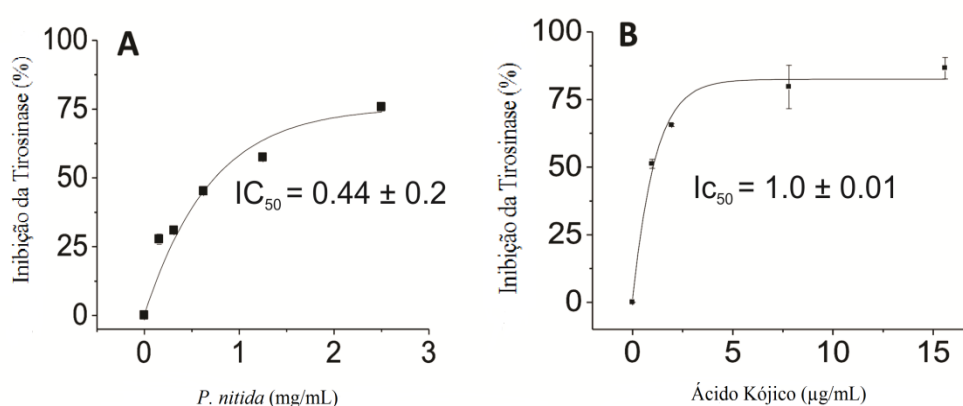


Figura 9 - Avaliação de inibição da tirosinase o extrato seco de *P.nitida* a 7,5% e do padrão ácido kójico

5.3.10 Atividade Quelante ESPN 7,5

O ensaio apresentou resultados negativos para o ESPN, média de -68% de atividade quelante, enquanto o padrão utilizado, EDTA, apresentou média de 99% de atividade quelante. Desta forma, o ESPN não apresentou atividade quelante.

5.3.11 Potencial Redutor ESPN 7,5

Substâncias com potencial redutor reagem com o ferricianeto de potássio ($F3^+$) para ferrocianeto de potássio ($F2^+$) na presença do cloreto férrico, quanto maior o valor de absorbância, maior o potencial de redução (SINGHAL *et al.*, 2014). O resultado representado na figura 10 demonstra que o potencial redutor existe no ESPN 7,5, mas é dose-dependente, pois os melhores resultados apresentados foram para as maiores concentrações, como na de 1000 $\mu\text{g/mL}$ em que o potencial redutor foi de 29,7%, enquanto que o padrão apresenta um potencial redutor de 59,6% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

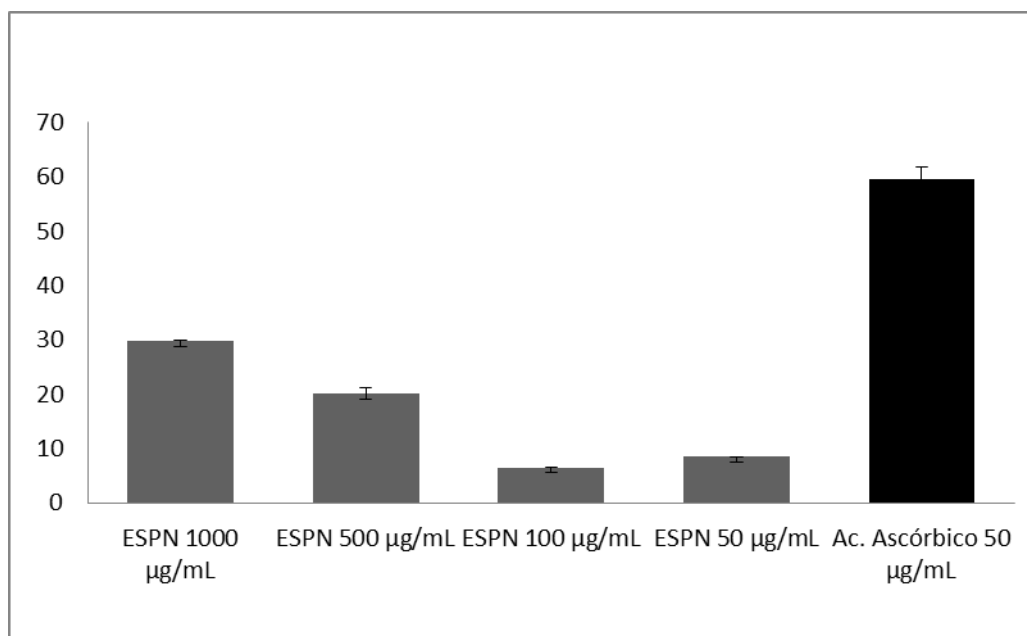


Figura 10 - Gráfico do potencial redutor em concentrações diferentes do ESPN 7,5

5.4 Desenvolvimento e estudo de estabilidade das formulações

5.4.1 Desenvolvimento das bases, incorporação do extrato e pré-estabilidade.

A atividade antioxidante e de inibição da tirosinase *in vitro* no ESPN despertou o interesse no desenvolvimento de uma formulação tópica de uso cosmético para beneficiar a pele envelhecida, auxiliando no rejuvenescimento e clareamento da pele.

Na busca de uma base semissólida hidratante, estável, com aspecto cremoso, boa espalhabilidade e sensação ao tato de toque seco, correspondente a uma rápida absorção, foram pesquisadas e manipuladas formulações do tipo creme, gel creme e creme gel.

A ideia de associar o creme e o gel foi buscar a estabilidade da rede entrelaçada, que confere a estrutura rígida dos géis e associar a alta viscosidade das emulsões, juntamente com seu aspecto cremoso e o poder de hidratação (BARRY, 2005).

Para o desenvolvimento dessas bases foram utilizadas como referência algumas literaturas que descrevem formulações como BATISTUZZO *et al.*, 2002; CAMPOS *et al.*, 1999; LEONARDI, 2004; DANDOLINI *et al.*, 2008). As formulações encontradas foram reproduzidas e modificações como: alterações nas proporções dos agentes emulsionantes, polímeros, emolientes e umectantes foram realizadas a fim de melhorar o aspecto das formulações.

As matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das bases estão relacionadas na tabela 1. Dezoito formulações de bases foram testadas e após 24h foram analisadas quanto às características organolépticas: aspecto, cor e odor e quanto ao pH.

A partir desta avaliação, sete bases foram reprovadas, pois apresentaram características indesejáveis: aspecto sólido esfarelado (figura 11) ou aspecto de viscosidade muito elevada, compatível com os aspectos de uma pomada (figuras 12). Destas bases, seis continham hidroxietilcelulose em diferentes concentrações, porém quanto maior a concentração da hidroxietilcelulose, pior foram os resultados finais em relação ao aspecto.



Figura 11 – Aspecto esfarelado da base LB10
FONTE: Autora



Figura 12 - Aspecto de pomada da base LB9
FONTE: Autora

As onze bases aprovadas seguiram para a etapa de incorporação do ESPN 7,5 e dos adjuvantes. A concentração inicial do ESPN 7,5 foi de 1 %, os adjuvantes utilizados foram: ácido láctico 1%, ácido glicólico 1 e 2%, vitamina A 0,01% e vitamina E 0,5%. A finalidade do uso dos adjuvantes foi de melhorar a ação hidratante, rejuvenescedora e clareadora da pele da formulação, como ocorre em outros produtos disponíveis no mercado, mas com um diferencial de possuir um ativo vegetal de origem amazônica.

Ao final da etapa de incorporação, sempre iniciando com a incorporação do ESPN 7,5 e depois de cada adjuvante, foram observadas as ocorrências de instabilidades. Nesta etapa algumas bases foram reprovadas logo após incorporação ou do ativo ou de alguns dos adjuvantes, pela quebra das fases, com a adição a formulação perdeu seu aspecto original ficando líquida em decorrência de incompatibilidade entre os excipientes.

Realizado a etapa da incorporação, as bases estáveis foram submetidas ao teste de pré-estabilidade. Inicialmente, o teste foi realizado em nove bases LB1, LB3, LB12, LB 13, LB 14, LB15, LB 16, LB17 e LB 18 com os adjuvantes e ESPN de 1%. As formulações que se mantiveram estáveis após o teste de pré-estabilidade (figura 13), seguiram para a incorporação de concentrações mais elevadas de ESPN 7,5 (1,5 até 4 %) em associações com os adjuvantes.

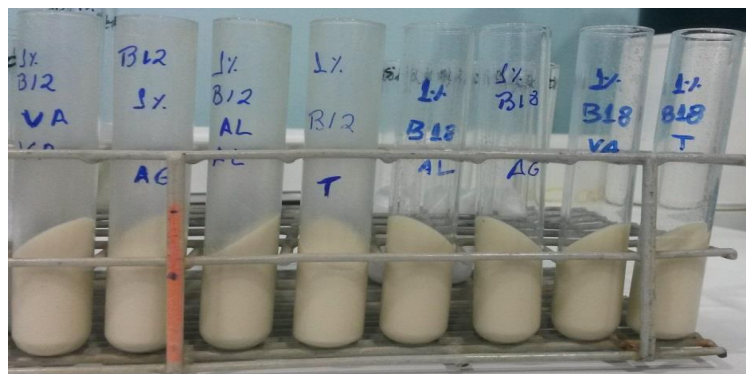


Figura 13- Demonstração de fórmulas estáveis após o teste de centrifugação

FONTE: Autora

Assim, foram testadas 84 formulações formadas pelas combinações a seguir:

- Base + ESPN + Ácido Glicólico + Vitamina E
- Base + ESPN + Ácido Lático + Vitamina E
- Base + ESPN + Vitamina A + Vitamina E
- Base + ESPN + Todos os Adjuvantes
- além da variação na concentração do ESPN (1,5 a 4%)

As bases reprovada apresentaram separação das fases após centrifugação, ficando clara a formação de uma fase líquida (figura 14). O teste de centrifugação representa uma situação de estresse para a amostra, tem por finalidade aumentar abruptamente a força da gravidade, aumentando a movimentação das partículas, e gerar condição favorável para se observar uma possível instabilidade (BRASIL, 2004).

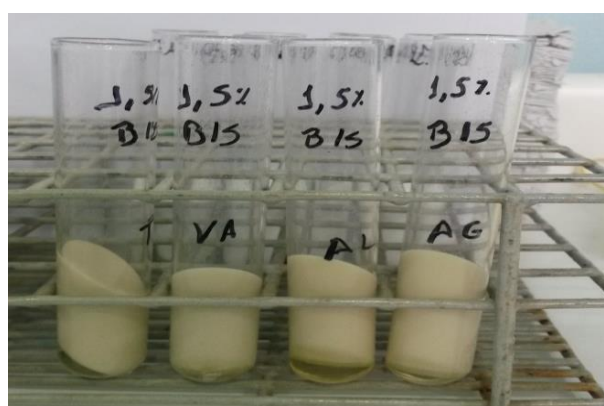


Figura 14- Demonstração de instabilidade nas formulações após o teste da centrifugação

FONTE: Autora

Após o teste de centrifugação apenas quatro formulações mostraram estabilidade ao associar o ESPN e os quatro adjuvantes, foram elas: LB12 com 1,5 % de ESPN 7,5 e todos os adjuvantes, LB12 com 3 % de ESPN 7,5 e todos os adjuvantes, LB16 com 1,5 % de ESPN 7,5 e LB 17 com 1,5 % de ESPN 7,5 e todos os adjuvantes. A base LB 12 é um gel creme formulado com o Aristoflex AVC[®] (Co-polímero acriloldimetiltaurato, vinilpirrolidona e amônio) e tem como agente emulsionante a cera auto emulsionante não iônica Polawax[®] (Álcool cetoestearílico/Monoestearato de sorbitano etoxilado). As bases LB 16 e LB 17 são formulações do tipo creme que contém em sua formulação os agentes emulsionantes Monoestearato de Glicerila, álcool ceto estearílico 30:70 e o álcool ceto estearílico etoxilado 20 OE, a diferença entre essas duas bases cremosa é o uso da manteiga de Karité na LB16 e da manteiga de Cupuaçu na LB17.

5.4.2 Estabilidade Preliminar

As formulações que passaram no teste de centrifugação foram submetidas aos Estudos de Estabilidade preliminar e passaram a ser identificadas de maneira mais simples por LB12 1%; LB12 3%; LB16 1,5 % e LB17 1,5 %. O estudo foi realizado em seis ciclos alternados de aquecimento e refrigeração, com controle de qualidade diário, em relação às características organolépticas (aspecto, cor e odor) e físico-químicas (pH, densidade relativa).

Ao longo dos 12 dias não houve grandes alterações em relação às características organolépticas das formulações (tabela 8), alertando-se apenas para o fato de que a LB 16 e LB 17 apresentaram algumas vezes determinada liberação de líquido. Entretanto, em relação ao aspecto, pequenas alterações ocorridas em variações extremas de temperatura são aceitáveis (BRASIL, 2004). Uma pequena intensificação no odor, nas formulações com maior concentração do ESPN, ocorreu nos dois últimos dias do teste, mudança aceitável em função da temperatura elevada (BRASIL, 2004).

LB	Características organolépticas	DIAS DO TESTE											
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
B 12 1%	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
B 12 3%	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
B 16	Aspecto	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	N	N	N	LS
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
B 17	Aspecto	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	N	N	N	N	N
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM

Tabela 8 - Determinação subjetiva das características organolépticas durante a Estabilidade Preliminar

Legendas: Aspecto: (N) Normal, sem alteração; (LS) Levemente separado/precipitado/turvo; (S) Separado/precipitado/turvo; Cor e odor: (N) Normal, sem alteração; (LM) Levemente modificado; (M) modificado; (IM) Intensamente modificado.

Em relação ao pH, houve uma redução ao longo dos doze dias (figura 15), tornando as formulações mais ácidas, entretanto essas oscilações foram aceitáveis, pois se mantiveram dentro da faixa preestabelecida e desejável (4,0 a 5,0), esta faixa foi definida com base no pH levemente ácido da pele, entre 4,6 a 5,8, com a finalidade de evitar grandes alterações no pH cutâneo, o que deixaria a pele mais exposta as agressões externas (RODRIGUES, 1995; LEONARDI *et al.*, 2002), e nas recomendações técnicas para utilização de alfa-hidroxiácidos em produtos cosméticos, descritas no Parecer Técnico nº 7 da Câmara Técnica da ANVISA (2006).

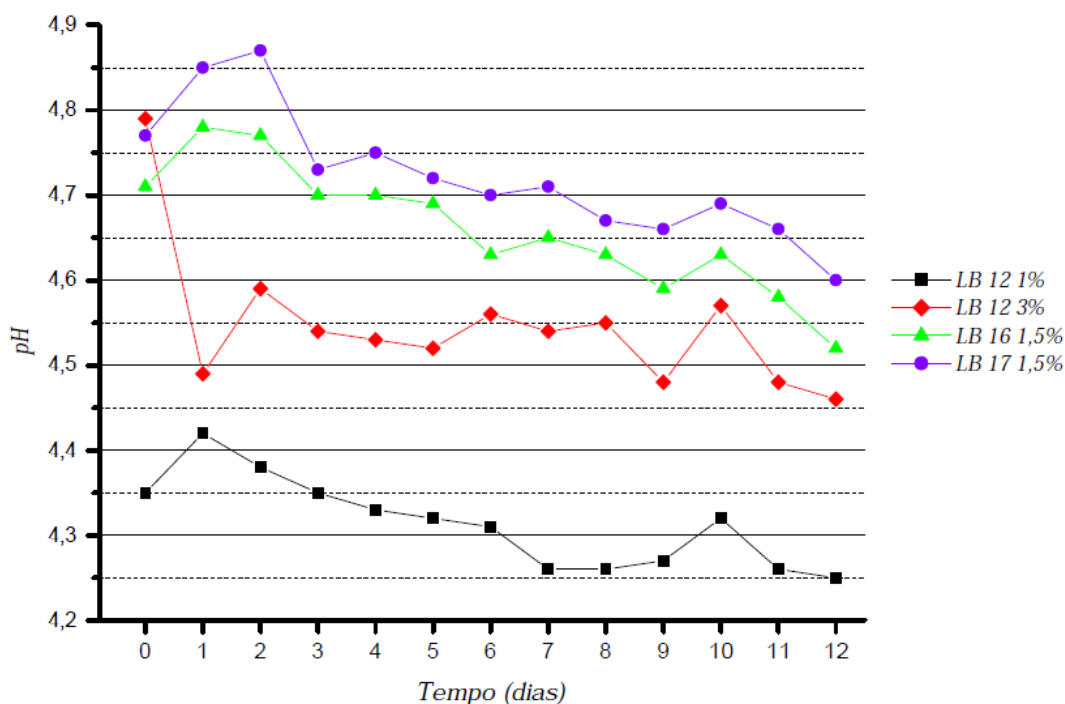


Figura 15- Determinação do pH das formulações na estabilidade preliminar

Quanto à densidade relativa deve-se ressaltar que densidade relativa é representada pela relação entre a densidade absoluta de uma substância e a densidade absoluta de outra substância estabelecida como padrão, no caso, a água. No caso de líquidos ou semissólidos pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis (BRASIL, 2004). Portanto, grandes mudanças nesse parâmetro significa assimilação de ar externo e/ou evasão de substâncias voláteis.

Todas as formulações-testes tiveram um padrão de comportamento quanto ao parâmetro densidade (figura 16), aumentando a cada dia ao longo dos 12 dias de teste. As formulações LB 12 apresentaram mudanças de densidade de 6 % e 8,8 %, respectivamente, diferente das LB 16 e LB 17 que apresentaram praticamente o mesmo comportamento e com menores mudanças, em torno de 2,5 %.

É provável que a variação maior da densidade das formulações LB12 seja por se tratar de formulações do tipo gel creme, desta maneira, formam uma rede de entrelaçamento por conta do polímero, possibilitando a incorporação de ar com o movimento de batidas

necessárias para acomodação do produto no picnômetro. Tais valores de variações são aceitáveis e estão dentro do limite-padrão, pois foram inferiores a 10%, de acordo com ISAAC *et al.* (2008). Ainda nesse estudo, foi relevado que alterações acima de 20% sugerem grande possibilidade de surgimento de sinais de instabilidade.

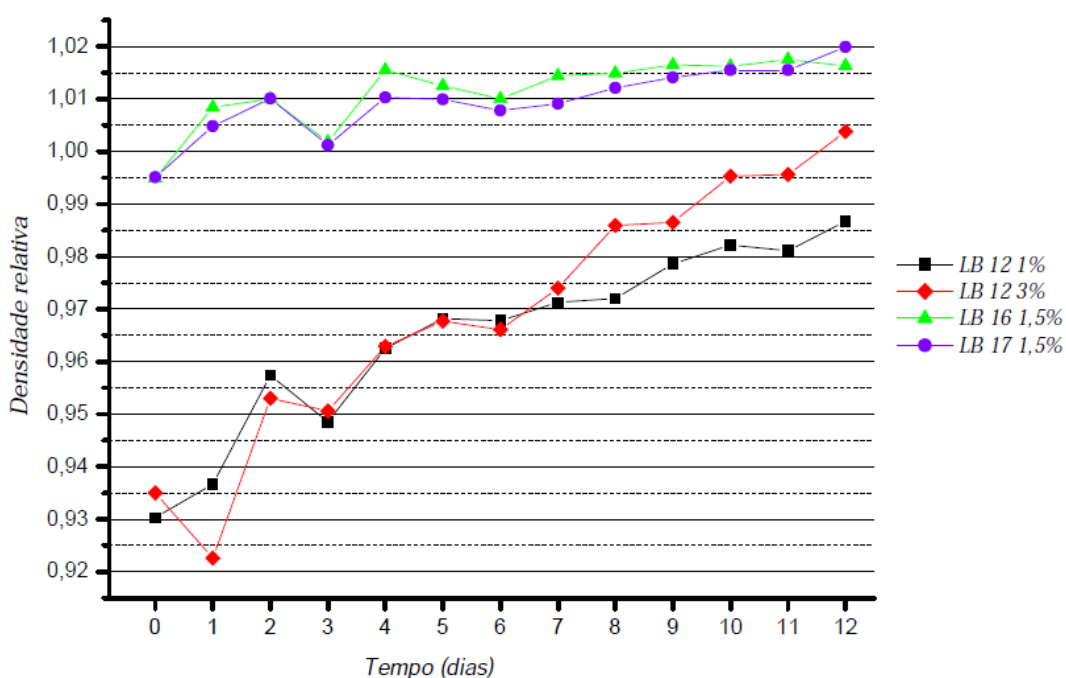


Figura 16 - Determinação da densidade relativa das formulações na estabilidade preliminar
Legenda: Densidade relativa

5.4.3 Estabilidade Acelerada

Como as quatro formulações passaram na estabilidade preliminar, o estudo de estabilidade acelerada seguiu com a finalidade de definir uma formulação estável para ser a formulação final do trabalho e estimar o prazo de validade.

O pH é um parâmetro de importante avaliação, pois sua alteração pode provocar modificações nas características físico-químicas do ativo e na estabilidade das formulações, comprometendo a segurança e eficácia do produto (BUGNOTTO *et al.*, 2006). As quatro formulações apresentaram diminuição do pH ao final do estudo como representado na figura

17, mas mantendo-se dentro da faixa esperada (entre 4 e 5), esta variação quando analisada pelo ANOVA não demonstrou significância ($p > 0,05$).

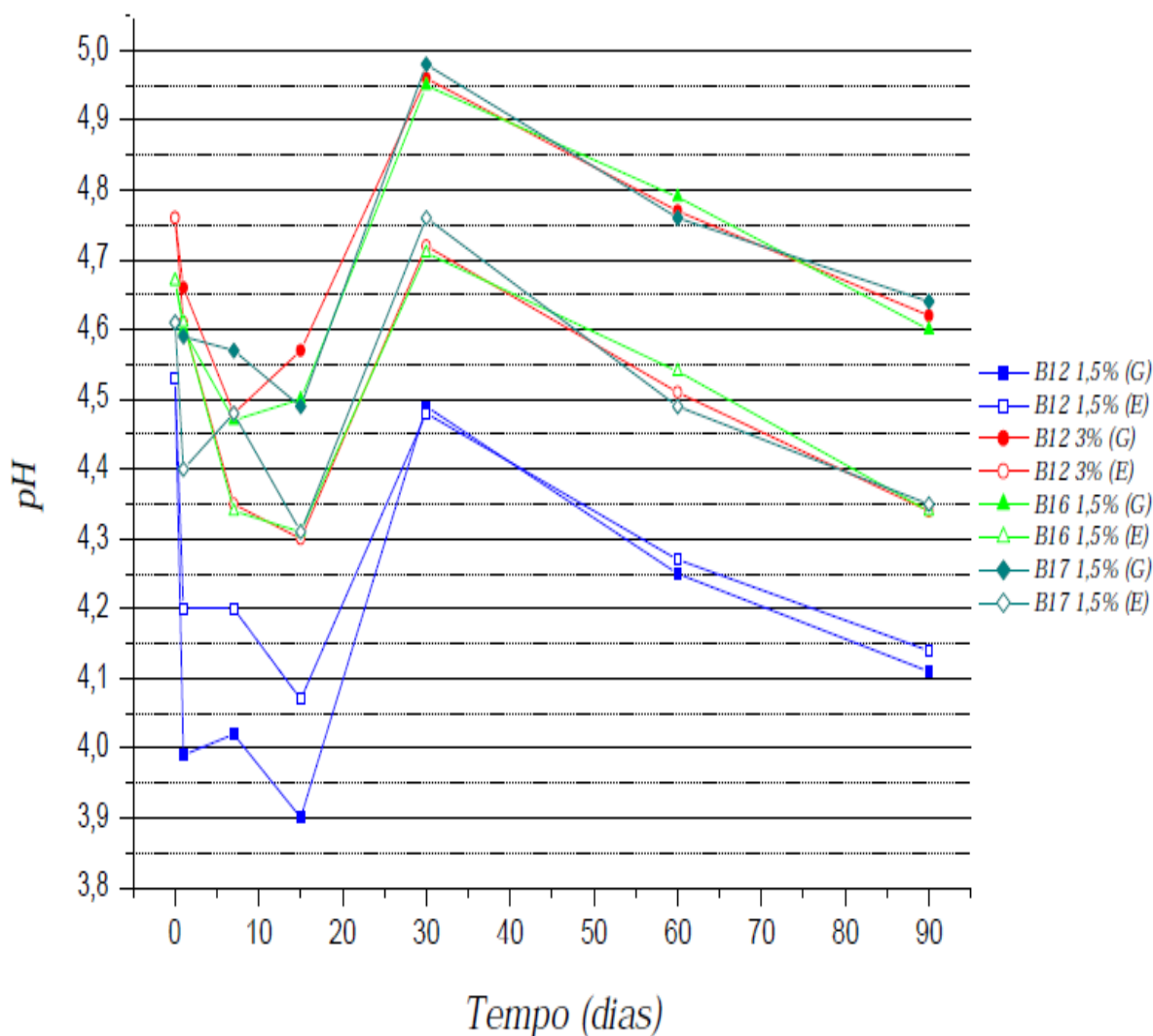


Figura 17 - Determinação do pH das formulações no estudo de estabilidade acelerada
Legenda: G= geladeira; E= estufa

A densidade relativa aumentou ao longo do estudo, as variações tanto da densidade como do pH foram maiores nas bases LB12 1 % e LB12 3 % do que na LB16 1,5 % e LB17 1,5 % (figura 18), entretanto dentro do limite de 10% de variação estabelecido (ISAAC *et al.*, 2008). Na análise estatística pelo ANOVA a variação da densidade apresentou $p > 0,05$, não sendo significativa.

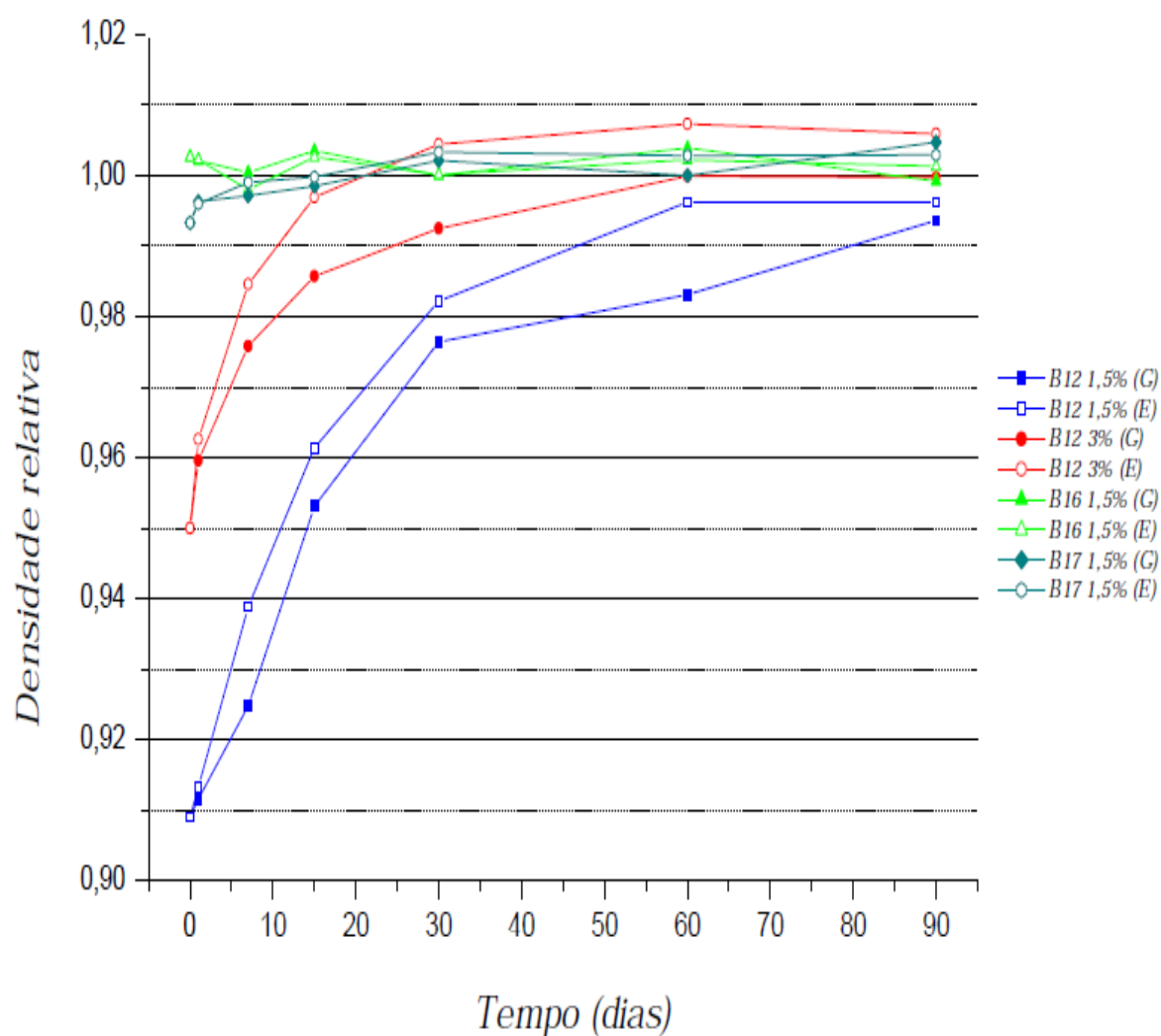


Figura 18 – Determinação da densidade relativa das formulações no estudo de estabilidade acelerada
 Legenda: G= geladeira; E= estufa

As formulações desenvolvidas apresentam um aspecto muito viscoso e ao testá-las no Viscosímetro Rotacional Digital Brookfield, modelo DV-II +, as formulações LB12 -1 e 3 %, apresentaram leitura apenas com o spindle F e só nas duas primeiras velocidades 0,5 e 1 rpm. As formulações LB16 e LB17, ambas com 1,5 % de ESPN 7,5 apresentaram leituras em mais velocidades, mas como a finalidade era estabelecer um padrão de comparação entre as quatro formulações, a viscosidade foi medida de forma pontual, na velocidade de 0,5 RPM nos tempos zero e 90.

Observando a tabela 9, a viscosidade, aumentou em todas as formulações, sendo o aumento maior nas condições de baixa temperatura ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Nas formulações LB16 e LB 17 o aumento foi um pouco mais elevado que nas formulações LB12.

Formulações	Viscosidade Inicial (cP)	Viscosidade Final em Geladeira (cP)	Viscosidade Final em Estufa (cP)
LB12 1 %	7510	11949	10474
LB12 3 %	7830	11987	8830
LB16 1,5 %	6779	12069	12009
LB17 1,5 %	6623	12071	11548

Tabela 9 - Valores da viscosidade das formulações durante a estabilidade acelerada

As amostras foram avaliadas de maneira subjetiva quanto às características organolépticas (tabela 10). No tempo zero as formulações LB 12 1 e 3% apresentaram um aspecto de gel cremoso homogêneo e brilhoso de cor bege a LB12 1% e marrom a LB 12 3%, ambas com odor característico da essência utilizada. A LB16 1,5% e LB 17 1,5% apresentaram no tempo zero um aspecto cremoso, homogêneo e brilhoso, de cor marrom claro e odor característico da essência.

Aspecto						
Amostra	T 1	T 7	T 15	T 30	T 60	T 90
B12 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B12 + 1,5% - E	N	N	N	N	N	LA
B12 + 3% - G	N	N	N	N	N	N
B12 + 3% - E	N	N	N	N	N	LA
B16 + 1,5% - G	LA	LA	LA	LA	A	A
B16 + 1,5% - E	LA	LA	LA	LA	LA	A
B17 + 1,5% - G	N	LA	LA	LA	LA	N
B17 + 1,5% - E	N	LA	LA	LA	LA	LA
Cor						
Amostra	T 1	T 7	T 15	T 30	T 60	T 90
B12 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B12 + 1,5% - E	N	N	N	N	LM	LM
B12 + 3% - G	N	N	N	N	N	N
B12 + 3% - E	N	N	N	LM	LM	M
B16 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B16 + 1,5% - E	N	N	N	LM	LM	LM
B17 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B17 + 1,5% - E	N	N	N	N	LM	LM
Odor						
Amostra	T 1	T 7	T 15	T 30	T 60	T 90
B12 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B12 + 1,5% - E	N	N	N	N	N	LA
B12 + 3% - G	N	N	N	N	N	N
B12 + 3% - E	N	N	N	N	N	A
B16 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B16 + 1,5% - E	N	N	N	N	N	LA
B17 + 1,5% - G	N	N	N	N	N	N
B17 + 1,5% - E	N	N	N	N	N	LA

Tabela 10 – Avaliação subjetiva das características organolépticas no estudo de estabilidade acelerada

Legenda: T=tempo; G = Armazenada em Geladeira; E= Armazenada em Estufa; N= normal; LA= levemente alterado; A= Alterado; LM= levemente modificado; M= modificado; I= intensamente modificado

Ao final dos 90 dias do estudo de estabilidade as formulações LB12 -1 e 3 % apresentaram leve alteração no aspecto apresentando mais viscosidade e menos brilho, a LB12-3 % apresentou moderada alteração, com intensificação cor e odor no terceiro mês de análise, entretanto, por ter ocorrido na formulação com maior quantidade de extrato, no último dia da avaliação e de maneira moderada, as variações foram aceitáveis.

Enquanto que as formulações LB16 e LB17, ao final do estudo foram reprovadas nas características organolépticas de aspecto, pois ao longo dos 90 dias apresentaram separação de um líquido, inicialmente, em pouca quantidade, mas ao final do estudo a quantidade de líquido liberado aumentou. Lembrando que na estabilidade preliminar a separação de uma pequena quantidade de líquido foi observada nestas formulações, em alguns dias analisados, esta permanência ao longo do estudo demonstra a instabilidade do produto.

É possível que a instabilidade tenha ocorrido entre os excipientes que compõem a base da emulsão com a quantidade elevada de trietanolamina utilizada para o ajuste do pH. O hidróxido de sódio foi testado durante a fase de desenvolvimento para a correção de pH, mas provocou quebra imediata das fases, o que não ocorreu com a adição da trietanolamina no primeiro momento, por isso a escolha do seu uso.

Com a exclusão das formulações em creme LB16 e LB17 com 1,5 % de ESPN, a escolha da formulação ficou entre as formulações do tipo em gel creme LB12 1 e 3% de ESPN. Como a LB12 -3% tem maior concentração do ESPN e a LB12 1% apresentou uma variação maior na determinação do pH e na densidade. A formulação selecionada foi a LB12 - 3%, um gel creme com 3% de ESPN (figura 19).



Figura 19 – Formulação selecionada na estabilidade acelerada – LB12 3%
FONTE: Autora

5.4.4 Reologia da LB12 com 3% do ESPN 7,5

A figura 20 representa o reograma da LB12 3%, podemos verificar que não há um comportamento linear da viscosidade em relação à tensão de cisalhamento (shear stress) e a taxa de cisalhamento (shear rate), e que a viscosidade sofre alterações com o aumento da força de cisalhamento, característica de um fluído não-newtoniano.

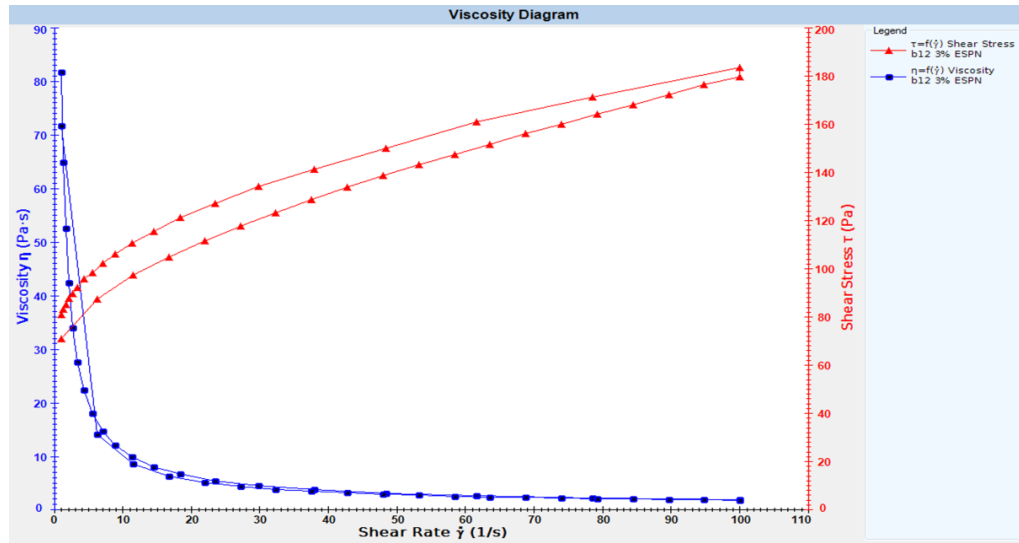


Figura 20- Reograma da formulação LB12 3%.

Legenda: Viscosidade versus taxa de cisalhamento em azul. Tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento em vermelho.

Ao relacionar a viscosidade com a taxa de cisalhamento, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo este um comportamento específico do fluxo pseudoplástico. No reograma (curva em vermelho) é possível observar um comportamento pseudoplástico com valor de cedência, ou seja, no início há certa dificuldade na deformação do produto com o aumento lento da tensão de cisalhamento, provocando uma ruptura da estrutura dimensional, a uma dada aplicação de força (tensão) as moléculas se alinham na direção do fluxo e o material flui facilmente com o aumento do cisalhamento.

Pelo reograma (figura 21) também é possível observar o comportamento tixotrópico com a formação de histerese, área entre as curvas ascendentes e descendentes.

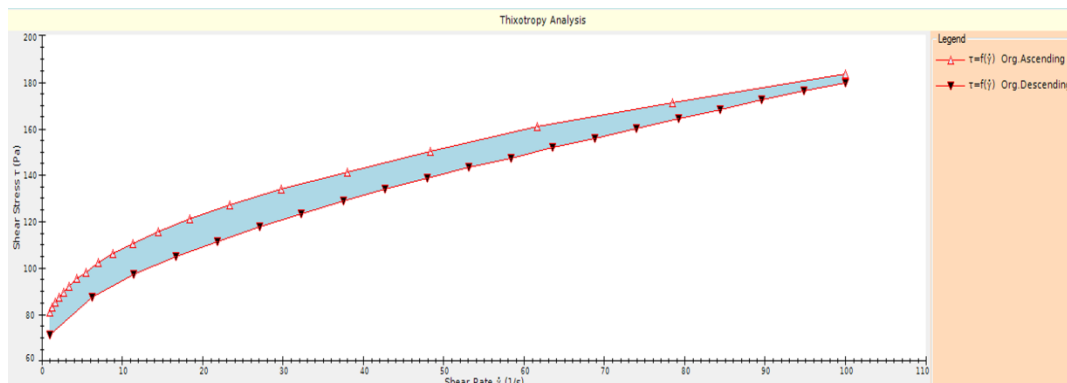


Figura 21 – Comportamento tixotrópico o gel creme LB12 3%

A formulação apresenta o comportamento desejável para uma formulação semissólida, um perfil reológico pseudoplástico com tixotropia. O comportamento pseudoplástico no produto mostra que com aplicação de uma força, a resistência inicial da formulação em fluir diminui, facilitando a sua aplicação. E o comportamento tixotrópico também está relacionado com a diminuição da viscosidade, facilitando a aplicação do produto, ao promover o retorno parcial da viscosidade, permite que o produto não escorra quando a força aplicada para espalhar o produto na pele for interrompida (WOOD, 2001; MILAN *et al.*, 2007)

5.4.5 Espalhabilidade da LB12 com 3% do ESPN 7,5

Juntamente com a viscosidade, a determinação da espalhabilidade serve para avaliar alterações nas características reológicas da formulação durante o estudo. No caso de semissólidos de uso tópico, a quantificação desse parâmetro é importante para definir e acompanhar modificações na capacidade que a formulação tem de se espalhar ou abranger determinada área, o que pode facilitar ou dificultar sua aplicação, além disso, o consumidor ao escolher um produto de uso tópico leva em consideração o seu aspecto, a sensação ao tato e a boa espalhabilidade (BUGNOTTO *et al.*, 2006; BORELLA *et al.*, 2010)

Na formulação LB12 3% a espalhabilidade máxima foi de 1135 mm² e o esforço limite foi de 1037,5g, isto significa que a soma do peso das placas promoveu uma expansão de quase três vezes a área inicial, como está representado na figura 22.

Pela literatura é possível observar que os cremes costumam apresentar maiores valores de espalhabilidade e chegam a uma espalhabilidade final 3 a 5 vezes maior que a inicial, enquanto os géis apresentam espalhabilidade com valores menores e costumam apenas duplicar sua área final (FRIEDRICH *et.al.*, 2007; ALVES, 2014). Com isto, é possível verificar uma boa espalhabilidade da formulação que por ser um gel creme une o melhor das duas características, ou seja, a expansão é maior que a de um gel, logo maior espalhabilidade,

mas dentro de um valor de área menor, impedindo que o produto escorra, colaborando com as características pseudoplástica e tixotrópica encontradas no estudo reológico.

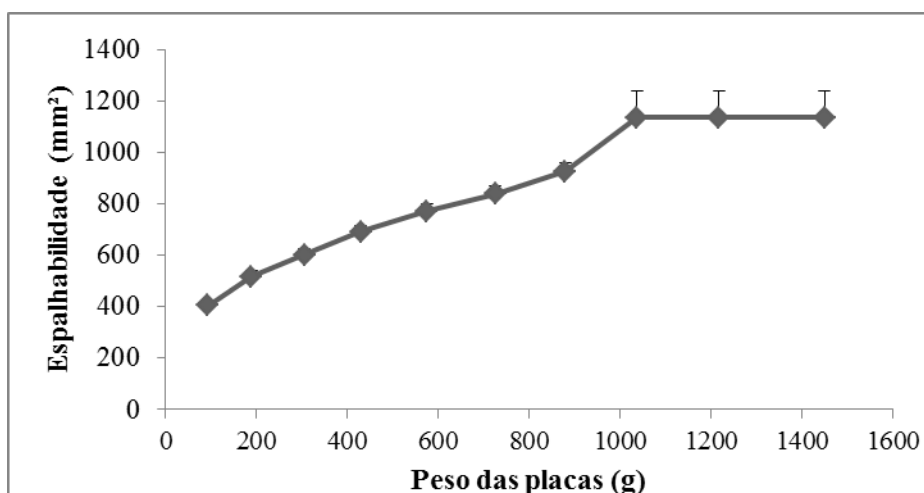


Figura 22 - Gráfico da Espalhabilidade do gel creme LB12 3% em função do peso das placas

5.5 Estudo de cultura em células

O potencial citotóxico do ESPN e da formulação LB12 -3% foi avaliado em cultura de células B16F10. O resultado da figura 23 indica que em 72h até a concentração de 100 µg/mL o ESPN e a formulação LB12 3% não causaram citotoxicidade. A segurança é um fator fundamental na escolha dos ativos utilizados na fabricação de cosméticos (LIANG *et al.*, 2012), a ANVISA regulamenta na RDC nº 4 de janeiro de 2014, que é dever do detentor do produto possuir dados comprobatórios que atestem a qualidade, segurança e eficácia do produto. Ao observar os resultados da viabilidade celular tanto o extrato seco como a formulação contendo a *P. nitida* apresentam ser seguro mesmo em concentrações mais elevadas como a de 100 µg/mL.

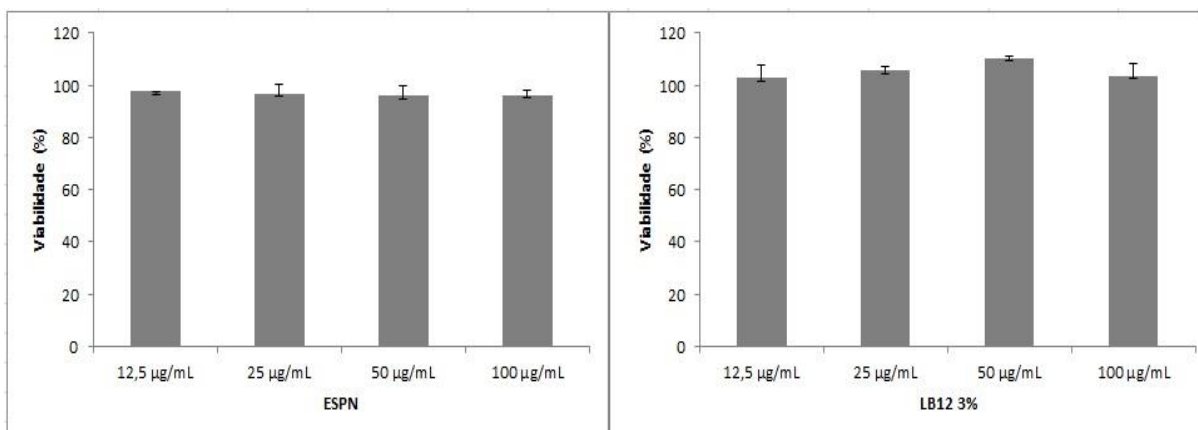


Figura 23 - Gráfico da Viabilidade celular do extrato seco de *P. nitida* e do gel creme LB12 3% em célula B16F10

A tirosinase é a principal enzima reguladora da melanogênese, pois catalisa as reações limitantes da cascata (SCHALHEUTER, 2007). Desta forma, é um dos principais mecanismos estudados quando se pesquisa uma atividade de clareamento da pele. O resultado encontrado para inibição da tirosinase em células B16F10 pelo ESPN e LB12 -3% foram negativos, entretanto, até mesmo o padrão não apresentou um resultado satisfatório, assim, não é possível confirmar por este teste, realizado em células B16F10, que a *P. nitida* não possui a capacidade de inibir a tirosinase.

A atividade do ESPN e da formulação LB12 -3% sobre a síntese da melanina foi avaliada utilizando as células B16F10, o resultado na figura 25 mostra que ESPN promoveu inibição da melanogênese nas células estimuladas com o IBMX 25 µM, assim como, o produto LB12 -3%, em comparação ao resultado do padrão, a Feniltiouréia 25 µM, o ESPN apresentou resultado melhor e o produto LB12 -3% apresentou resultado praticamente igual. A significância foi avaliada pelo test t para as células Não Estimulada (NE) e célula estimulada com IBMX, apresentando significância com $p < 0,05$.

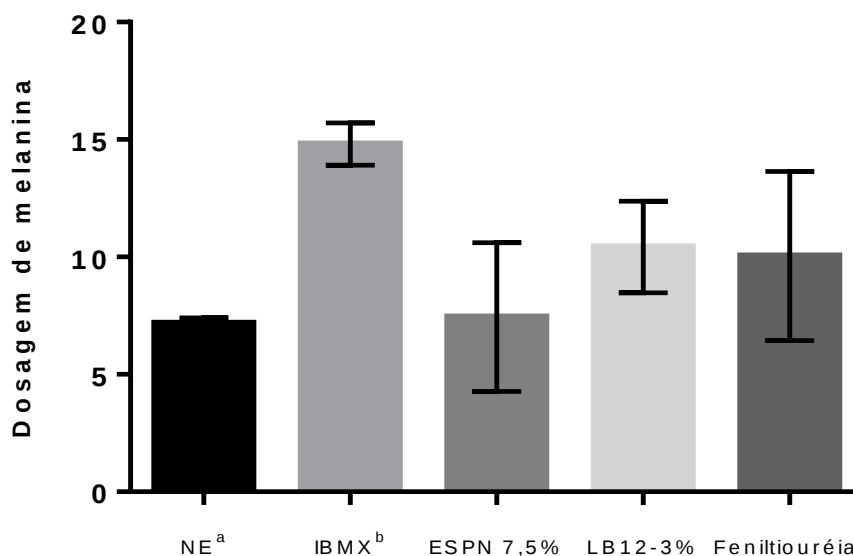


Figura 24 – Capacidade de redução da melanogênese pela *P. nitida* em células B16F10

Legenda: NE (Não estimulada); IBMX 25 μ M; Feniltiouréia 25 μ M; ESPN = extrato seco de *P. nitida* (50 μ g/mL); LB12- 3%= gel creme com *P. nitida* (50 μ g/mL).
As letras a e b representam a diferença estatística onde $p < 0,05$.

Analisando a via de síntese da melanina, a dihidroxifenilalanina (DOPA) é convertida a dopacroma pela ação da enzima tirosinase ou por auto-oxidação e por reações subsequentes de oxidação do dihidroxi-indol (DHI) e do ácido carboxílico dihidroxiindólico (DHICA) formam o produto final que é a melanina. Assim, a inibição da melanogênese pode ser alcançada por substâncias antioxidantes ou por inibidores da tirosinase (HEO *et al.*, 2010).

Analisando os bons resultados da atividade antioxidante – DPPH e ABTS encontrados no ESPN, com a redução da melanogênese em cultura de célula de 50% pelo ESPN (50 μ g/mL) e de 30% pela formulação LB12 3% (50 μ g/mL), junto com viabilidade em 72h de 95,79 ($\pm$ 3,8) e 110,18 ($\pm$ 0,69), respectivamente, na concentração de 50 μ g/mL. É possível concluir que a *P. nitida* apresenta uma boa atividade de redução da melanogênese e sem causar dano as células. E esta atividade pode estar associada a sua atividade antioxidante, mas para a definição do real mecanismo de ação é necessário a realização de outros estudos para confirmação.

5.6 Teor de Flavonoides Totais por espectrofotometria UV-visível (TFT)

Com a finalidade de definir uma metodologia analítica simples para o controle de qualidade da matéria-prima (ESPN) e da formulação (LB12 -3%) optamos por utilizar o TFT descrito na Farmacopéia Brasileira (2010) para duas outras espécies de *Passiflora* a *P. alata* e *P. edulis*.

Os resultados de TFT encontrados foram de: 1,2 % ($\pm 0,005$) para o ESPN 7,5, para a DV foi de 0,3 % $\pm (0,005)$ e para a formulação LB12 3% foi de 0,2 % ($\pm 0,012$), expressos em apigenina, o valor representa a média da triplicata. A variação dos teores entre o extrato seco e a formulação era esperada pois na formulação temos a interferência dos excipientes e adjuvantes utilizados, além do fato que o extrato está em uma concentração de 3% na formulação e, ainda, diluído na base cosmética.

A referência farmacopeica de TFT é de no mínimo 1% para as espécies *P. alata* e *P. edulis*, na literatura os valores de TFT sofrem grande variação até por serem utilizadas metodologias diferentes, por exemplo, para a *P. alata* temos TFT variando de 0,033 a 0,087% expresso em apigenina e em outro estudo o TFT varia entre 1,59 a 2,93% expressos em quercetin (MULLER *et al.*, 2005; PINELI *et al.*, 2014). Há uma referência de TFT para a *P. nitida* de 1,69 % para amostra em infusão e de 3,07 % para extrato hidroetanólico (40% v/v) expresso em quercetin. (PINELI *et al.*, 2014) Apesar dos valores mais elevados do que os encontrados no presente trabalho acreditamos que o método estabelecido, na Farmacopeia Brasileira, de TFT para duas espécies de *Passiflora* seja mais adequado do que utilizar a metodologia descrita na monografia de outra planta.

6 CONCLUSÃO

O extrato seco de *P. nitida* a 7,5% foi considerado a melhor relação droga-solvente com base no resultados das análises de: granulometria a laser, S_{BET} , Fluorescência de raios-X e no teor de fenóis e flavonoides. Além de apresentar atividade de inibição da tirosinase e significativa atividade antioxidante *in vitro*. Por tanto, foi o extrato utilizado para o desenvolvimento das formulações. A fórmula que apresentou as características desejadas e a melhor estabilidade foi o gel creme com aristoflex (LB12) com 3% de ESPN 7,5.

Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi alcançado. Uma formulação semissólida contendo o extrato seco de *P. nitida* foi desenvolvida com as atividades pretendidas de auxiliar o rejuvenescimento e clarear a pele, por comprovação *in vitro* da atividade antioxidante e de redução da melanogênese - com estabilidade acelerada aprovada e sem citotoxicidade. Assim, temos um produto com ativo amazônico desenvolvido com toda base de pesquisa, desde sua droga vegetal até o desenvolvimento de uma formulação visando disponibilizar ao consumidor um produto de qualidade, seguro e eficaz.

7 PERSPECTIVAS

- Como perspectivas têm-se as análises *in vivo* para confirmação da eficácia e segurança do produto, requisitos necessários para registro junto à ANVISA.
- A busca por um marcador majoritário para o controle de qualidade mais específico à *P. nitida* com uso de CLAE e, se necessário, da espectrometria de massa.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDILLE, M. D. *et al.* Antioxidant activity of the extracts from Dillenia indica fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n.4, p. 891– 896; 2005.

ABOURASHED, E. A.; Vanderplank, J. R.; Khan, I. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – I. Application to Passiflora flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 81–91, 2002.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL - ABDI. Estudo Prospectivo Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos - Brasília: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2009. 208 p.: il.; graf.; tab. (Série Cadernos da indústria ABDI XIII) ISBN 978-85-61323-08-0 Acessado em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/XIII.pdf>, dia 09 de fevereiro de 2015.

AHMED, S.A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-19; 1993.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Artmed: Porto Alegre, Brazil, 2007, ch 5.

ALMEIDA, R. R. *et al.* Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis. **Thermochimica Acta**, v. 519, p. 50–54, 2011.

ALVES, M.P. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ALVES, L. D.S. Thuja occidentalis Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento de HPV. **Tese** ((Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

ARARUNA, S.M. *et al.* Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23(1), p. 132-137, 2013.

ATTWOOD, D. Sistemas dispersos. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ª ed. Artmed: Porto Alegre, cap. 4, p. 98-111, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS – ABIHPEC. Panorama do setor de HPPC 2014. São Paulo: ABIHPEC, 2014. Acessado em: <http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-DEZ-2014.pdf>, dia 09 de fevereiro de 2015.

BABY, A.R. *et al.* Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p.233-248, 2008.

BAE, H. *et al.* Extraction efficiency and validation of na HPLC method for flavonoid analysis in pepers. **Food Chemistry**, v. 130, p. 751-758, 2012.

BANNACH, G. *et al.* Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero PET: Um experimento para ensino de análise térmica. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825-1829, 2011.

BARNI, S.T.; FILHO, V.C.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19(4), p. 865-870, 2009.

BARRY, B. Sistemas dispersos. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ª ed. Artmed: Porto Alegre, cap. 33, p. 532, 2005.

BASTOS, C.A. Otimização por cromatografia líquida em fase reversa por pareamento iônico para análise simultânea de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina em formulações farmacêuticas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – UFJF, Juiz de Fora, 2008.

BATISTELA, M. A.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 59-62, 2007.

BATISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário Médico Farmacêutico**. 2ªed. Tecnopress: São Paulo, 2002.

BAUMANN, L. Distúrbios da pigmentação. **Dermatologia cosmética- Princípios e prática**. ed. 1; Tijuca. Ed. Livraria e editora Revinter Ltda, 2004.

BENDINI, A. *et al.* Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **European Food Research Technology**, v. 223, p. 102-109, 2006.

BERNAL, C. *et al.* Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849 - 855, 2002.

BEZERRA, J.A.F. *et al.* Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21 (Supl. 3), p. 16-25, 2006.

BILLANY, M. Suspensões e emulsões. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ª ed. Artmed: Porto Alegre, cap. 23, p. 341-364, 2005.

BORELLA, J.C. *et al.* Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193,197, 2010.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, 2006.

BORRÁS, M. R. O. Plantas da Amazônia: medicinas ou mágicas? – **Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa**. Valer: Manaus /Governo do Estado do Amazonas, 2003.

BORRELLI, F. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytotherapy Research**, v. 10 (Suppl 1), p. 104S-6S, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. V. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Séries Temáticas: Qualidade 1. **Guia de Estabilidade de produtos cosméticos**. v.1, p.45; Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Utilização de alfa-hidroxiácidos em produtos cosméticos. **Parecer Técnico nº 7**, de 28 de setembro de 2001, atualizado em 16/02/2006. Acessado em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Cosmeticos/Assuntos+de+Interesse/Camara+Tecnica>, dia 12/01/2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª edição, Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Farmacopéia Brasileira V**, 5ª ed. Brasília, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume e dá outras providências. Resolução – RDC nº 4, de 30 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BORELLA, J. C. *et al.* Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonóides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 2;31(2), p.193-197, 2010.

BUGNOTTO, C. *et al.* ESTUDO DE ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO PRÓPOLIS. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

BUNDESVEREINIGUNG. Deutscher Apothekerverbände, Arzneimittel – **Codex**. 1986. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, v.1; Codex – Probe 4,9, 1986.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33(2), p.179-189, 2000.

CAMARGO, M. F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ribeirão Preto, SP, 99p.: Il., 2008.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; LEONARDI, G.R.; BONTEMPO, E.M.B.G.; **Formulário Dermocosmético 2.** 1ªed. Tecnopress: São Paulo, p.67, 1999

CARVALHO, M. J. *et al.* Estudo farmacognóstico e atividade *in vitro* sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). *Acta Amazônica*, v. 40, p. 199-206, 2010.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.** Ed. UFSCar: São Paulo, p. 77, 2009.

CASTELI, V.C. *et al.* Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. *Acta Scientiarum Health Sciences (UEM)*, 2008.

Acessado em

<<http://www.thefreelibrary.com/Desenvolvimento+e+estudos+de+estabilidade+preliminares+de+emulsoes...-a0197599304>>, dia 9 de fevereiro de 2015.

CHANG, C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.10, p.178-182, 2002.

CHANG, T.S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Science*, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

COHEN, K.O. *et al.* Passiflora nítida: características físico-químicas e compostos funcionais. SIMPOSIO INTERNACIONAL DE SAVANAS TROPICAIS, Brasília, 2008. Acessado em: <www.cpac.embrapa.br/download/631/t>, dia 28 de fevereiro de 2014.

COTELLE N. *et al.* Antioxidant properties of hydroxylflavones. *Free Radical Biology Medicine*, v. 20(1): p. 35-43. 1996.

COUTO, R.O. *et al.* Spray-dried rosemary extracts; Phsycochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.131, p. 99 – 105, 2012.

DANDOLINI, B.W. *et al.* Estudo e desenvolvimento de formulações para tratamento e/ou prevenção de estrias. III JORNADA UNISUL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, **Poster**. UNISUL: Campus Tubarão/ Santa Catarina, 2008. Acesso em < http://www.rexlab.unisul.br/junic/2008/projeto_000179.html>, dia 5 de novembro de 2014.

DASTMALCHI, K.D.D.H.; KOSAR, M.J.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 239-248. 2007.

DEMIRKIRAN, O. *et al.* Antioxidant and tyrosinase inhibitors activities of flavonoids from *Trifolium nigrescens* Subsp. *Petrisavi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12598- 12603, 2013.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A.; *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K.; SHARMA, A.; Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 397-9, 2002.

DOYAMA, J.T. *et al.* Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371-4, 2005.

DORNAS, W.C. *et al.* Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.

EBRAHIMZADEH, M.A.; POUMORAD, F.; BEKHRADNIA, A.R.; Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 3188-3192, 2008.

FARIAS, M.R.; SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.liaç; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R.; Avaliação da qualidade de matérias-prima vegetais. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 12. p. 263 - 288.

FERREIRA, A.O. Formas farmacêuticas semissólidas. Guia Prático da Farmácia Magistral. 3 ed. Pharmabook: São Paulo, 2008, v.1, cap. 6, p. 277-295.

FRIEDRICH M. *et al.* Avaliação da estabilidade físico-química de creme não-iônico inscrito no Formulário Nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, V. 26, n. 4, p. 558-62, 2007.

FONSECA, F.N.; Silva, A. H.; Leal L. K. A. M. Justicia pectoralis Jacq., Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 10, n. 6, 2010.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V; CAVALHEIRO, M.V.S; SANTOS, R.R.; TOMASSINI, T. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades, 1995. Acessado em: < www.bdt.org.br>, dia 4 de dezembro de 2013.

GARCÍA-MOLINA M. S. *et al.* Hydrogen Peroxide Hepls in the Identification of Monophenols as possible Substrates of Tyrosinase. **Bioscience. Biotechnology and Biochemistry**, v.77(12), p. 22383-2388, 2013.

GOSMANN, G. *et al.* Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de Passiflora L. (Passifloraceae) – Revisão. **Revista Brasileira de. Biociência**, Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 88-99,. 2011.

GASPARETTI, C. *et al.* Extracellular tyrosinase from the fungus *Trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *Agaricus bisporus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1824, n. 4, p. 598-607, 2012.

HEARING, V. J. Jr.; Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, poperties and reactions catalyzed. **Methods in Enzumology**, v.142, p.154-165, 1987.

HEO, S. J. *et al.* Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. **Food and Chemical Toxicology**, 2010.

HOPKINS, M. J. G.; SOUZA, M.A.D. Passifloraceae. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. p. 299; Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, 1999.

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

HUANG, Y-C.; YANG, C-H.; CHIOU, Y-L. Citrusflavanone naringenin enhances melanogenesis through the activation of Wnt/ β -catenin signalling in mouse melanoma cells. *Phytomedicine*, v. 18, p. 1244–1249, 2011.

HUANG, Y-C.; LIU, K-C.; CHIOU, Y-L. Melanogenesis of murine melanoma cells induced by hesperetin, a *Citrus* hydrolysate-derived flavonoid. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 653–659, 2012

ICHIMURA, T. *et al.* Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 3, p. 718-21, 2006.

IDSON, B. & LAZARUS, J. Semi-sólidos. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, ch. 18, p. 907-908, 2001.

IRIYAMA, S.; ONO, T.; AOKI, H.; AMANO, S. Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal–epidermal junction. *Journal of Dermatological Science*, v. 64, p. 223–228, 2011.

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*; v. 29(1), p.81-96, 2008.

JANSSEN, K. Handbook of Spectroscopy - Gauglitz G.; Vo-Dinh T.; Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; Donoghue M. J. Plant Systematics: A Phylogenetic. Approach, 2nd ed Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2002, p. 576.

JUNQUEIRA, K.P *et al.* Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, p. 571-575, dez. 2007.

KAWATRA, S.K., BAKSHI, A.K. On-line measurement of viscosity and determination of flow types for mineral suspensions. *International Journal of Mineral Processing*, v. 47, p.275-283,1996.

KEDE, M. P. V.; SABATOWICH. *Dermatologia Estética*. Ed. Atheneu: São Paulo, 2004.

KHANAM, U.K.S. *et al.* Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4, p. 979-987, 2012.

KIM, J.Y. *et al.* Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid and Polymer Science*, v. 281, p.614, 2003.

KIM, Y.J.; UYAMA. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 1707–1723, 2005.

KODAMA, D.H. *et al.* Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1077-1082, 2010.

LEONARDI, G.R. *Cosmetologia Aplicada*. 1ª ed. Editora Medfarma, p.154, 2004.

LEONARDI, G.R. *et al.*; Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. *An. Bras. Dermatol.* vol.77 no.5, Rio de Janeiro; 2002.

LIANG, C.; LIM, J-H.; KIM, S-H.; KIM, D-S. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china. *Food Chemistry*, v. 134, ch. 2, p.1146-8, 2012

LIMA, E. S. *et al.* Efeito hipoglicemiante da farinha do fruto de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth) em ratos normais e diabéticos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 383-388, 2012.

LIMA, E. S. OLIVEIRA, N. S. M. de; CARVALHO, M. J.; Fenóis totais e atividade antioxidante de extratos das folhas de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* H.B.K). 61ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, **Resumo** Manaus: UFAM, 2009. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/4595.htm>>. Acesso em: 16/10/2013.

LIU, J. J.; FISHER, D. E. Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 23, p. 741–745, 2010.

MAMEDE, L. C. *et al.* Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 2, p. 151-155, 2006.

MARRIOTT, C. Reologia. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Artmed: Porto Alegre, cap. 4, p. 56-73, 2009.

MATOS, J. R. *et al.*; Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos. **Biofarmacotécnica**, 1ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, cap.4, p. 32-65, 2011.

MAXIMIANO, F.P. *et al.*, Physicochemical characterization of antichagasic benzimidazole. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 8, p.1714-1719, 2010 .

MAZZARINO, L.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e caracterização farmacotécnica de formas farmacêuticas semi-sólidas contendo nimesulida. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26(3), p.415-419, 2007.

MENDEZ *et al.* Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32(1), p.105-111, 2011.

MIGLIATO, K.F. *et al.* Controle de qualidade do fruto *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101. 2007.

MILAN, A.L.K. *et al.* Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n. 4, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTEFUSCO-PEREIRA, C.V. *et al.* Antioxidant, Anti-inflammatory, and Hypoglycemic Effects of the Leaf Extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1367- 1378, 2013.

MORAES C.M. *et al.* Susceptibilidade de *Passiflora nitida* as passion fruit woodness vírus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 108-113, 2002.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Trib. Farm.**, Curitiba, v. 47, nº 1, p. 1-19, 1979.

MULLER, S.D. *et al.* LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v37, p. 399-403, 2005.

NASSIRI-ASL,M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 26, 2007.

NEMA, N. K. *et al.* *Cucumis sativus* fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, p. 247–252, 2011.

NERY, C.G.C. *et al.*, Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n.1, p. 61-73, 2008.

NISHIKAWA, D.O. *et al.* Avaliação da estabilidade de máscaras faciais *peel-off* contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.2, p.227-232, 2007.

OH, E. Y. *et al.* Inhibitory effects of 1-O-methyl-fructofuranose from *Schisandra chinensis* fruit on melanogenesis in B16F0 melanoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 219–224, 2010.

OLIVEIRA, O.W; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, M.A. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVERIA, K.B. *et al.* Tyrosinase immobilized enzyme reactor: Development and evaluation. **Journal of Chromatography B**, p. 10– 16, 2014.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, p. 307–315, 1986.

PARKA, K-T. *et al.* Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on melanogenesis induced by ultraviolet B irradiation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3038–3045, 2011.

PINELI, L.; RODRIGUES, L. D. O., *et al.* Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild passiflora from Brazilian savannah: potential as functional beverages. ***Journal Science Food Agriculture***, v.10.1002/p. 6852, 2014.

PLOTZE, R. O. *et al.* Leaf shape analysis by the multiscale minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study in passiflora L. (Passifloraceae). ***Canadian Journal of Botany***, v. 83, n. 3, p. 287-301. 2005.

PORTE, L.H.M; LEÃO M.H.M.R.; PORTE A. Avaliação da porosidade de microcápsulas contendo proteína bioativa por porosimetria de mercúrio e adsorção de nitrogênio. ***Química Nova***, v. 34, p.1582-1587, 2011.

QUINN, A. Biology of the skin and dermatological disease. ***Medicine Basic Science***, v.32, n. 12, p. 1-3, 2004.

RANKELL, A.S.; LIEBERMAN H.Á.; SCHIFFMAN, R.F. Secagem. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Vol 1. Lisboa: Calouste Gulbenkian, p. 83-12, 2001.

RATES, S.M.K.; Plants as source of drugs. ***Toxicon***, v.39, pag. 603-613, 2001.

RATNAN, D. V. *et al.* Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. ***Journal of Controlled Release***, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAWLINGS, A.V. *et al.* Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. ***Drug Discovery Today: Disease Mechanisms***, v. 5, n. 2, p. 127-136, 2008.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. ***Free Radical Biology and Medicine***, New York, v.26, p.1231–1237, 1999.

RIBEIRO, H.M *et al.* Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. ***International Journal of Cosmetic Science***, v.26, p 37-59, Mar. 2004.

RIEGER, M.M. Emulsões - **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, ch. 17, p. 855- 907, 2001.

RODRIGUES, L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 45, n. 1, p. 52-9, 1995.

RUDIGER, A. L.; SILVA C. C.; VEIGA JUNIOR V. F. EDXRF analysis of Amazonian Burseraceae Oleoresins. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1077.9, 2009.

RUDNICKI, M. *et al.* Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719-24, 2007.

RYOO, I-J. *et al.* Anti-Skin Aging Effect of Syriacusins from *Hibiscus Syriacus* on Ultraviolet-Irradiated Human Dermal Fibroblast Cells. **Biomolecules & Therapeutics**, n. 18, v. 3, p. 300-307, 2010.

SACCO, J.C. Passifloráceas - **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, p.132, 1980.

SCHALLREUTER K.U. *et al.* Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 395-404, 2007.

SCHALLREUTER KU. Advances in Melanocyte Basic Science Research. **Dermatology Clinical**, v. 25, p. 283–291, 2007.

SCHOONMAN, A. *et al.* The microstructure of foamed maltodextrin/sodium caseinate powders: a comparative study by microscopy and physical techniques. **Food Research International**, v. 34, p. 913, 2001.

SHARAPIN N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**; CAB and CYTED: Bogotá, Colombia, 2000.

SHARMA, V.; SARKAR I.N. Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. **Brieingsf Bioinformatics**, v. 14(2), p. 238-50, 2013.

SILVA, J. K. *et al.* Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, p. 882-890, 2013.

SILVA, K.L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. **Revista Química Nova**, v. 25, p. 449-454, 2002.

SILVA, R.M.F. *et al.* Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

SIMON, J.D., PELES, D., WAKAMATSU, K., ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 22, p. 563–579, 2009.

SINGLETON, V. L. Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H.P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 121-127, 2014.

SOARES SOBRINHO, J.L. *et al.* Caracterização Físico-Química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.5, p. 803-807, 2010.

STANFORTH, J. Análise do tamanho de partículas. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ª ed. Artmed: Porto Alegre, cap. 10, p. 162, 2005.

TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C-glycosylflavonoid research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 859-896, 2012.

TEIXEIRA, E. S. *et al.* Effects of *Passiflora nitida* Kunth leaf extract on digestive enzymes and high caloric diet in rats. **Journal of Natural of Medicines**, Set. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11418-013-0800-1>>. Acesso em 22/02/2014.

TOLEDO, A.C.O *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 30th ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2008.

VARGAS, A.J. *et al.* *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 112-9, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(2): 308-313, 2008.

VILLAREAL, M.O. *et al.* Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 450–457, 2010.

WOOD, J.H. Reologia Farmacêutica. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, ch. 6, p. 221- 255, 2001.

YAMAGUCHI, Y, HEARING V.J. Phisiological factors that regulate skin pigmentation. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 193-199, 2009.

YAO, H. *et al.* Screening and quantitative analysis of antioxidant in the fruits of *Livistona chinensis* R. Br using HPLC_DAD_ESI/MS coupled with pre-column DPPH assay. **Food Chemistry**, 2012; 135: 2802-2807.

YAO, Y. *et al.* Mushroom tyrosinase inhibitors from mung bean (*Vigna radiatae* L.) extracts. **International Journal Food Science Nutrition**, 2011; 63: 358-361.

YILMAZ, B.S. *et al.* Enzyme inhibitors and antioxidant activities of *Viburnum tinus* L. relevant to its neuroprotective potential. **Food Chemistry**, v. 141, p. 582-588, 2013.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ª ed. Artmed: Porto Alegre, cap. 1, p. 22, 2005.

WU, L. C. *et al.* Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonc extract of *Osmanthus fragrans*: A potential natural and functional food flavor additive. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1513–1519, 2009.

ZHANG,D.Y. *et al.* Variation of active constituents and antioxidant activity in pyrola [P. incarnata Fisch.] from different sites in Northeast China. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2213–2219, 2013.

ZHONG, J.; HUA, N.; XIONG, X.; LEI, Q.; LI, L. A novel promising therapy for skin aging: Dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF-b/Smad and p38 MAPK signaling pathway. **Medical Hypotheses**, v. 76, p. 343–346, 2011.

ZIAULLAH, B.KS. *et al.* Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant capacity and tyrosinase inhibitors activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 684- 692, 2013

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Flavonóides. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011.

ZUCOLOTTO, S. M. *et al.* Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 232-239, 2012.

ZUCOLOTTO, S. M. *et al.* Biossay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from Passiflora edulis. **Planta Medica**, v. 75, p. 1221-1226, 2009.

APÊNDICES

A – Equipe científica executora

NOME	FORMAÇÃO	FUNCAO
Ádley Antonini Neves de Lima	Doutor	Orientador
Emerson Silva Lima	Doutor	Co-orientador
Priscilla Tobias Ribeiro	Mestranda	Aluna
Janayna Libório	Mestranda	Colaboradora
Bárbara Salgado	Mestranda	Colaboradora
Valérya Nóbrega	Graduanda	Colaboradora

B Produção Científica

RIBEIRO, P. T. ; LIBÓRIO, J.F.A. ; VALENTIM, C. Q. ; CASTRO, S. R. ; PACHECO, C. C. ; SOUZA, R. O. S.; LIMA, E. S. ; LIMA, A. A. N. . AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DROGA VEGETAL E ESTUDOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO DE EXTRATOS SECOS DE PASSIFLORA NITIDA KUNTH.. In: III Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2013, Recife.

LIBÓRIO, J.F.A. ; CARDOSO, W.O. ; **RIBEIRO, P. T.** ; CAMPOS, A.F. ; LIMA, E. S. ; LIMA, A. A. N. . EVALUATION OF PARTICLE SIZE, POROSITY AND SURFACE AREA BET OF DRY EXTRACT BY SPRAY DRYER Passiflora nitida KUNTH. In: I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e I Seminário Ibero-americano de P&D de medicamentos, 2013, Teresina.

LIBÓRIO, J.F.A. ; NOBREGA, V. S. C. ; **RIBEIRO, P. T.** ; CAMPOS, A.F. ; LIMA, A. A. N. . ESTUDO GRANULOMÉTRICO E AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL E POROSIDADE BET DE EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE Passiflora nitida Kunth. In: IV Simpósio de plantas medicinais do Vale do São Francisco, 2013, Juazeiro Bahia.

RIBEIRO, P. T. ; LIBÓRIO, J.F.A. ; VALENTIM, C. Q. ; LIMA, E. S. ; LIMA, A. A. N. . Characterization of Raw vegetable Passiflora nítida Kunth. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, 2013, Natal.

Artigo I- Em processo de formatação para a revista Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM

Physicochemical properties, tyrosinase-inhibiting activities and antioxidant potential of the spray-dried extract from *Passiflora nitida* Kunth

*Priscilla T. Ribeiro^a, Janayna F. de A. Libório^a, Carolina Q. Valentim^a, Rodrigo Otávio S. de Souza^a, Francisco Celio M. Chaves^b, Adriana F. Campos^c, Adriano Antunes de S. Araujo^d, Cláudia C. Silva^e, Emerson S. Lima^a, Ádley Antonini N. de Lima^{*f}.*

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, R. Alexandre Amorim, 330, Aparecida, 69010-300 Manaus-AM, Brazil.

^b Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Rodovia Am-010, Km 29, s/n, 69010-970 Manaus-AM, Brazil.

^c Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Av. Profº Luiz Freire, 01, Cidade Universitária, 50740-540 Recife PE, Brazil.

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, 49100-000 São Cristóvão-SE, Brazil.

^e Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Av. Darcy Vargas, 1200, 69065-020 Manaus-AM, Brazil.

^f Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-570 Natal – RN, Brazil.

* adleyantonini@yahoo.com.br

Artigo II – Em elaboração

Desenvolvimento, estudo de estabilidade e perfil reológico de formulações semissólidas contendo *Passiflora nitida* KUNTH.

Priscilla Tobias Ribeiro¹, Bárbara Batista Salgado¹, , Valérya Nobrega¹, Raquel Medeiros¹, Tatiane Pereira de Souza¹, Emerson Silva Lima¹, Ádley Antonini Neves de Lima²

¹ Federal University of Amazonas (UFAM) – Pharmaceutical Sciences Faculty, Street Alexandre Amorim, n°. 330, Aparecida – Manaus - AM, Brazil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-570 Natal – RN, Brazil.

*Author correspondence: adleyantonini@yahoo.com.br