



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LUCÉLIA DE SOUSA BRITO**

---

---

**Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging**

---

---

**Goiânia  
2018**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Lucélia de Sousa Brito

Titulo do trabalho: Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging.

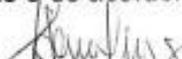
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 23 / 01 / 2019

---

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup> Caso de embargo:

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Lucélia de Sousa Brito

Título do trabalho: Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging.

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

Data: 26/07/2022

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**LUCÉLIA DE SOUSA BRITO**

---

**Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging.**

---

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

Orientador (a): Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

**Goiânia  
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Brito, Lucélia de Sousa

Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de Capsicum chinense Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging. [manuscrito] / Lucélia de Sousa Brito. - 2018.

xxv, 180 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Carotenoides. 2. Pimenta biquinho. 3. Antioxidante. 4. CLAE. 5. Antienvhecimento. I. Conceição, Edemilson Cardoso da, orient. II. Título.

CDU 615.1



**ATA DE SEÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Lucélia de Sousa Brito.** Na data de 13 de dezembro de 2018, às 08:30 horas, na sala 01 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (FF/UFG), Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges (PUC/GO), Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva (Uni-Anhanguera) e Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG) como suplente. Sob a Presidência do Orientador, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: "Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de Capsicum chinense Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging", de autoria de Lucélia de Sousa Brito, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG, no nível de Mestrado. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca, Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (FF/UFG), que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à pós-graduanda que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Mestranda, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação do trabalho. A **Dissertação** foi considerada APROVADA pela Banca Examinadora, completando integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela Resolução nº 1477/2017, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG. Para fins de publicação eletrônica, a pós-graduanda poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PPGCF, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1477/2017. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12 horas e 07 minutos, a presidência da banca encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, **Fernanda Maura Ferreira Bellato**, Secretária do PPGCF/UFG, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

**Parecer Detalhado da Banca Examinadora**

Membro	Aprovado /Reprovado	Assinatura
Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (FF/UFG)	APROVADA	<i>Edemilson Cardoso da Conceição</i>
Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges (PUC/GO)	APROVADA	<i>Leonardo Luiz Borges</i>
Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva (Uni-Anhanguera)	APROVADA	<i>Luís Antônio D. Silva</i>
Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG) - Suplente	APROVADA	<i>José Realino de Paula</i>
<b>Parecer Final</b>	<b>Aprovado/ Reprovado</b>	<b>APROVADO</b>

*Lucélia de Sousa Brito*  
Nome/Assinatura da Pós-Graduanda



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

**Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marize Campos Valadares

**Goiânia-GO  
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BANCA EXAMINADORA**

**Aluno(a): Lucélia de Sousa Brito**

**Orientador(a): Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição**

**Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição**  
Universidade Federal de Goiás, UFG.

**Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges**  
Pontifícia Universidade Católica de Goiás, PUC.

**Prof. Dr. Luis Antônio Dantas Silva**  
Uni-Anhanguera Centro Universitário de Goiás.

**Prof. Dr. José Realino de Paula**  
Universidade Federal de Goiás, UFG.

**Data:13/12/2018**

***Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, o grande autor de minha existência, por guiar-me com tanto amor e zelo, por ser refúgio e fortaleza, socorro bem presente na angústia; ao meu amado esposo que com tanto amor e paciência não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida; ao meu pai e sobrinho Guilherme pelo carinho e apoio nos momentos de dificuldade; à minha mãe “In Memoriam”, pois sem ela muitos dos meus sonhos não teriam se realizado.***

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente agradeço a Deus, meu senhor e mestre, que com tanta diligência conduziu-me para que eu pudesse chegar ao final desta grande trajetória.

Ao grande amor da minha vida e esposo, Fernando, por apoiar-me incondicional em todos os momentos, principalmente nos de dúvida e incerteza, que são frequentes para aqueles que decidem percorrer novos caminhos. Sem você amor, nenhuma conquista na minha vida valeria a pena.

Aos meus pais Alberto e Sebastiana (in memorian), pela sólida formação intelectual a mim proporcionada desde a minha mais tenra juventude, que culminou com a chegada a este mestrado. Aos senhores, minha eterna gratidão e amor.

Ao meu mestre e orientador, Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição, a minha infinda gratidão pela oportunidade de realizar este extraordinário trabalho ao lado de alguém sempre inspirado, motivado, com tamanha sabedoria e inteligência; a ti estimado mentor, meu respeito e admiração pelo seu dom no ensino da Ciência e por sua capacidade de agregar pessoas desejosas em crescer intelectualmente e profissionalmente. Sou grata por sua paciência, conselhos e instruções ao longo de nossa caminhada juntos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, representada por seus professores e funcionários, que contribuíram para minha formação acadêmica com um ensino gratuito e de excelência.

Aos membros que compuseram a banca examinadora da minha defesa Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges, Prof. Dr. Luis Antônio Dantas Silva, Prof. Dr. José Realino de Paula, agradeço por vossas contribuições.

À Mythali Lima Garcia, minha querida colega de trabalho, por ter me indicado ao meu orientador e estimulado minha entrada neste mestrado.

Aos grandes amigos que fiz no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Bioprodutos (PD&I Bioprodutos) e Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) pelo auxílio, incentivo, companheirismo e pelo interesse em ensinar. A

minha gratidão, em especial, a Andressa Tuanne, Aline Neves, Livia Pereira, Mariana Cristina, Nathalia Olívia e Matheus Gabriel que me orientaram, auxiliaram e instruíram na execução dos experimentos, na interpretação dos resultados, e que acima de tudo me trataram com amor, carinho e respeito.

À empresa Alta Cosmética, representada por seu diretor de expansão William Miranda, pela oportunidade que me foi concedida em aprimorar meus conhecimentos científicos, pela paciência, tolerância e por acreditar em meu potencial.

Ao SENAI pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para que este precioso trabalho fosse concretizado, meus cordiais agradecimentos!!!

---



---

1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Aumento da expectativa de vida e o envelhecimento .....	31
1.2 A pele.....	31
1.2.1 O envelhecimento da pele .....	33
1.3 O envelhecimento cutâneo causado pela ação dos radicais livres (RL) .....	35
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	37
1.3.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN) .....	38
1.3.3 Espécies reativas do enxofre (ERE) .....	38
1.3.4 Estresse oxidativo.....	39
1.4 Antioxidantes e defesa antioxidante .....	41
1.4.1 Antioxidantes não enzimáticos de origem natural.....	43
1.4.2 Os Carotenoides: Carotenos e Xantofilas.....	44
1.4.2.1 A Capsantina .....	45
1.5 Pimentas <i>Capsicum spp.</i> : Espécie <i>Capsicum chinense</i> Jacq., variedade Biquinho.....	48
1.6 Produtos cosméticos desenvolvidos a partir de matérias-primas de origem natural....	52
1.7 Justificativa .....	56
2 OBJETIVOS.....	59
2.1 Objetivo Geral .....	59
2.2 Objetivos Específicos .....	59
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	60
3.1 Material vegetal .....	61
3.2 Caracterização e Controle de Qualidade do pó da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	61
3.2.1 Análise microscópica do pó .....	61
3.2.2 Determinação do Teor de Voláteis .....	61
3.2.3 Determinação do teor de cinzas totais.....	62

---

3.2.4	Determinação da granulometria do pó .....	62
3.2.5	Determinação do índice de intumescência.....	63
3.3	Obtenção do extrato líquido a partir do pó da pimenta <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	63
3.4	Caracterização físico-química do extrato líquido concentrado obtido a partir do pó da <i>Capsicum chinense</i> Jacq. ....	64
3.4.1	Determinação do teor de sólidos.....	64
3.4.2	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	64
3.4.3	Determinação da densidade relativa.....	64
3.4.4	Determinação da viscosidade.....	65
3.5	Doseamento de fenóis, flavonoides e carotenoides no pó e no extrato líquido concentrado da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	65
3.5.1	Doseamento de fenóis totais.....	65
3.5.1.1	Preparo da curva analítica.....	65
3.5.1.2	Extração de fenóis da matéria-prima vegetal.....	65
3.5.1.3	Teor de fenóis totais da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado..	66
3.5.2	Doseamento de flavonoides totais.....	66
3.5.2.1	Preparo da curva analítica.....	66
3.5.2.2	Extração de flavonoides totais da matéria-prima vegetal.....	67
3.5.2.3	Teor de flavonoides totais da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado.....	67
3.5.3	Doseamento de Carotenoides totais.....	68
3.6	Validação do método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para a quantificação do marcador capsantina no extrato líquido concentrado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	69
3.6.1	Adequabilidade do sistema cromatográfico (System suitability).....	69
3.6.2	Validação do método analítico.....	70
3.6.2.1	Seletividade.....	70
3.6.2.2	Linearidade.....	70
3.6.2.3	Precisão.....	71
3.6.2.4	Exatidão.....	71
3.6.2.5	Robustez.....	72

3.6.2.6 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	72
3.7 Quantificação da capsantina no extrato líquido concentrado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	72
3.8 Identificação da capsantina no pó da <i>Capsicum chinense</i> Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) .....	73
3.9 Elaboração das formulações fitocosméticas.....	73
3.9.1 Delineamento de formulações.....	73
3.9.2 Preparação das formulações.....	74
3.9.3 Teste de centrifugação.....	76
3.10 Estudo de estabilidade acelerada do extrato líquido padronizado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. e das formulações cosméticas.....	77
3.10.1 Determinação das características físico-químicas e organolépticas.....	77
3.10.2 Ciclos de Congelamento e Descongelação.....	78
3.10.3 Estudo de estabilidade acelerada.....	78
3.10.4 Critérios utilizados para aprovação das amostras submetidas ao estudo de estabilidade.....	78
3.11 Análise cromatográfica da capsantina no fitocosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	79
3.12 Determinação da atividade antioxidante total <i>in vitro</i> da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético obtidos a partir da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	79
3.12.1 Obtenção das soluções extrativas a partir da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho.....	79
3.12.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH..	80
3.12.3 Determinação da atividade antioxidante total no Sistema $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico.....	81
3.12.4 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS <sup>•+</sup> .....	82
3.13 Avaliação subjetiva da eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica.....	83
3.13.1 Seleção de voluntários.....	83
3.13.2 Critérios de inclusão de voluntários.....	83
3.13.3 Critérios de não inclusão / exclusão de voluntários.....	84

3.13.4	Produtos avaliados.....	85
3.13.5	Aplicação do produto.....	85
3.13.6	Avaliações.....	86
3.13.6.1	Avaliação da Eficácia Clínica Subjetiva Anti-aging.....	86
3.13.6.2	Avaliação da Apreciabilidade Cosmética.....	86
3.14	Análise Estatística.....	87
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.1	Aquisição e preraro da matéria-prima vegetal.....	88
4.2	Caracterização e Controle de Qualidade do pó da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	89
4.2.1	Análise microscópica da matéria-prima vegetal pulverizada.....	89
4.2.2	Determinação da perda por dessecação.....	89
4.2.3	Determinação do teor de cinzas totais.....	90
4.2.4	Determinação da granulometria do pó.....	91
4.2.5	Determinação do índice de intumescência.....	92
4.3	Obtenção do extrato líquido a partir do pó da pimenta <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	92
4.4	Caracterização físico-química do extrato líquido concentrado obtido a partir do pó da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	94
4.5	Doseamento de fenóis, flavonoides e carotenoides totais no pó e no extrato líquido concentrado da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	95
4.5.1	Doseamento de fenóis totais.....	95
4.5.2	Doseamento de flavonoides totais.....	98
4.5.3	Doseamento de carotenoides totais.....	100
4.6	Validação de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para a quantificação do marcador capsantina no extrato líquido concentrado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	103
4.6.1	Adequabilidade do sistema cromatográfico (System suitability).....	103
4.6.2	Validação do método analítico proposto.....	104
4.6.2.1	Seletividade.....	104
4.6.2.2	Linearidade.....	106
4.6.2.3	Precisão.....	108

4.6.2.4 Exatidão.....	109
4.6.2.5 Robustez.....	110
4.6.2.6 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	111
4.7 Quantificação da capsantina no extrato líquido concentrado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	112
4.8 Identificação de capsantina no pó da <i>Capsicum chinense</i> Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	112
4.9 Elaboração das formulações fitocosméticas.....	114
4.9.1 Delineamento de formulações.....	114
4.9.2 Preparação das formulações.....	116
4.9.3 Teste de centrifugação.....	120
4.10 Estudo de estabilidade acelerada do extrato líquido padronizado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. e das formulações cosméticas.....	121
4.10.1 Estudo de estabilidade do extrato líquido padronizado em capsantina.....	121
4.10.2 Estudo de estabilidade das formulações cosméticas.....	125
4.10.2.1 Determinação das características físico-químicas e organolépticas das formulações cosméticas.....	125
4.10.2.2 Ciclos de Congelamento e Descongelamento.....	126
4.10.2.3 Estudo de estabilidade acelerada.....	128
4.11 Análise cromatográfica da capsantina no fitocosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	131
4.12 Determinação da atividade antioxidante total <i>in vitro</i> da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético obtidos a partir da <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	133
4.12.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH .....	134
4.12.2 Determinação da atividade antioxidante total no Sistema $\beta$ -caroteno / ácido linoléico.....	139
4.12.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS <sup>•+</sup> .....	144
4.13 Avaliação subjetiva da eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica.....	149
4.13.1 Eficácia clínica subjetiva antirrugas e aceitabilidade dermatológica.....	149

4.13.2 Avaliação da Apreciabilidade Cosmética.....	153
5 CONCLUSÕES.....	155
5.1 PERSPECTIVAS.....	157
6 REFERÊNCIAS.....	158
7 ANEXOS E APÊNDICES.....	175

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: A estrutura da pele .....	32
Figura 2: Estrutura da pele: (A) Jovem (B) Envelhecida .....	34
Figura 3: Estrutura de uma espécie reativa .....	36
Figura 4: Produção de espécies reativas do oxigênio nas mitocôndrias .....	40
Figura 5: Classificação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos .....	42
Figura 6: Estrutura química da capsantina .....	45
Figura 7: Via biossintética da capsantina.....	46
Figura 8: Variedades de pimentas da espécie <i>Capsicum chinense</i> Jacq. ....	49
Figura 9: Frutos da pimenta biquinho .....	51
Figura 10: Fluxograma das etapas de trabalho .....	60
Figura 11: (A) Frutos da pimenta <i>C. chinense</i> Jacq. desidratados; (B) Frutos desidratados pulverizados.....	88
Figura 12: Fotomicrografia do pó do fruto seco da pimenta <i>C. chinense</i> Jacq. evidenciadas pelo reagente de Steinmetz .....	89
Figura 13: Distribuição granulométrica das partículas do pó obtido a partir da <i>Capsicum chinense</i> Jacq. ....	91
Figura 14: Extrato líquido concentrado de <i>C. chinense</i> Jacq.....	94
Figura 15: Curva padrão de ácido tânico para determinação do teor de fenóis totais na matéria-prima vegetal de <i>C. chinense</i> Jacq.....	95
Figura 16: Curva padrão de ácido tânico para determinação do teor de compostos fenólicos totais no extrato líquido concentrado de <i>C. chinense</i> Jacq.....	95
Figura 17: Curva analítica de rutina para determinação do teor de flavonoides totais na matéria-prima vegetal de <i>C. chinense</i> Jacq. ....	98
Figura 18: Curva analítica de rutina para determinação do teor de flavonoides totais no extrato líquido concentrado de <i>C. chinense</i> Jacq. ....	98
Figura 19: Cromatogramas HPLC-PDA do padrão (A) Capsantina; (B) No extrato líquido de <i>C. chinense</i> Jacq. Pimenta biquinho; (C) Sobreposição de A e B.....	105
Figura 20: Espectros de absorção na região UV-visível da capsantina: (A) No padrão; (B) No extrato líquido da <i>C. chinense</i> Jacq. (Pimenta biquinho).....	106

Figura 21: Curva analítica média do padrão capsantina.....	107
Figura 22: Curva analítica média do extrato líquido de <i>C. chinense</i> Jacq.....	108
Figura 23: Cromatogramas HPLC-PDA do padrão (A) Capsantina; (B) No pó de <i>C. chinense</i> Jacq. Pimenta biquinho; (C) Sobreposição de A e B.....	113
Figura 24: Sete protótipos (testes piloto) do cosmético desenvolvidos a partir do extrato líquido padronizado da <i>C. chinense</i> Jacq., pimenta biquinho.....	115
Figura 25: Protótipo P6 a amostra considerada mais estável entre os sete protótipos desenvolvidos.....	116
Figura 26: Protótipos das formulações cosméticas: (A) Sérum gel pimenta biquinho; (B) Cosmético controle.....	119
Figura 27: Teste de centrifugação em triplicata do produto cosmético Sérum gel pimenta biquinho.....	120
Figura 28: Teste de centrifugação em triplicata do produto cosmético Controle.....	121
Figura 29: Amostras de extrato líquido padronizado de <i>C. chinense</i> jacq.....	125
Figura 30: Amostras do Sérum gel pimenta biquinho.....	128
Figura 31: Amostras do cosmético Controle.....	129
Figura 32: Cromatogramas HPLC-PDA (A) Padrão de Capsantina; (B) Da Capsantina no Sérum gel pimenta biquinho a 400 mg/mL; (C) Sobreposição de A e B.....	132
Figura 33: Estrutura molecular do DPPH• e reação de redução na presença de um antioxidante.....	135
Figura 34: Curva analítica da matéria-prima obtida a partir da <i>C. chinense</i> Jacq.....	136
Figura 35: Curva analítica do extrato líquido padronizado de <i>C. chinense</i> Jacq.....	136
Figura 36: Curva analítica do fitocosmético sérum gel de <i>C. chinense</i> Jacq.....	136
Figura 37: Despigmentação da solução de $\beta$ -Caroteno proporcionada pelos radicais livres formados a partir da oxidação do ácido linoléico.....	139
Figura 38: Cinética de inibição da oxidação no sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico da matéria-prima vegetal obtida a partir da <i>C. chinense</i> Jacq. e do controle padrão trolox.....	140
Figura 39: Cinética de inibição da oxidação no sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do extrato líquido padronizado obtido a partir da <i>C. chinense</i> Jacq. e do controle padrão trolox.....	141
Figura 40: Cinética de inibição da oxidação no sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do fitocosmético sérum gel obtido a partir da <i>C. chinense</i> Jacq. e do controle padrão trolox.....	141

Figura 41: Redução do ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação a partir do persulfato de potássio.....	144
Figura 42: Curva analítica: (A) Padrão trolox; (B) Matéria-prima vegetal obtida a partir da <i>C. chinense</i> Jacq.....	145
Figura 43: Curva analítica: (A) Padrão trolox; (B) Extrato líquido padronizado obtido a partir da <i>C. chinense</i> .....	146
Figura 44: Curva analítica: (A) Padrão trolox; (B) Fitocosmético Sérum gel obtido a partir da <i>C. chinense</i> Jacq.....	146
Figura 45: Resultados de eficácia clínica subjetiva antirrugas em D30 para o Sérum gel pimenta biquinho e para o cosmético Controle – melhora.....	150
Figura 46: Respostas dos participantes ao questionário de apreciabilidade cosmética aplicado após 30 ± 2 dias de uso do Sérum gel pimenta biquinho e do cosmético controle.....	153

Tabela 1: Espécies reativas do oxigênio.....	37
Tabela 2: Espécies reativas do nitrogênio.....	38
Tabela 3: Espécies reativas do enxofre.....	38
Tabela 4: Composição química das formulações cosméticas Sérum gel pimenta Biquinho e Controle.....	75
Tabela 5: Caracterização físico-química do extrato de <i>C. chinense</i> Jacq.....	94
Tabela 6: Conteúdo de fenóis totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado.....	96
Tabela 7: Conteúdo de flavonoides totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado.....	99
Tabela 8: Conteúdo de carotenoides totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado.....	100
Tabela 9: Resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema (system suitability) para o marcador químico capsantina.....	104
Tabela 10: Repetibilidade do método analítico para quantificação de capsantina.....	108
Tabela 11: Precisão intermediária do método analítico para quantificação de capsantina.....	109
Tabela 12: Determinação da exatidão do método analítico pelo teste de recuperação do padrão realizado no extrato líquido de <i>C. chinense</i> Jacq.....	110
Tabela 13: Robustez do método analítico para quantificação de capsantina no extrato líquido de <i>C. Chinense</i> Jacq. ....	111
Tabela 14: Parâmetros e especificações do extrato líquido padronizado de <i>C. chinense</i> Jacq. submetido a estudo de estabilidade.....	122
Tabela 15: Valores de pH para o extrato líquido padronizado de <i>C. chinense</i> Jacq. avaliado ao longo de 90 dias .....	123
Tabela 16: Valores de densidade para o extrato líquido padronizado de <i>C. chinense</i> Jacq. avaliado ao longo de 90 dias .....	123
Tabela 17: Valores de pH e densidade para o extrato líquido padronizado de <i>C. chinense</i> Jacq. avaliado ao longo de 12 dias durante o ciclo congelamento/descongelamento.....	124
Tabela 18: Determinação dos parâmetros organolépticos e físico-químicos das fórmulas cosméticas Sérum gel pimenta biquinho e Controle.....	126

Tabela 19: Resultados obtidos para a avaliação do pH e da densidade ciclo congela/descongela para os cosméticos Sérum gel pimenta biquinho e Controle .....	127
Tabela 20: Resultados obtidos para a avaliação do pH e da densidade durante os testes de estabilidade acelerada para o cosmético Sérum gel pimenta biquinho.....	129
Tabela 21: Resultados obtidos para a avaliação do pH e da densidade durante os testes de estabilidade acelerada para o cosmético Controle.....	130
Tabela 22: Atividade antioxidante pelo método DPPH obtidos para matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e fitocosmético Sérum gel de <i>C. chinense</i> Jacq.....	137
Tabela 23: Atividade antioxidante no sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para a matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e fitocosmético sérum gel da <i>C. chinense</i> Jacq.....	140
Tabela 24: Atividade antioxidante equivalente ao trolox da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético sérum gel obtidos a partir da <i>C. chinense</i> Jacq.....	145

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BHA</b>	Hidroxianisol de butila
<b>BHT</b>	Hidroxitolueno de butila
<b>CAP</b>	Capsantina
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CCS</b>	Capsantina-capsorubina sintase
<b>CLAE</b>	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
<b>CMD</b>	Concentração média determinada
<b>CV</b>	Coeficiente de variação
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>ERE</b>	Espécies reativas do enxofre
<b>ERN</b>	Espécies reativas do nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies reativas do oxigênio
<b>GGPP</b>	Geranilgeranil pirofosfato
<b>GPx</b>	Glutathiona peroxidase
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória mínima
<b>INCI</b>	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos
<b>k</b>	Fator de retenção

<b>LCYB</b>	licopeno $\beta$ -ciclase
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>N</b>	Número de pratos teóricos
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
<b>NADPH</b>	Fosfato de di-hidronicotinamida-adenina dinucleido
<b>NMF</b>	Fator de Hidratação Natural
<b>P6</b>	Protótipo seis
<b>PSY</b>	Fitoeno sintase
<b>RDC</b>	Resolução da diretoria colegiada
<b>RL</b>	Radicais livres
<b>Rs</b>	Resolução
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TF</b>	Fator de alargamento
<b>tr</b>	Tempo de retenção
<b>US-FDA</b>	United States Food and Drug Administration
<b>WHO</b>	Organização Mundial da Saúde

---

---

**Extrato líquido padronizado em capsantina a partir de *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade Biquinho) e suas aplicações no desenvolvimento de um produto cosmético anti-aging.**

**Brito, L.S.<sup>1</sup>; Conceição, E.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Bioprodutos (PD&I), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

**Introdução:** A pimenta *Capsicum chinense* Jacq., popularmente conhecida como “pimenta biquinho”, tem se destacado no Brasil por apresentar baixa pungência e um forte aroma. Seus frutos são compostos por diversos metabólitos secundários, destacando-se os carotenoides, com importantes propriedades antioxidantes. **Objetivo:** Desenvolver um produto cosmético a partir do extrato líquido de *Capsicum chinense* Jacq. padronizado em capsantina, avaliar sua eficácia anti-aging *in vivo* e atividade antioxidante. **Metodologia:** Os frutos da “pimenta biquinho” foram higienizados, pesados, desidratados, triturados em moinho de facas e martelos e acondicionado à temperatura ambiente. Realizou-se a caracterização físico-química da matéria-prima vegetal pulverizada a partir dos métodos de análise microscópica do pó, determinação do teor de voláteis, cinzas totais, distribuição granulométrica e índice de intumescência. Posteriormente a matéria-prima caracterizada foi aplicada na preparação do extrato líquido, empregando as técnicas de maceração, percolação e concentração por ventilação forçada, utilizando o álcool etílico 96° GL como solvente extrator. O extrato líquido foi então caracterizado quanto ao teor de sólidos, pH, densidade e viscosidade. A posteriori, realizou-se tanto na matéria-prima vegetal quanto no extrato líquido concentrado, o doseamento de fenóis totais pela técnica de complexação dos compostos fenólicos com solução de cloreto férrico, e também, o doseamento de flavonoides e carotenoides totais por métodos espectrofotométricos. Complementarmente, um método analítico por CLAE foi validado para a quantificação da capsantina no extrato líquido concentrado. Duas formulações cosméticas foram elaboradas para a realização de testes comparativos de eficácia, sendo um fitocosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado em capsantina, e outra formulação placebo composto apenas pela base galênica do produto, sem a adição do extrato. Seguidamente as formulações cosméticas foram avaliadas em relação à suas estabilidades aceleradas e eficácias clínicas anti-aging *in vivo*, avaliadas em humanos. A atividade antioxidante foi determinada para a matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado em capsantina e para a formulação cosmética, utilizando os ensaios de captura do radical DPPH, sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e captura do radical ABTS. **Resultados e discussões:** Para a caracterização físico-química da matéria-prima vegetal pulverizada, a análise microscópica do pó demonstrou a natureza íntima da amostra assim como seu grau de pureza, apresentou teor de voláteis de 4,62 % (m/m), teor de cinzas totais de 6,341 %, a determinação da distribuição granulométrica classificou a amostra como pó grosso e o índice de intumescência foi de 1,27 ml  $\pm$  0,12 utilizando álcool 96° GL como agente intumescente. Na caracterização físico-química do extrato líquido o teor de sólidos obtido foi de 19,16 %, apresentou pH 3,7  $\pm$  0,06, densidade 1,040

$\pm 0,0014$  g/mL e viscosidade de 3,22 mPas. Os teores de fenóis, flavonoides e carotenoides totais para as amostras da matéria prima vegetal e extrato líquido concentrado foram respectivamente: 18 mg/100g e 168 mg/100g de fenóis, 10 mg/100 g e 90,7 mg/100g de flavonoides, 9,10mg/100g e 83,70 mg/100g de carotenoides. A validação do método analítico por CLAE empregado na quantificação da capsantina demonstrou ser seletivo, linear (nas faixas compreendidas entre 0,48 a 7,2  $\mu\text{g/ml}$  para o padrão de capsantina e 26,93 a 404 mg/ml para o extrato líquido), preciso, exato, robusto. O teor de capsantina encontrado no extrato líquido da *C. chinense* Jacq. foi de 1,126% (m/m). Tanto o extrato líquido padronizado quanto as formulações cosméticas, apresentaram-se estáveis frente aos testes de estabilidade acelerada, com resultados de características organolépticas e físico-químicas dentro dos parâmetros estabelecidos para os testes. A análise da eficácia clínica anti-aging *in vivo* para as formulações cosméticas, demonstraram a potencialização da eficácia para a formulação cosmética constituída pelo extrato líquido padronizado da *Capsicum chinense* Jacq., em comparação com o cosmético placebo, mostrando melhoras nas rugas, linhas de expressão e flacidez da pele. A atividade antioxidante *in vitro* para a matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado em capsantina e formulação cosmética foram respectivamente: 194,6 $\mu\text{g/ml}$ , 73,7 $\mu\text{g/ml}$  e 100  $\mu\text{g/ml}$  para a captura do radical DPPH relativo ao IC<sub>50</sub>, 33,03%, 42,08% e 19,35% para inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno, 22,87 $\mu\text{M}$  de Trolox/g, 51,81 $\mu\text{M}$  de Trolox/g, 900  $\mu\text{M}$  de Trolox/g para a captura do radical ABTS. Os valores obtidos para as avaliações das atividades antioxidantes *in vitro*, indicaram que todas as amostras apresentaram-se eficazes mediante a ação antioxidante, ainda que os resultados tenham sido inferiores se comparado aos seus respectivos controles positivos. **Conclusões:** O produto cosmético desenvolvido apresentou atividade antioxidante e eficácia anti-aging pretendida, comprovando o potencial de uso do extrato líquido padronizado de pimenta biquinho (*Capsicum chinense* Jacq.) em formulações fitocosméticas tecnológicas e inovadoras.

**Palavras-Chave:** Carotenoides; pimenta biquinho; antioxidante; CLAE; antienvelhecimento.

**Standardized liquid extract in capsanthin from *Capsicum chinense* Jacq. (Variety biquinho) and its applications in the development of a cosmetic anti-aging product.****Brito, L.S.<sup>1</sup>; Conceição, E.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Bioprodutos (PD&I), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

**Introduction:** The pepper *Capsicum chinense* Jacq., popularly known as "biquinho pepper", has been outstanding in Brazil for presenting low pungency and a strong aroma. Its fruits are composed of several secondary metabolites, especially carotenoids, with important antioxidant properties. **Objective:** Develop a cosmetic product from the liquid extract of *Capsicum chinense* Jacq. standardized on capsanthin, evaluate its anti-aging efficacy in vivo and antioxidant activity. **Methodology:** The fruits of the "biquinho pepper" were sanitized, weighed, dehydrated, ground in a knife mill and hammers and stored at room temperature. The physico-chemical characterization of the pulverized vegetable raw material was carried out using the methods of microscopic analysis of the powder, determination of the volatile content, total ash, granulometric distribution and swelling index. Afterwards, the raw material was applied in the preparation of the liquid extract, using the techniques of maceration, percolation and concentration by forced ventilation, using the ethyl alcohol 96° GL as solvent extractor. The liquid extract was then characterized for solids content, pH, density and viscosity. Subsequently, total phenol concentration was determined by the technique of complexation of the phenolic compounds with ferric chloride solution, and also, the assay of total flavonoids and carotenoids by spectrophotometric methods. In addition, an analytical method by HPLC was validated for the quantification of the capsanthin in the concentrated liquid extract. Two cosmetics formulations were developed to perform comparative efficacy tests, a phytocosmistry developed from the liquid extract standardized on capsanthin, and another placebo formulation composed only of the galenic base of the product, without the addition of the extract. The cosmetics formulations were then evaluated for their accelerated stabilities and clinical efficacy anti-aging in vivo, evaluated in humans. The antioxidant activity was determined for the vegetable raw material, standardized liquid extract in capsanthin and the cosmetic formulation, using the DPPH radical capture,  $\beta$ -carotene / linoleic acid capture and ABTS radical capture assays. **Results and discussion:** For the physical-chemical characterization of the pulverized vegetable raw material, the microscopic analysis of the powder demonstrated the intimate nature of the sample as well as its purity, presented a volatile content of 4.62% (m / m), total ash content of 6.341%, the determination of the granulometric distribution classified the sample as coarse powder and the intumescence index was 1.27 ml  $\pm$  0.12 using alcohol 96° GL as an intumescent agent. In the physical-chemical characterization of the liquid extract the solids content was 19.16%, pH 3.7  $\pm$  0.06, density 1.040  $\pm$  0.0014 g / mL and viscosity of 3.22 mPas. The total phenolics, flavonoids and carotenoids contents for the raw material and concentrated liquid extract samples were respectively: 18 mg / 100 g and 168 mg / 100 g phenols, 10 mg / 100 g and 90.7 mg / 100 g flavonoids, 10mg / 100g and 83,70 mg / 100g of carotenoids. The validation of the analytical method by HPLC used in the quantification of

capsanthin proved to be selective, linear (in the range of 0.48 to 7.2  $\mu\text{g} / \text{ml}$  for the capsanthin standard and 26.93 to 404  $\text{mg} / \text{ml}$  for the liquid extract), accurate, exact and robust. The content of capsanthin found in the liquid extract of *C. chinense* Jacq. was 1.126% (m / m). Both the standardized liquid extract and the cosmetic formulations were stable against accelerated stability tests, with results of organoleptic and physico-chemical characteristics within the parameters established for the tests. The analysis of the clinical anti-aging efficacy in vivo for cosmetic formulations has demonstrated the potentiation of efficacy for the cosmetic formulation consisting of the standardized liquid extract of *Capsicum chinense* Jacq., Compared with the placebo cosmetic, showing improvements in wrinkles, expression lines and sagging skin. The antioxidant activity in vitro for the vegetable raw material, standardized liquid extract in capsanthin and cosmetic formulation were respectively: 194.6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ , 73.7 $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$  for capturing the DPPH radical relative to the  $\text{IC}_{50}$ , 33.03%, 42.08% and 19.35% for inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation, 22.87  $\mu\text{M}$  Trolox / g, 51.81  $\mu\text{M}$  Trolox / g, 900  $\mu\text{M}$  Trolox / g for the ABTS radical capture. The values obtained for evaluations of antioxidant activities in vitro indicated that all the samples showed to be effective by antioxidant action, although the results have been lower if compared to their respective positive controls. **Conclusions:** The cosmetic product developed showed antioxidant activity and intended anti-aging efficacy, proving of potential use of the standardized liquid extract of biquinho pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) in technological and innovative phytocosmetic formulations.

**Keywords:** Carotenoids; biquinho pepper; antioxidant; HPLC; anti aging.

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno que tem ocorrido em escala global, ao qual mesmo os países desenvolvidos estão ainda em fase de adaptação. O que era no passado privilégio de alguns poucos, passou a ser uma experiência de um número crescente de pessoas em todo o mundo (OLIVEIRA, 2013). O envelhecimento da população é um dos maiores triunfos da humanidade, entretanto tornou-se um grande desafio principalmente no que se refere à aparência do indivíduo (MIRANDA, *et al.*, 2016).

O envelhecimento é um processo biológico e natural, sendo a pele um dos principais marcadores da idade cronológica (ORTOLAN *et al.*, 2013). Certamente nenhuma das manifestações do envelhecimento seja tão perceptível quanto aquelas cuja pele está envolvida. Além dos mecanismos celulares e moleculares que estão inseridos no avanço do envelhecimento natural, fatores externos como poluição, exposição à radiação UV, álcool, tabagismo e estresse podem acelerar este processo de desgaste cutâneo, tendo por consequência o aparecimento de rugas, marcas de expressão, aspereza, falta de pigmentação e flacidez da pele. Existem evidências científicas que apontam os radicais livres como os principais causadores destas alterações na estrutura da pele (FRIES & FRASSON, 2010).

Vários indícios têm demonstrado a atuação dos radicais livres e outros agentes pró-oxidantes no processo de envelhecimento, e no acometimento de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ALMADA FILHO, 2002). Os radicais livres são estruturas moleculares ou atômicas altamente reativas e instáveis, produzidas em pequenas quantidades durante os processos metabólicos indispensáveis a sobrevivência e, portanto, são inevitáveis e impossíveis de serem eliminados do organismo (KUMAR *et al.*, 2008). Os radicais livres podem ser produzidos no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas e o seu alvo celular são as proteínas, os lipídeos, os carboidratos e o DNA que constituem as células. Assim, a reação entre estas moléculas com os radicais livres, podem resultar na formação de mais espécies reativas, propagando a cadeia de danos nos tecidos (SOUZA *et al.*, 2013).

Quando a produção dos radicais livres aumenta de forma considerável ou quando os sistemas de defesa e remoção são ineficientes, a consequência é um excesso dessas espécies reativas que levam a uma condição denominada estresse oxidativo (SOUZA *et al.*,2013). Entretanto, o organismo possui mecanismos de defesa com capacidade de proteger os tecidos contra os possíveis danos provocados pelas espécies reativas produzidas durante os processos metabólicos das células, estas defesas são chamadas de agentes antioxidantes (ALMADA FILHO, 2002). Os antioxidantes, por conseguinte, são substâncias que, mesmo em pequenas concentrações, têm a incumbência de inativar a produção dos radicais livres, diminuir seus efeitos e reparar o dano celular por eles provocados (ALMADA FILHO, 2002; FONSECA *et al.*, 2008).

Com o intuito de reforçar os mecanismos de defesa contra os radicais livres, é possível fornecer por via tópica, veiculados em formulações cosméticas, alguns destes componentes antioxidantes, ou até mesmo, matrizes complexas com características antioxidantes. Admite-se que o uso de antioxidantes por via tópica, pode neutralizar alguns dos radicais livres existentes na pele e, portanto, reduzir ou prevenir os sinais de envelhecimento no tecido cutâneo (BOGDAN & BAUMANN, 2008). Os antioxidantes utilizados na elaboração dos cosméticos devem ser absorvidos adequadamente atingindo o tecido alvo na forma ativa, e permanecer na pele por um tempo satisfatório para exercer os efeitos pretendidos (STEINER, 2008).

O desenvolvimento tecnológico proporcionou ao setor cosmético a descoberta de vários compostos bioativos antioxidantes e, conseqüentemente, o comércio de produtos antissinais, com a proposta de combater, controlar e postergar o envelhecimento da pele (BAUMANN, 2004). Muitos destes produtos possuem como princípio ativo extratos de origem vegetal, que apresentam em sua composição metabólitos secundários com atividade antioxidante, nos quais, os carotenoides merecem destaque. Os carotenoides, por sua vez, são pigmentos cuja estrutura molecular apresenta um sistema de duplas ligações conjugadas responsáveis por sua cor e, também, por sua ação antioxidante. Carotenoides formados somente por átomos de carbono e hidrogênio são denominados carotenos, enquanto que as xantofilas apresentam grupos substituintes como oxigênio, hidroxilas e os grupos ceto e epóxi (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

A capsantina é uma das xantofilas com maior potencial antioxidante se comparada com os demais carotenoides. Isto ocorre devido à sua estrutura molecular, particularmente a presença de um amplo sistema de duplas ligações conjugadas e de um

grupo ceto que reduzem significativamente a possibilidade de auto-oxidação da molécula, e conseqüentemente a sua capacidade antioxidante é aumentada (Figura 6) (PEREZ-GALVEZ e MINGUEZ-MOSQUERA, 2002). Frequentemente encontrada em pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*, a capsantina pode contribuir com até 60% do total de carotenoides presentes nos frutos (SHAH *et al.*, 2014).

Das pimentas da espécie *Capsicum chinense* Jacq., a variedade conhecida comercialmente como pimenta biquinho, tem ganhado notoriedade nos últimos anos por seu sabor e aroma peculiar, e também, pela ausência da pungência característica das demais pimentas (CARVALHO *et al.*, 2006). A pimenta biquinho, assim como todas as outras variedades de pimentas do gênero *Capsicum*, apresenta em sua constituição vitaminas A, C, E, B1 e B2, além de ser fonte de compostos antioxidantes naturais como os carotenoides, flavonoides e demais compostos fenólicos (REIFSCHNEIDER, 2000; LUTZ; FREITAS, 2008; LUNN, 2007). Estes atributos fazem da pimenta biquinho uma matéria-prima, cujo extrato padronizado, possui potencial aplicabilidade em fitocosméticos inovadores, capazes de minimizar os danos oxidativos causados pela ação dos radicais livres.

## **1.1 Aumento da expectativa de vida e o envelhecimento**

O aumento na expectativa de vida tem se tornado um fenômeno a nível mundial, mesmo nos países em desenvolvimento. Este fenômeno iniciou-se nos países desenvolvidos, mas atualmente, o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais proeminente nos países em desenvolvimento. No Brasil, o número de idosos ( $\geq 60$  anos de idade) passou de 14 milhões em 2002, para 25,4 milhões em 2012 e 30,2 milhões em 2017 (um aumento de 216 % em quinze anos) e estima-se que alcançará 57 milhões em 2042 (IBGE, 2018).

Existem vários fatores que podem influenciar diretamente no aumento da expectativa de vida de uma população, a saber, as melhorias no saneamento básico, a alimentação, a redução nos índices de violência, avanços no controle de doenças, implementação nas tecnologias de saúde e educação. Logo, a longevidade está diretamente ligada às melhorias nas condições de vida de uma população. No entanto, o prolongamento da vida, só pode ser reconhecido como uma conquista na medida em que os anos de vida adicionais são agregados à sua qualidade (LUIZ et al., 2018; OMS, 2015).

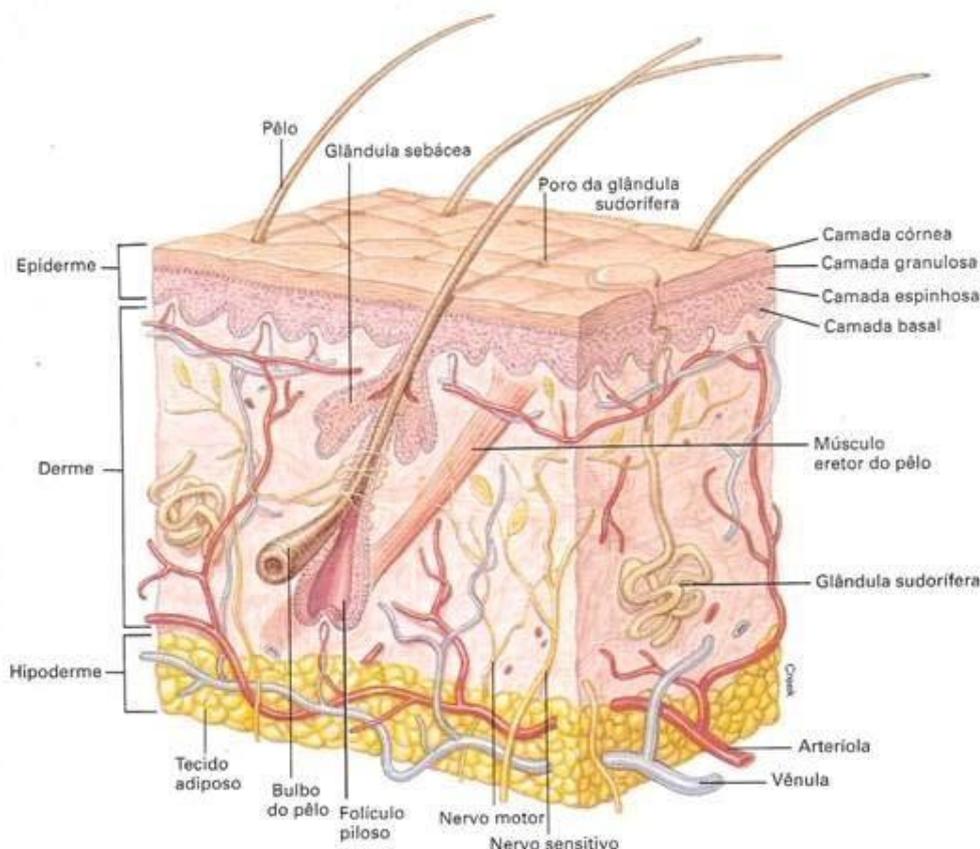
A longevidade tem por consequência o envelhecimento do indivíduo. O envelhecimento é um processo biológico natural que todo ser vivo está sujeito com o decorrer dos anos, cujas alterações propiciam transformações estruturais no organismo, modificando suas funções (AIRES, 2008). Envelhecer é um processo universal que todo ser vivo está sujeito, que não depende somente de fatores ambientais, sendo progressivo, deletério, irreversível, com caráter pessoal e diferente para cada organismo. Deste modo, todos os tecidos e órgãos do corpo são diretamente afetados pelo envelhecimento, especialmente a pele (ROMERO *et al.*, 2005).

## **1.2 A pele**

A pele ou tegumento é um órgão que reveste o corpo e segrega os componentes internos do organismo protegendo contra as agressões do meio externo, impedindo a entrada de substâncias estranhas. Sendo o maior órgão que compõe o organismo, a pele possui uma extensão correspondente a uma área de 1,5 a 2 metros quadrados, representando mais de 15% do peso corporal, demonstrando diferentes variações tornando-se ora mais rígida, ora mais flexível (SAMPAIO & RIVITTI, 2007). A pele é composta, basicamente, por duas camadas teciduais: A camada superior, denominada

epiderme; uma camada intermediária conhecida como derme ou cório (Figura 1). Posteriormente e em continuidade com a derme, localiza-se a hipoderme que serve de união para os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; GARTNER & HIATT,2007).

**Figura 1:** A estrutura da pele.



**Fonte:** VAN DE GRAAFF,2003.

A estrutura superficial da pele, intitulada epiderme, é constituída por cinco camadas epiteliais estratificadas e queratinizadas, unidas umas as outras, sendo subdivididas em estrato córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e o basal. Possui espessura que varia entre 75 a 150 microns ( $\mu\text{m}$ ), podendo atingir cerca de 400 a 600  $\mu\text{m}$  em certas regiões do corpo onde a pele é necessariamente mais espessa, como por exemplo, nas plantas dos pés e nas palmas das mãos (IRION, 2012; IOBST, SANTHANAM, WEINKAUF,2006). A epiderme é avascular e impérvia, devido à presença de compostos químicos, tais como, os lipídeos, ésteres e ceramidas, que se encontram nos espaços entre as células. A função principal da epiderme é formar uma barreira protetora contra choques, controlar a perda de água e monitorar a entrada de substâncias e microorganismos (HARRIS, 2016; GUYTON; HALL, 2011).

A derme é a segunda camada da pele situada logo abaixo da epiderme, sendo formada por tecido conjuntivo denso não modelado constituído por elastina, colágeno, nervos e fibras reticulares que tonificam, possibilitam a resistência à tensão, e viabilizam a capacidade de estiramento e encolhimento do tecido cutâneo. Ao contrário da epiderme, a derme é mais profunda, vascularizada e grossa, com espessura que pode diversificar ao longo do organismo, variando entre 0,6 mm nas pálpebras até 3 mm nas palmas das mãos e nas plantas dos pés (HARRIS, 2009; LUCO, 2014; GARTNER & HIATT, 2007). A derme subdivide-se em duas porções distintas, a primeira denominada região papilar, que consiste em uma camada menos espessa composta pelas papilas dérmicas que se projetam em direção à epiderme, proporcionando resistência às pressões e ao atrito sofrido pelo tecido. A região reticular, mais espessa, é a segunda porção da derme formada por fibras de colágeno tipo I e fibras elásticas ordenadas paralelamente à superfície, que promovem a flexibilidade cutânea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; HARRIS, 2016).

A camada mais profunda da pele, a hipoderme, é formada por tecido conjuntivo frouxo composto por fibroblastos, macrófagos e tecido adiposo com células repletas de gordura, que oferecem isolamento térmico, protegem o tecido contra colisões e armazenam energia (SAMPAIO & RIVITTI, 2007; BENSON & WATKINSON, 2012).

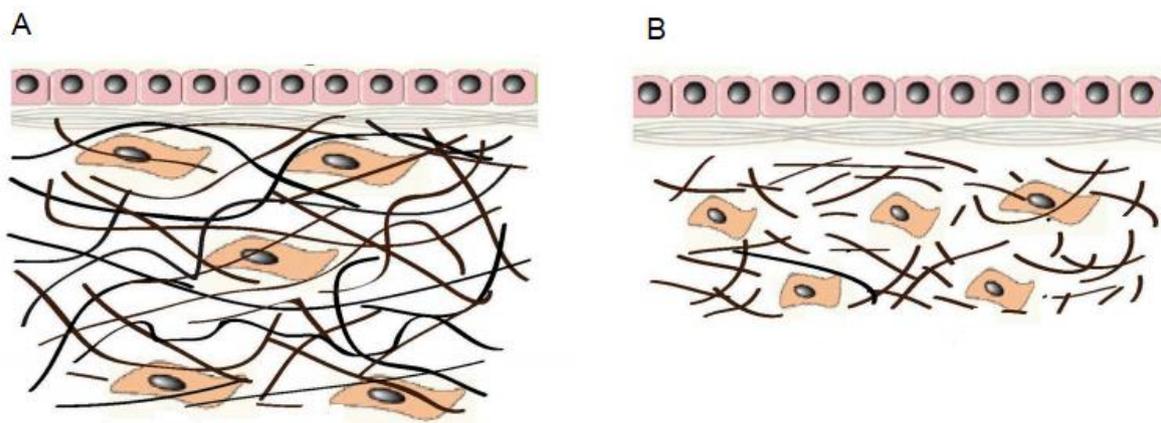
### **1.2.1 O envelhecimento da Pele**

O processo de envelhecimento da pele, ocorre mediante a uma combinação entre os efeitos do tempo com fatores genéticos e ambientais, que atuam de forma independente e simultaneamente a partir de fatores clínicos e biológicos, afetando a estrutura da pele. Trata-se de um processo biológico ininterrupto e de alta complexidade, caracterizado por alterações moleculares e celulares, com a perda gradual da capacidade de homeostase do organismo e das células (UITTO & BERNSTEIN, 1998).

No envelhecimento cutâneo, as transformações ocorrem nas três camadas que compõem a pele, a saber, a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 2). Na epiderme a camada córnea sofre estreitamento em sua grande parte tornando-se mais fina, porém, em certas regiões ocorrem hiperkeratoses, ressecamento, descamações, redução na produção da secreção sebácea, fissuras, achatamento das papilas dérmicas e diminuição das células de Langerhans. Na derme, o envelhecimento cutâneo ocorre mais especificamente na matriz extracelular, sendo esta constituída por uma rede de fibras proteicas complexas produzidas pelos fibroblastos (MORASTONI *et al.*, 2004). Estes

fibroblastos são comprometidos no decorrer do envelhecimento, contribuindo para a redução da síntese e atividade da elastina e do colágeno, que garantem a elasticidade, hidratação e resistência da pele. Estas alterações possibilitam o aparecimento de rugas, flacidez, redução da flexibilidade e firmeza cutânea, perda do brilho e aumento da fragilidade capilar. Na hipoderme, a redução do tecido adiposo contribui para o enrugamento cutâneo, aumentando os riscos de lesões e redução na manutenção da temperatura corpórea (VIEIRA *et al.*,2011).

**Figura 2:** Estrutura da pele:(A) Jovem, (B) Envelhecida.



**Fonte:** Yidong & Taihao, 2016

O processo de envelhecimento de um indivíduo é lento, progressivo e irreversível, sendo influenciado por vários fatores. Entretanto, envelhecer com qualidade depende de certos fatores, tais como estilo de vida, condições socio-econômicas e doenças crônicas (FECHINE & . TROMPIERI, 2012) O envelhecimento cutâneo se manifesta a partir dos 30 anos, porém, torna-se mais evidente após a terceira idade, e pode ser classificado basicamente como envelhecimento intrínseco ou cronológico, e envelhecimento extrínseco (SOUZA *et al.*, 2007).

Segundo RIBEIRO (2010), o envelhecimento intrínseco ou cronológico é aquele que ocorre paulatinamente com o passar do tempo, sendo determinado por fatores genéticos. Todos os indivíduos estão susceptíveis a este fenômeno natural, aparecendo nas áreas da pele protegidas ou não do sol, e se caracteriza pelo decaimento das funções vitais do organismo, redução de renovação celular, ineficiência das respostas imunológicas, ausência de manchas, *secura suave*, leve atrofiamento, perda da elasticidade e formação de rugas. E segundo BAUMANN (2004), em consequência a essas alterações ocorridas em toda estrutura celular, o corpo se torna mais vulnerável,

mudanças ocorrem na transcrição de inúmeras proteínas, enzimas moléculas de DNA, tornando-as deficientes em suas funções. As alterações que ocorrem durante o envelhecimento cronológico, estão diretamente ligadas ao tempo vivido e não causam tantos danos quanto o envelhecimento extrínseco.

O envelhecimento extrínseco não é influenciado por fatores cronológicos, mas sim por múltiplas causas ambientais (BAUMANN, 2004). Por ser mais agressivo e nocivo do que o envelhecimento intrínseco, este processo de degeneração por fatores externos pode causar inúmeros efeitos prejudiciais à saúde do indivíduo. Suas causas estão relacionadas a exposições excessivas aos raios ultravioletas, que propiciam a formação dos radicais livres provocando danos às estruturas celulares do tecido cutâneo, resultando no enrugamento e envelhecimento precoce da pele. Outros fatores extrínsecos, bem como, alimentos gordurosos, poluição, tabagismo, estresse e o álcool, podem estimular a formação de radicais livres que geram uma reação em cadeia danificando as células, e por consequência, alteram a aparência da pele precocemente (KEDE; SABATOVICH, 2004; REBELLO, 2004).

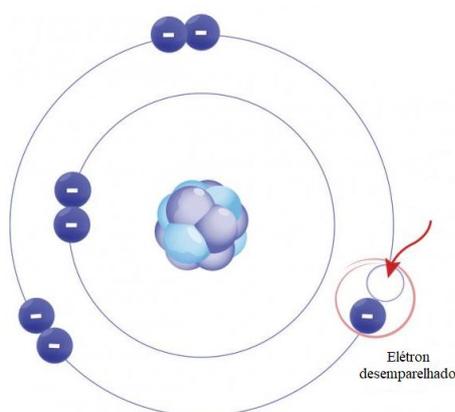
Na tentativa de esclarecer o fenômeno do envelhecimento cutâneo, diversas teorias foram propostas. Algumas destas teorias retratam o envelhecimento da pele como uma sequência de eventos coordenados, controlados geneticamente, que fazem parte do desenvolvimento dos organismos. Outra classe de teorias, trabalha com a hipótese de que o processo de envelhecimento da pele depende, sobretudo, do acúmulo de agressões externas. Entretanto, a teoria mais aceita e mais explorada é a dos radicais livres, também chamado de teoria do estresse oxidativo. A descoberta da participação dos radicais livres sobre o envelhecimento das células, motivou e estimulou as pesquisas sobre este assunto, por isso é a teoria mais reconhecida e viável (FARINATTI, 2002).

### **1.3 O envelhecimento cutâneo causado pela ação dos radicais livres**

A relação entre a ação dos radicais livres e o envelhecimento cutâneo, foi teoricamente proposta pela primeira vez em 1956 por Denham Harman. O autor sugeriu que o processo de envelhecimento é decorrente do acúmulo de lesões nos tecidos, causados pela ação dos radicais livres nos componentes das células no decorrer da vida. Esta teoria contribuiu para o conhecimento atual acerca dos radicais livres, pois inspirou várias pesquisas e ganhou notoriedade em diversas áreas do conhecimento (MOTA, 2004).

Os radicais livres, também denominados espécies reativas, são moléculas orgânicas e inorgânicas extremamente reativas, que possuem um ou mais elétrons livres desemparelhados orbitando em torno do núcleo, mais precisamente na última camada eletrônica (Figura 3). Os elétrons desemparelhados presentes nos radicais livres, são responsáveis pela alta reatividade destas moléculas ou íons, que para se tornarem estáveis, reagem quimicamente com outras moléculas, doando ou recebendo elétrons. Nos sistemas biológicos, os radicais livres são originários de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, fazendo parte de um grupo denominado espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERE) (LÜ *et al.*, 2010)

**Figura 3:** Estrutura de uma espécie reativa



**Fonte:**(<https://www.medicalnewstoday.com/articles/318652.php>)

As espécies reativas, são produzidas durante as atividades funcionais e os processos metabólicos das células, apresentando um papel significativo na sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte iônico. Todavia, a produção de grandes quantidades de espécies reativas pode ter efeitos nocivos para muitas moléculas, abrangendo as proteínas, os lipídios, o RNA e o DNA, visto que são pequenos e reativos excessivamente (CAROCHO & FERREIRA, 2012). Estas espécies reativas podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática, e todos os elementos que compõem as células estão propensas à ação dos radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010). No entanto, a membrana celular é um dos componentes mais atingidos, como consequência da degradação oxidativa dos lipídios denominada peroxidação lipídica. Esta ocorrência promove alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, provocando a perda da seletividade, interferindo na troca

iônica e na produção de elementos citotóxicos, culminando com a necrose celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres estão envolvidos em processos de degradação, tais como: a ruptura das membranas celulares levando a alterações das bombas iônicas, mutações gênicas, oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, formação de resíduos químicos como o malondialdeído (MDA) e o comprometimento de diferentes componentes da matriz extracelular. Todos estes processos contribuem para a desordem da homeostase corporal, tendo o envelhecimento do organismo como uma de suas principais consequências (SALMON *et al.*, 2010).

### 1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os radicais livres derivados do oxigênio, destacam-se como a classe mais importante das espécies reativas produzidas pelo organismo, uma vez que nos sistemas aeróbios este elemento é metabolizado durante o funcionamento normal da célula, sendo indispensável para a produção de energia (MILLER *et al.*, 1990). Durante o metabolismo celular, em condições fisiológicas aeróbias, o  $O_2$  sofre uma redução tetravalente recebendo quatro elétrons, obtendo moléculas de  $H_2O$  como produto. Ao longo deste processo, são formados intermediários radicalares (Tabela 1), tais como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ); e os não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SILVA, 2007). As mitocôndrias são as principais fontes geradoras de espécies reativas do oxigênio, visto que cerca de 1 a 5% do oxigênio consumido pelas células é convertido em radicais livres neste sítio produtor (REID e DURHAM, 2002).

**Tabela 1:** Espécies reativas do oxigênio.

Espécies reativas do oxigênio (ERO)	Nome da espécie reativa
$O_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
$HO_2^{\cdot}$	Radical hidroperoxila
$\cdot OH$	Radical hidroxila
$^1O_2$	Oxigênio singlete
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio

### 1.3.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

Ainda que as espécies reativas do oxigênio sejam consideradas a classe mais importante dos radicais livres produzidos pelo organismo, é importante enfatizar que existem radicais que contêm nitrogênio em sua estrutura (Tabela 2). As espécies reativas de nitrogênio também são geradas durante processos metabólicos e fisiológicos, e atuam em conjunto com os radicais livres derivados do oxigênio, degradando lipídios, proteínas, DNA causando danos oxidativos nas células que se acumulam durante a vida do indivíduo levando ao envelhecimento (NIKI, 2000).

**Tabela 2:** Espécies reativas do nitrogênio

<b>Espécies reativas do Nitrogênio (ERN)</b>	<b>Nome da espécie reativa</b>
$\text{NO}^{\bullet}$	Óxido nítrico
$\text{NO}_2^{\bullet}$	Dióxido de nitrogênio
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito

### 1.3.3 Espécies reativas do enxofre (ERE)

Assim como o oxigênio e o nitrogênio são capazes de gerar espécies reativas, estruturas contendo átomos de enxofre em maior estado de oxidação, também podem formar espécies moleculares reativas (ERE). As espécies reativas do enxofre, são moléculas contendo átomos de enxofre redox-ativo que são capazes, sob condições fisiológicas, de oxidar proteínas e enzimas. Estes radicais, são frequentemente formados pela oxidação dos tióis e dissulfetos ou pela reação de um tiol com íons de metais de transição (Tabela 3). As espécies reativas de enxofre incluem dissulfeto-S-óxidos, ácidos sulfênicos, e radicais tíla (GRUHLKE e SLUSARENKO, 2012).

**Tabela 3:** Espécies reativas do enxofre

<b>Espécies reativas do Enxofre (ERE)</b>	<b>Nome da espécie reativa</b>
$\text{RS(O)SR} / \text{RS(O)}_2\text{SR}$	Dissulfetos-S-óxidos
$\text{RSOH}$	Ácidos sulfênicos
$\text{RS}^{\bullet}$	Radical tíla

#### 1.3.4 Estresse oxidativo

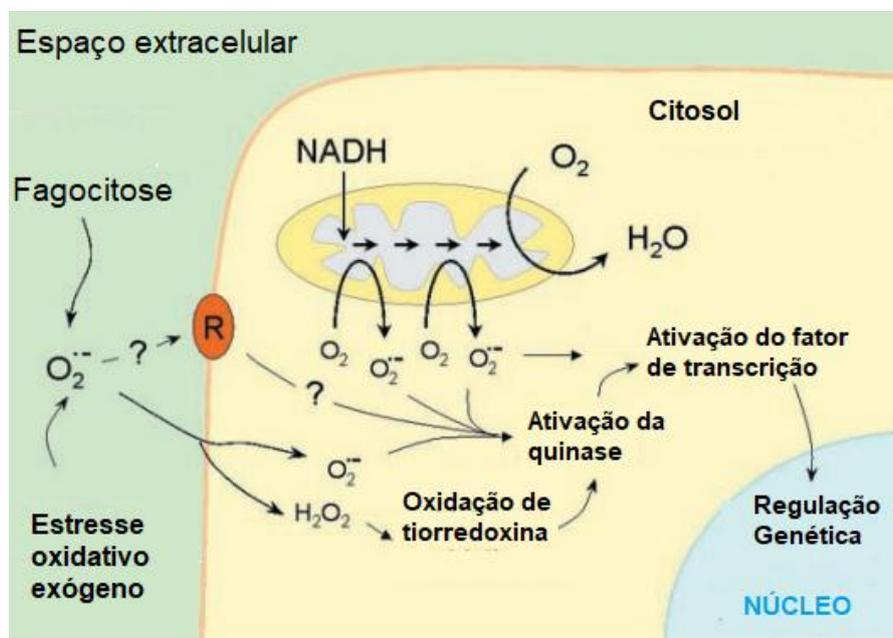
A reação de oxidação é parte essencial do metabolismo celular e dos seres de vida aeróbica, produzindo espécies reativas constantemente, de forma natural ou por disfunção biológica. No organismo, esses radicais livres fazem parte da produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, da imunidade, defesa celular e síntese de substâncias biológicas. Entretanto, o excesso de espécies reativas no organismo pode causar efeitos deletérios, como a peroxidação dos lipídios das membranas e agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos, DNA e RNA (RODRIGUES, 2016b).

Para evitar os danos causados pelos radicais livres, a maior parte destas espécies reativas produzidas pelo organismo, são removidas pelas defesas antioxidantes das células que são constituídas por moléculas enzimáticas e não enzimáticas. O equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é um requisito fundamental para que o organismo funcione normalmente (VALKO *et al.*, 2007). Contudo, existem circunstâncias onde este equilíbrio é comprometido, pela produção excessiva destas espécies reativas ou por uma anormalidade existente nas defesas antioxidantes das células. Este desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo, e tal processo conduz as biomoléculas à oxidação levando a perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, manifestando-se como dano oxidativo das células e dos tecidos (FERREIRA & ABREU, 2007).

De acordo com a teoria do estresse oxidativo o acúmulo de danos nas células e tecidos, causados por espécies reativas do oxigênio, são um dos principais fatores para o processo de envelhecimento. As mitocôndrias desempenham um importante papel no envelhecimento, pois são importantes fontes endógenas geradoras das espécies reativas do oxigênio (ERO), de modo que, o oxigênio produzido participa da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, na qual é reduzido pela citocromo oxidase em água e o NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$ , para que haja a produção de ATP (SASTRE *et al.*, 2003). Cerca de 95% de todo oxigênio que é aspirado por um indivíduo, sofre redução para produzir água, em reação catalisada pelo citocromo oxidase do complexo IV na região mitocondrial. E para que ocorra a completa redução da molécula de oxigênio em água, são transportados quatro elétrons dentro da membrana mitocondrial interna ( $\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Figura 4). No entanto, durante o transporte destes elétrons 1 a 2% são perdidos, levando a formação de inúmeras espécies reativas do oxigênio, tais como o radical superóxido e

hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Essa geração mitocondrial de radicais livres, pode causar danos aos componentes mitocondriais e celulares iniciando um processo de degradação (CADENAS & DAVIES, 2000).

**Figura 4:** Produção de espécies reativas do oxigênio nas mitocôndrias.



**Fonte:** Adaptado de MCCORD, 2000.

O estresse oxidativo ocorre em diferentes níveis variando de acordo com o tipo de organismo, de tecidos ou de células, e pode ser ocasionado por razões naturais como, dieta pobre em antioxidantes não enzimáticos, a prática extrema de exercícios físicos, infecções crônicas e a privação de sono; mas também pode ser motivado por causas não naturais como a presença de substâncias químicas estranhas no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (FERREIRA & ABREU, 2007). O dano oxidativo é singularmente elevado para alguns alvos moleculares mais específicos, tais como o DNA e a membrana mitocondrial, por serem um dos primeiros alvos de ataque das espécies reativas do oxigênio, esta situação pode conduzir ao envelhecimento do tecido através de apoptose e necrose das células (SASTRE *et al.*, 2003).

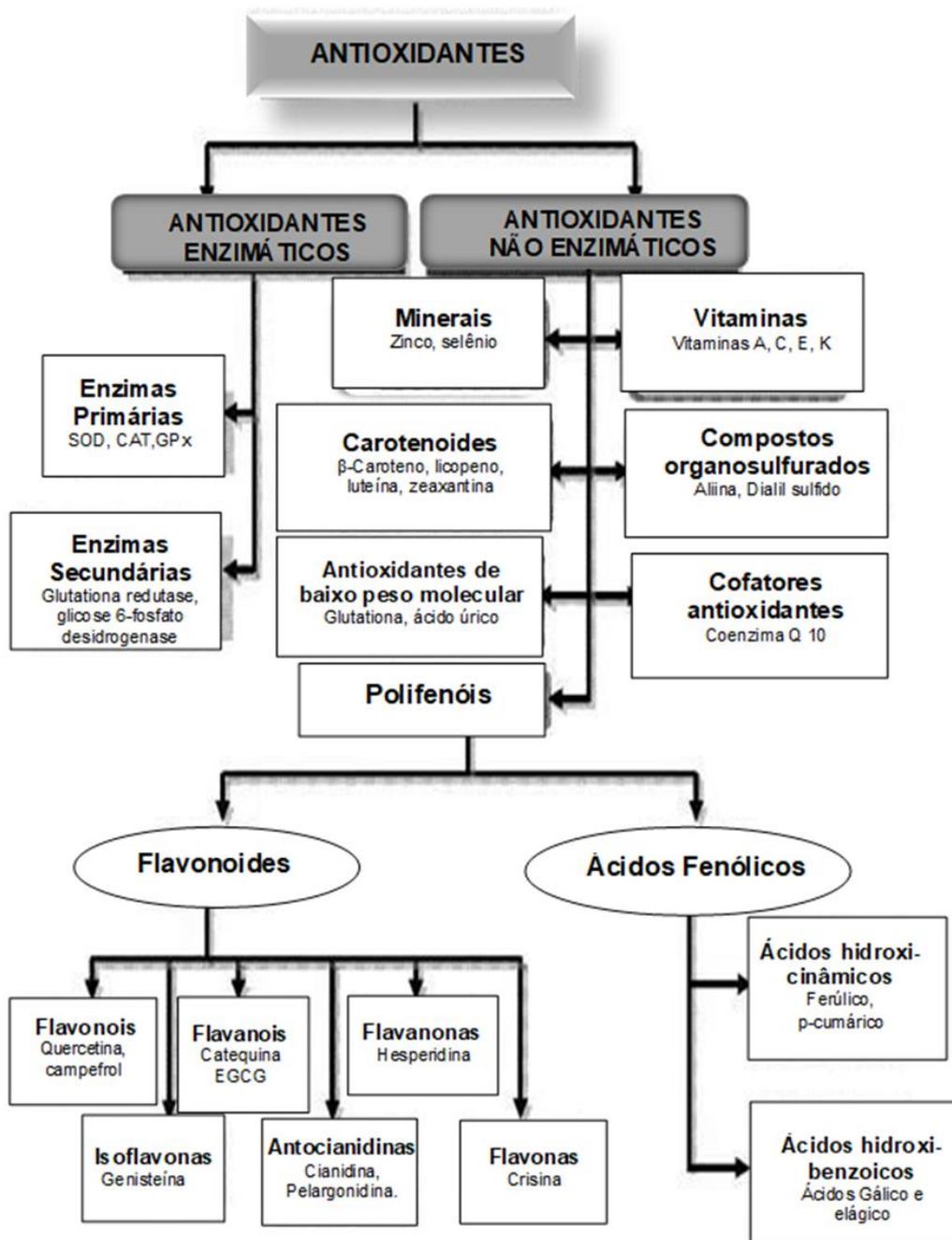
## 1.4 Antioxidantes e defesa antioxidante

Segundo HALLIWELL (2001), o termo antioxidante possui natureza multiconceitual e pode ser definido como substâncias ou moléculas que quando presentes em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável retardam ou previnem de forma significativa, a extensão do dano oxidativo provocado pela ação das espécies reativas. Esses agentes antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme a sua estrutura.

Os antioxidantes enzimáticos são sistemas de defesa presentes nas células dos organismos eucariontes e são constituídas por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que operam mediante mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a produção das espécies reativas, envolvidas com o início das reações em cadeia que culminam com a propagação e ampliação do processo, tendo por consequência, a ocorrência de danos oxidativos nas células (SIES, 1993; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os sistemas de defesa não enzimáticos atuam interrompendo as reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas e minimizam alguns danos provocados por estas espécies reativas. São constituídos por antioxidantes, entre os quais se destacam: As vitaminas, os minerais, flavonoides e os carotenoides. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e os sintéticos, tais como, BHA (hidroxianisol de butila) e o BHT (hidroxitolueno de butila) (HEINONEN *et al.*, 1998; BIANCHI & ANTUNES, 1999). Os mecanismos de defesa antioxidantes enzimático e não enzimático (Figura 5) atuam de forma cooperativa, de modo que a ausência de uma destas defesas pode acarretar um desequilíbrio no estado redox da célula, levando a um aumento na suscetibilidade às espécies reativas intra ou extracelulares (DRÖGE, 2002).

**Figura 5:** Classificação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.



Fonte: Adaptado de RATNAM *et al.*, 2006.

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes mecanismos de proteção agindo em diversas etapas do processo oxidativo, e são, portanto, classificadas como primárias e secundárias (MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT, PONGSAWATMANIT, 2007). Os antioxidantes primários são substâncias com núcleo fenólico, que agem interrompendo a reação de oxidação através da doação de elétrons ou hidrogênios aos radicais livres, impedindo a sua formação convertendo-os em produtos estáveis. O radical

livre formado a partir do antioxidante se estabiliza por ressonância e, por isso, possui baixa reatividade (REISCHE, LILLARD, EITENMILLER, 2008).

Já os antioxidantes secundários retardam ou reduzem as etapas de iniciação da oxidação, por diferentes mecanismos, que incluem complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Os antioxidantes secundários não agem de modo direto sobre as espécies reativas, no entanto reduzem a velocidade da oxidação (MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT, PONGSAWATMANIT, 2007; REGITANO-D'ARCE, 2006).

Os antioxidantes utilizados por via tópica devem ser assimilados pela pele e liberados no tecido de forma ativa. Muitos ativos antioxidantes se oxidam e se tornam inativos antes de atingirem o alvo. A absorção também é um elemento importante e depende de diversos fatores, tais como a fórmula molecular do composto, seu pH, sua solubilidade e o veículo que contém o ativo (BAUMANN, 2004).

O desempenho dos agentes antioxidantes *in vivo*, depende dos seguintes fatores: tipos dos radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; razão entre o número de radicais livres e o número de radicais sequestrados; destino dos radicais derivados dos antioxidantes; concentração e mobilidade no organismo; biodisponibilidade (BIANCHI & ANTUNES, 1999; RATNAM *et al.*, 2006).

#### **1.4.1 Antioxidantes não enzimáticos de origem natural**

Atualmente, a procura por antioxidantes de origem natural para a utilização na indústria de alimentos e de produtos para a saúde, tem aumentado de forma considerável em substituição aos antioxidantes sintéticos que estão sendo restringidos por seus potenciais carcinogênicos (RAMALHO & JORGE, 2006). Os antioxidantes naturais extraídos dos vegetais, tem sido amplamente empregados na elaboração de medicamentos, alimentos, aromas, bebidas, repelentes, fragrâncias, cosméticos e demais produtos industrializados (ZHENG & WANG, 2001).

Os vegetais são ricas fontes de compostos com potencial antioxidante, apresentando uma ampla variedade de fitoquímicos capazes de inativar os radicais livres. Dentre as maiores classes de compostos antioxidantes não enzimáticos de origem vegetal, destacam-se os polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos), vitaminas (A, C e E), os carotenoides (carotenos e xantofilas), demonstrando eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (SOOBRAATTE *et al.*, 2005).

As moléculas com propriedades antioxidantes, oriundas das plantas, contribuem na prevenção e no tratamento de várias patologias, nas quais as espécies reativas estão envolvidas. Estudos epidemiológicos têm mostrado que muitos dos compostos antioxidantes exógenos, encontrados nos vegetais são capazes de deter o envelhecimento e possuem atividades anti-inflamatória, antiaterosclerótica, antitumoral, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana e antiviral (CAI *et al.*, 2004).

#### **1.4.2 Os Carotenoides: Carotenos e Xantofilas**

Os carotenoides constituem um grande grupo de pigmentos naturais, identificados na natureza em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes. Esses compostos são representados por aproximadamente 700 estruturas diferentes, sendo responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho em frutas, vegetais, fungos e flores. A ocorrência de carotenoides na natureza é ampla, e também, podem ser encontrados em vários seres vivos, desde microorganismos até animais (SIES & STAHL, 2004; FONTANA *et al.*, 2000).

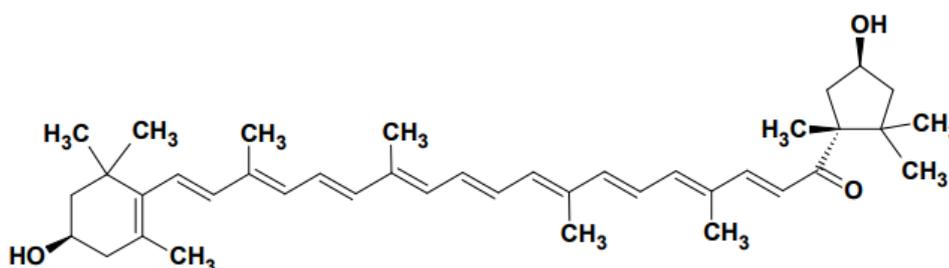
Os carotenoides são tetraterpenoides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula. Sua cadeia poliênica pode ser constituída de 3 a 15 duplas ligações conjugadas e o comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da molécula (FRASER e BRAMLEY, 2004). Os pigmentos compostos somente por carbonos e hidrogênios são denominados carotenos, e os carotenoides oxigenados são as xantofilas, que apresentam grupos substituintes com oxigênio (RODRIGUES-AMAYA, 1999).

As xantofilas possuem em sua estrutura molecular pelo menos uma função hidroxil, ceto, epóxi, metoxi ou ácido carboxílico (QUIRÓS & COSTA, 2006). As fontes das xantofilas podem ser naturais ou sintéticas (SANTOS *et al.*, 2004), sendo encontradas nas bactérias, fungos, algas, plantas e animais. A ampla distribuição das xantofilas entre os diferentes reinos filogenéticos e sua grande variedade estrutural, provavelmente reflete as múltiplas atividades biológicas destas moléculas nos organismos vivos (RUBAN & JOHNSON, 2010). Nas últimas décadas as atividades biológicas das xantofilas têm despertado grande atenção, uma vez que apresentam notável potencial antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno. Exemplos de xantofilas incluem a luteína, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina, ecionina, criptoxantina, capsorubina e a capsantina (CHAN *et al.*, 2009).

### 1.4.2.1 A Capsantina

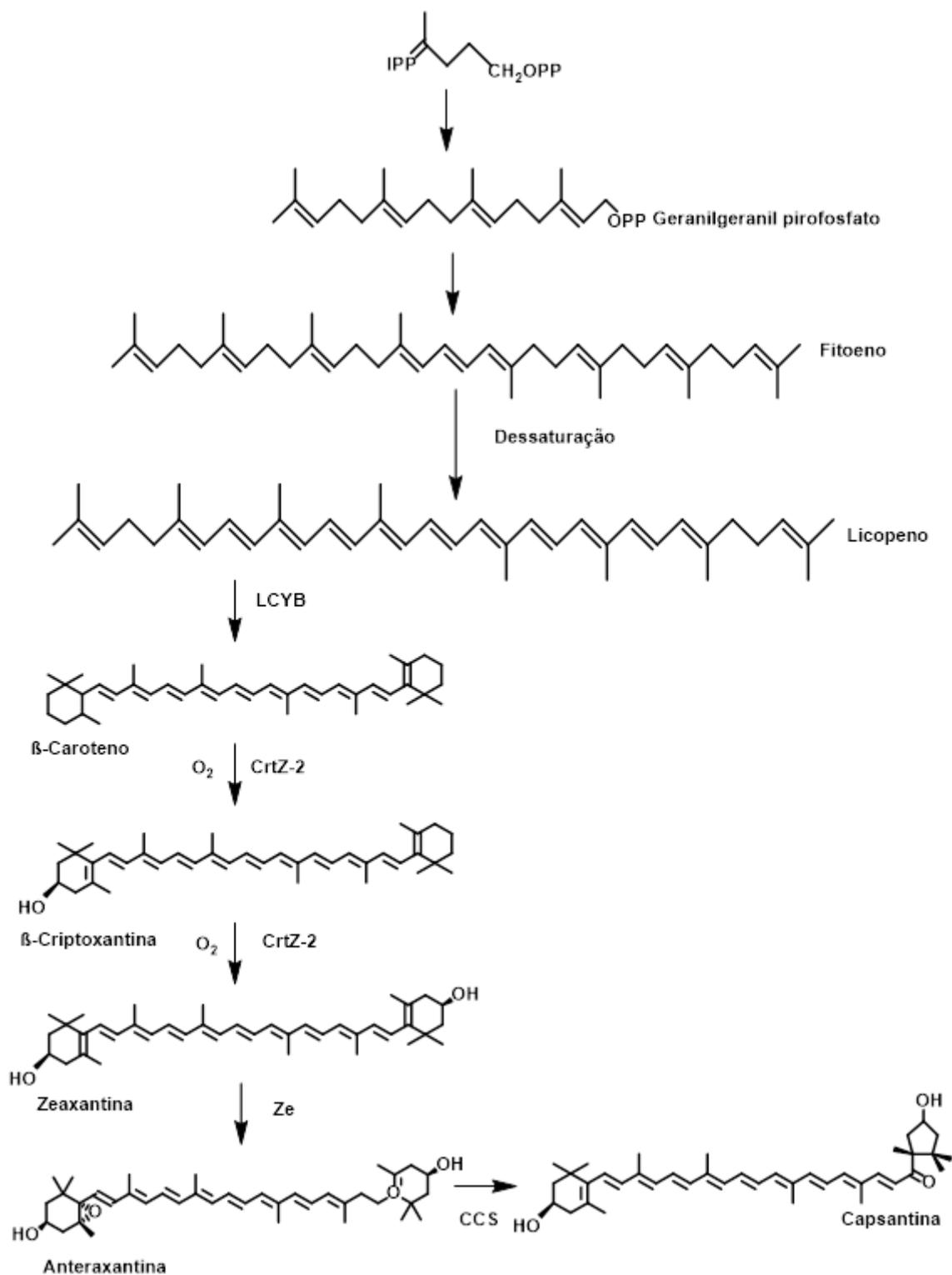
A capsantina é um dos principais pigmentos de cor vermelha, encontrado no grupo dos carotenoides. Pertencente a classe das xantofilas, a capsantina possui uma longa cadeia constituída por onze ligações duplas conjugadas, com um anel ciclopentano e um grupamento ceto conjugado polar em uma de suas extremidades, que absorve de forma eficiente a luz verde e reflete uma tonalidade vermelho-laranja (figura 6). Este pigmento possui fórmula molecular  $C_{40}H_{56}O_3$ ; seu peso molecular é  $584.871\text{ g mol}^{-1}$ ; densidade  $1,012\text{ g ml}^{-1}$ ; ponto de fusão  $177\text{ a }178^\circ\text{C}$ ; é lipossolúvel e, portanto, solúvel em solventes orgânicos tais como éter de petróleo, metanol, etanol, sulfeto de carbono e acetona; é termolábil, sendo facilmente degradado se exposto à altas temperaturas (SHAH *et al.*, 2014).

Figura 6: Estrutura química da capsantina.



A capsantina é um produto final na via biossintética dos carotenoides, que se inicia com o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). O Fitoeno sintase (PSY) converte duas moléculas de GGPP em fitoeno. O fitoeno sofre dessaturação (aumento do número de insaturações) convertendo-se em licopeno que sofre uma reação de ciclização em ambas as extremidades pela ação do licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB), produzindo o  $\beta$ -caroteno. O  $\beta$ -caroteno então converte-se em  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina e anteraxantina. Por fim, a anteraxantina é catalisada pela capsantina-capsorubina sintase (CCS) gerando a capsantina (Figura 7) (SHAH *et al.*, 2014).

Figura 7: Via biossintética da capsantina.



Fonte: Adaptado de SHAH et al., 2014.

Utilizada industrialmente como suplemento alimentar, aroma natural e corante, a capsantina desempenha um importante papel na nutrição, saúde e reprodução de animais. Em humanos é considerada como um agente antioxidante, anticarcinogênico, promotor antitumoral, controlador da obesidade e fortalecedor do sistema imunológico (KIM *et al.*, 2009). A capsantina é uma das xantofilas com maior potencial antioxidante se comparada com os demais carotenoides, isto ocorre devido à sua estrutura molecular particularmente a presença de um amplo sistema de duplas ligações conjugadas e de um grupo ceto, que reduzem significativamente a possibilidade de auto-oxidação da molécula, e conseqüentemente a sua capacidade antioxidante é aumentada (PEREZ-GALVEZ e MINGUEZ-MOSQUERA, 2002).

A capsantina como antioxidante biológico, é capaz de inativar os radicais livres produzidos na reação de peroxidação lipídica e / ou sequestrar oxigênio singlete na foto-oxidação de lipídeos. A atividade antioxidante das xantofilas e carotenos está relacionada à suas estruturas moleculares, devido à presença dos sistemas de duplas ligações conjugadas e grupos cromóforos. Sendo assim, xantofilas com 9 ou mais ligações duplas fornecem proteção máxima. A capsantina pode atuar como um sequestrante do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) na foto-oxidação de lipídeos. Neste processo o oxigênio singlete transfere a energia de excitação para a molécula de capsantina, com posterior formação de um oxigênio triplete não reativo e uma capsantina triplete (Eq 1). Em seguida a capsantina triplete, retorna ao seu estado inicial pela dissipação de energia por meio de interações rotacionais e vibracionais que regeneram a molécula, conforme a equação 2 (NACHTIGALL, 2007).



As reações em cadeia que dão origem à formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica, podem ser interrompidas pelas xantofilas, particularmente a capsantina, através de três mecanismos possíveis: Pela transferência de elétrons (Eq 3), por doação de hidrogênio (Eq 4) ou por adição de um radical (Eq 5), conforme descrito abaixo (MESQUITA *et al.*, 2017):



A capsantina é um biocomposto típico das pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*, e encontra-se acumulada nas membranas tilacoides dos cromoplastos, sob a forma de um pigmento esterificado. Em pimentas com estágio avançado de maturação, a capsantina pode contribuir com até 60% do total de carotenoides presentes no fruto. Estruturas químicas compostas por um ou mais anéis de acil-ciclopentanol, tal como a capsantina, são raramente encontrados na natureza (SHAH *et al.*, 2014). Além das pimentas vermelhas *Capsicum* spp., a capsantina foi identificada apenas nas sépalas, pétalas e tépalas do lírio híbrido asiático vermelho (DELI *et al.*, 2000; YAMAGISHI *et al.*, 2010), no fruto de *Berberis* spp. (BUBICZ, 1965), em Aspargos e nas flores de *Aesculus rubicunda* (SHAH *et al.*, 2014).

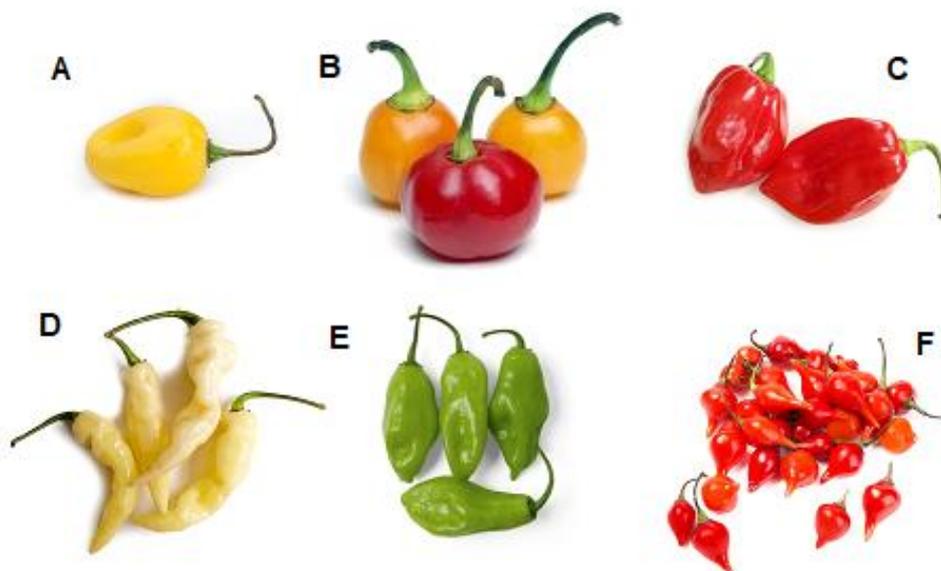
### **1.5. Pimentas *Capsicum* spp.: Espécie *Capsicum chinense* Jacq., variedade biquinho**

As pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, assim como a batata, o jiló, o tomate, e a berinjela. Apresentam frutos com grande diversidade genética em termos de cor, tamanho, forma, composição química, grau de pungência ou ardência (CHUAH *et al.*, 2008). O gênero *Capsicum* é representado por cerca de vinte e sete espécies diferentes, onde cinco delas são domesticadas e largamente cultivadas, a saber: *Capsicum annuum*; *Capsicum baccatum*; *Capsicum chinense* Jacq.; *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens*. Das espécies domesticadas deste gênero de pimenta, a *Capsicum chinense* Jacq. é considerada a mais brasileira, pois acredita-se que tenha sido domesticada pelos indígenas da Amazônia (CARVALHO *et al.*, 2006).

A pimenta *Capsicum chinense* Jacq., foi a primeira espécie a ser encontrada no continente americano pelos navegadores e desbravadores, apesar de ser hoje menos difundida mundialmente se comparada com outras espécies do mesmo gênero. Esta espécie pode ser encontrada na América desde a região central até o extremo sul brasileiro, entretanto, seu centro de diversidade está localizado na Bacia Amazônica. (CARVALHO *et al.*, 2006).

A espécie *Capsicum chinense* Jacq. é composta pelos morfotipos conhecidos como: ‘cumari do Pará’, ‘pimenta-de-bode’, ‘habanero’, ‘murupi’, ‘pimenta-de-cheiro’ e ‘biquinho’ (Figura 8). Estas pimentas são cultivadas em todos os estados da federação, entretanto os principais produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio Grande do Sul, Ceará e Bahia. Além do mercado interno, parte da produção brasileira de pimentas é exportada para diversos países, em diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas (RIBEIRO et al., 2008). Dos diferentes tipos varietais que compõem a espécie *Capsicum chinense* Jacq., a pimenta biquinho tem se destacado, entretanto, não tem sido adequadamente explorada em sua totalidade, sendo destinada apenas ao uso em conservas, geleias ou como decoração em pratos, devido ao seu aroma marcante e formato característico (KAPPEL, 2007; REIFSCHNEIDER & RIBEIRO, 2004).

**Figura 8:** Variedades de pimenta da espécie *Capsicum chinense* Jacq.: (A) Cumari do Pará, (B) Pimenta-de-bode, (C) Habanero, (D) Murupi, (E) Pimenta-de-cheiro e (F) Pimenta biquinho.



**Fonte:** Adaptado de CARVALHO et al., 2006.

O tipo varietal da espécie *Capsicum chinense* Jacq., popularmente conhecida como ‘pimenta-de-bico’, ‘pimenta-bico’ ou ‘pimenta-biquinho’, tem ganhado notoriedade nos últimos anos por seu sabor e aroma peculiar, e também, pela ausência da pungência característica das demais pimentas. Existem algumas pimentas “biquinho” que possuem picância, devido ao cruzamento com outras variedades pungentes da mesma espécie, embora sejam raras (CARVALHO et al., 2006).

Apesar de ser brasileira e muito comum em Minas Gerais, a origem da pimenta biquinho é incerta. Acredita-se que foi selecionada pelos próprios produtores da região do Triângulo Mineiro, onde está concentrada a maior produção deste tipo varietal no Brasil. Sua produção em escala comercial é recente, iniciou-se em 2004 graças à Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater/MG) (CARVALHO *et al.*, 2006). Em 2009 a Embrapa Hortaliças lança no mercado a *Capsicum chinense* variedade BRS Moema, uma cultivar que foi selecionada e desenvolvida a partir da população CNPH 3870 (Pimenta biquinho doce). Análises realizadas com marcadores moleculares indicaram que a cultivar BRS Moema é distinta das demais populações de “pimenta biquinho”. Atualmente, esta forma varietal de pimenta vem sendo cultivada também no Estado de Goiás, sendo muito produtiva, pois pode atingir uma quantia de até dois mil frutos por cultivar. A colheita dos frutos, é um dos problemas no cultivo dessa pimenta, que deve ser obrigatoriamente manual, pois a maturação de suas pimentas não ocorrem de forma homogênea (RIBEIRO & AMARO *et al.*, 2012).

Os frutos da pimenta biquinho (Figura 9), assim como as demais pimentas da espécie *Capsicum chinense*, apresentam em sua constituição química as vitaminas A, C, E, B1 e B2 (REIFSCHNEIDER, 2000). O conteúdo de ácido ascórbico (Vitamina C) encontrado na polpa da pimenta biquinho, é equivalente a 99 mg de ácido ascórbico/100 g de fruto fresco, sendo esta uma quantidade superior à necessidade diária de um indivíduo (LUTZ; FREITAS, 2008). Seu fruto é rica fonte de sais minerais, tais como sódio, magnésio, fósforo, potássio, cálcio e ferro, além de ser fonte de compostos antioxidantes naturais como os carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos. Estes compostos ativos juntos, contribuem com as propriedades antioxidantes da pimenta biquinho e também para saúde humana, e por isso, pode ser considerada como um alimento funcional. Devido ao seu potencial antioxidante, o uso frequente da pimenta biquinho *in natura* e de seus extratos, podem reduzir os riscos de certas patologias crônicas tais como o Parkinson, Alzheimer, catarata e diabetes (SILVA, 2017). A ingestão desta pimenta, ainda, confere proteção contra a carcinogênese, impede a coagulação do sangue e retarda o envelhecimento precoce do organismo. Pode ser utilizada por crianças e idosos, devido aos seus efeitos benéficos para a saúde e por sua baixa picância (LUNN, 2007).

**Figura 9:** Frutos da pimenta biquinho



**Fonte:** Próprio autor

Por ser considerada uma variedade nova da espécie *Capsicum chinense*, a pimenta biquinho é uma planta até então pouco explorada. Sua produção é ainda muito incipiente em todos os estados brasileiros, sendo uma variedade com procura limitada e pouca aceitação comercial, em virtude da baixa pungência de seus frutos. A princípio, o uso da pimenta biquinho era relacionada somente à prática ornamental, atualmente tem sido consumida principalmente na versão *in natura* como aperitivo, na obtenção de molhos, temperos secos, conservas e como geleia (SILVA, 2017). Contudo, sua aplicabilidade limita-se à decoração e preparo de alimentos, ao passo que suas propriedades benéficas ainda permanecem em segundo plano (DANTAS e ARAÚJO, 2015).

Ainda que vários estudos tenham comprovado que as pimentas *Capsicum* possuem uma grande variedade de compostos bioativos, poucas pesquisas foram desenvolvidas na tentativa de identificar e quantificar as substâncias bioativas que compõem a pimenta biquinho. CARVALHO *et al.* (2014) determinou os teores de ácido ascórbico, compostos fenólicos, carotenoides totais e a atividade antioxidante, em frutos imaturos e maduros de diferentes genótipos de pimentas *Capsicum* spp., inclusive a pimenta biquinho, que se destacou com grande potencial para ser utilizada em programa de melhoramento genético, devido aos altos teores de carotenoides totais e ácido ascórbico. BERNARDO *et al.* (2015) em busca de uma forma alternativa para a

conservação da pimenta biquinho através da elaboração de um extrato, avaliaram a variação do teor médio de vitamina C e carotenoides totais em intervalos de 15 dias, por 90 dias de armazenamento. Os autores verificaram que os teores de vitamina C e carotenoides totais mostraram-se estáveis ao longo de 90 dias, não sendo observadas variações relevantes.

Atualmente, existe um grande interesse por parte das indústrias cosméticas em substituir matérias primas sintéticas antioxidantes, por extratos padronizados com princípios ativos de ação anti-radicalar, para a produção de cosméticos com apelos mais naturais (SILVA et al., 2013). A pimenta biquinho constitui-se em rica fonte de antioxidantes naturais, como a vitamina C e os carotenoides, que retardam e previnem o envelhecimento precoce. Logo, uma forma de utilização para esta variedade de pimenta tão pouco investigada, seria o emprego de seu extrato padronizado na elaboração de formulações cosméticas com ação antioxidante.

### **1.6 Produtos cosméticos desenvolvidos a partir de matérias-primas de origem natural**

Por pelo menos duas décadas, os setores da indústria que estão envolvidos com a área da beleza, em particular os segmentos de cosméticos e perfumaria, tem apresentado uma expressiva expansão à nível global, devido a maior participação e fidelização por parte dos consumidores (MIGUEL, 2012). Atualmente, o maior mercado de cosméticos e produtos de higiene pessoal é o europeu, avaliado em € 77,6 bilhões em vendas a varejo somente no ano de 2017 (COLIPA, 2018). No cenário brasileiro o setor de higiene pessoal, perfume e cosmético em 2017, apresentou um crescimento acima da economia, com valor anual de 2,8% contra 1,0% do PIB total brasileiro. De acordo com dados do EUROMONITOR/2017, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking dos maiores consumidores de produtos de beleza e higiene do mundo, ficando atrás dos Estados Unidos, China e Japão (ABHIPEC, 2018).

O setor de cosméticos e produtos de higiene pessoal é dinâmico e encontra-se em contínua expansão, exigindo inovação e investimentos constantes na elaboração e aperfeiçoamento de produtos que atendam a uma grande diversidade de consumidores (MOTA, 2014). As empresas do setor têm observado que produtos inovadores para públicos específicos, possuem uma melhor aceitação (FRITZ e SOUZA, 2006). Diante desse contexto, os produtos cosméticos naturais baseados na utilização da biodiversidade de origem vegetal, tem ganhado força nas últimas décadas, com destaque

para o uso de compostos bioativos com potencial antioxidante capazes de amenizar e prevenir o envelhecimento prematuro da pele. Os produtos cosméticos desenvolvidos com matérias-primas de origem natural tem sido uma tendência em várias partes do mundo, principalmente, nos países da União Europeia, Estados Unidos e Japão. O Brasil possui um importante papel nesse cenário, devido à produção, consumo, e exportação de cosméticos elaborados a partir de matérias-primas provenientes de sua biodiversidade. No âmbito internacional, o Brasil é reconhecido pela grandeza de sua biodiversidade, uma vez que possui as maiores reservas de recursos naturais, diversos biomas e a mais rica biodiversidade tropical do mundo (MIGUEL, 2012). A maior fonte de diversidade da natureza viva no planeta encontra-se na Amazônia, ocupando cerca de 5% da extensão territorial da superfície da terra. Essa riqueza natural possui um valor incalculável e ao mesmo tempo representa um enorme potencial para inúmeras experiências de aproveitamento desses recursos (BLOISE, 2003; MIGUEL, 2012).

Os fitocosméticos ou cosméticos naturais, podem ser definidos como preparações compostas por substâncias ativas extraídas dos vegetais, em proveito da higiene, da estética, da correção e da manutenção do estado normal e sadio da pele e cabelos. O crescimento no consumo dos fitocosméticos, estão diretamente associados com os novos valores da sociedade contemporânea, visto que os produtos deste segmento representam a qualidade de vida em geral, a beleza, o bem-estar, o prazer, a saúde, a estética, a juventude e a boa aparência que podem ser obtidos por meio do uso de formulações com ingredientes de origem natural (FREITAS DE ARAÚJO *et al.*, 2010). A procura pelos fitocosméticos, está também relacionado à crescente sofisticação dos mercados consumidores, o interesse pelo que é saudável e natural, ao aumento da preocupação com o meio ambiente, ao “marketing ecologicamente correto”, e ao crescente interesse científico por produtos elaborados a partir de compostos bioativos extraídos da natureza (MIGUEL, 2011).

A inovação, assim como o desenvolvimento tecnológico e científico, proporcionou ao setor de cosméticos a descoberta de vários compostos antioxidantes e, por conseguinte, a comercialização de produtos antissinais ou anti-idade, cuja proposta principal seria o combate, controle ou postergação do envelhecimento cutâneo, por meio da ação antioxidante contra os radicais livres (BAUMANN, 2004). Os radicais livres também atuam sobre o tecido cutâneo, assim como em todo o organismo, causando agressões e alterações nas estruturas das células acelerando o processo de envelhecimento da pele (SCHARFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 1997). Por este motivo, os

cosméticos com atividade antioxidante têm sido cada vez mais estudados (FONTES, 2013). Os cosméticos antioxidantes, são produtos com a função específica de reproduzir a proteção antiradicalar natural do organismo e limitar as reações químicas oxidativas, evitando o estresse oxidativo e conseqüentemente a senilidade da pele. Os compostos antioxidantes de uso tópico empregados nos cosméticos, devem ser absorvidos pela pele e liberados para o tecido alvo na forma ativa. Sua absorção é um processo importante e dependente de fatores como a estrutura molecular do composto ativo, suas propriedades físico- químicas, a solubilidade, pH e a base cosmética utilizada (STEINER, 2008). Para o desenvolvimento das formulações cosméticas com ação antioxidante, são utilizadas substâncias como vitaminas A, E e C; compostos bioativos tais como flavonoides, carotenoides e polifenóis; e os extratos de origem vegetal, padronizados ou não (BAUMANN, 2004).

Os extratos produzidos a partir de diferentes partes de plantas, são considerados valiosos componentes para a elaboração dos cosméticos, principalmente por serem constituídos por inúmeras moléculas fitoquímicas, a saber: os açúcares, proteínas, gorduras, glicosídeos, flavonoides, carotenoides, alcalóides, óleos essenciais, taninos, mucilagens, pectinas, minerais e vitaminas (CUNHA *et al.*, 2008; MAJEED and PRAKASH, 2002; XIAO XIAN, 1999). Em virtude da presença destes compostos, os extratos vegetais apresentam várias propriedades, tais como antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antialérgica, e de proteção contra os raios UV. Cosméticos produzidos a partir dos extratos vegetais, mesmo que em baixas concentrações, tornam o produto final mais atrativo devido ao apelo mercadológico, que valoriza a busca pelo produto natural na obtenção do equilíbrio biológico (THORNFELDT, 2005; BALANDRIN, 1985).

Tendo em vista o aumento na procura dos extratos obtidos a partir das plantas, tem-se observado maior interesse por parte da comunidade científica e das indústrias, no sentido de compreender melhor a constituição química dessas plantas, e assegurar tanto a eficácia, quanto a segurança do seu uso (MIGLIATO *et al.*, 2007; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Dessa forma, fica evidente que o controle de qualidade dos extratos das plantas, é uma etapa fundamental a ser efetuada antes mesmo de sua utilização na elaboração de um produto cosmético. Os diversos componentes ativos dos extratos obtidos das plantas, devem ser preservados caracterizando-o como um fitocomplexo, e esta manutenção procura garantir a ação farmacológica específica da espécie vegetal. As plantas produzem diferentes substâncias químicas, e algumas delas são características

de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua padronização (KLEIN *et al.*, 2009).

Os extratos padronizados são aqueles, cuja eficácia é garantida através da constância no teor de princípios ativos, por meio da aplicação de métodos analíticos adequados para a detecção e quantificação dos marcadores químicos. A utilização de extratos padronizados no desenvolvimento de fitocosméticos, é uma maneira de conferir qualidade e eficácia ao produto final e, ainda, a confiabilidade por parte dos consumidores. A padronização dos extratos, pode ser efetuada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, mostrando que se a mesma estiver presente em uma quantidade apropriada, provavelmente os demais componentes estarão igualmente representados. Esta substância não necessita obrigatoriamente, apresentar a atividade farmacológica esperada ou para a qual o extrato é utilizado. Os diferentes métodos existentes para a padronização do teor de substância ou grupo de substâncias ativas, e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse dos extratos incluem, testes espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, os quais devem possuir no mínimo especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica (BRASIL, 1988; CARVALHO *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2009).

## 1.7 Justificativa

A crescente demanda por produtos naturais associados ao interesse por hábitos saudáveis tem direcionado várias pesquisas nesse seguimento, no qual as pimentas se destacam por apresentar características peculiares contribuindo para a saúde de quem as consome, além de proporcionar cor, sabor e picância às preparações, dependendo da variedade utilizada.

As pimentas têm sido classificadas como promotoras da saúde, e um dos principais atrativos desta especiaria é que seus frutos são ricos em fibras, sais minerais, vitaminas, flavonoides, carotenoides e outros metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, capazes de retardar ou prevenir de forma significativa o dano oxidativo provocado pela ação dos radicais livres (JÚNIOR *et al.*, 2015).

Entretanto, a maioria das pimentas do gênero *Capsicum*, com destaque para a variedade biquinho, tem sido pouco explorada em sua plenitude, sendo utilizada exclusivamente como ornamentação ou condimento na alimentação, ao passo que suas propriedades benéficas ainda permanecem em segundo plano (NEITZKE *et al.*, 2015). A pimenta biquinho constitui-se em rica fonte de antioxidantes naturais, como a vitamina C, os flavonoides e os carotenoides, que retardam, previnem doenças degenerativas e o envelhecimento precoce do organismo (SILVA, 2017).

Apesar de o Triângulo Mineiro ser atualmente a região brasileira de maior destaque no cultivo da pimenta biquinho, recentemente esta variedade da espécie *Capsicum chinense* vem sendo cultivada também no Estado de Goiás, sendo muito produtiva, pois pode atingir uma quantia de até dois mil frutos por cultivar. Esta pimenta destaca-se por sua fácil adaptação às condições de clima equatorial e tropical sendo uma das espécies mais produzidas no país. Nas condições de cultivo, a colheita ocorre com 90 dias após o transplântio das mudas para o campo e tende a apresentar alta produtividade, uniformidade de plantas e frutos sem pungência (SILVA, 2017; CARVALHO *et al.*, 2006).

Atualmente, existe um grande interesse por parte das indústrias cosméticas em substituir matérias primas sintéticas antioxidantes, por extratos vegetais padronizados com princípios ativos de ação anti-radicalar, para a produção de cosméticos com apelos mais naturais (SILVA *et al.*, 2013). Estudos toxicológicos têm demonstrado, a possibilidade dos antioxidantes sintéticos serem prejudiciais à saúde, por isso, muitas pesquisas têm sido direcionadas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade

antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos (RAMALHO & JORGE, 2006; WÜRTZEN, 1990).

O mercado de cosméticos apresenta diversos produtos à disposição dos consumidores, no entanto, existe uma grande escassez de formulações cosméticas inovadoras e mais tecnológicas, elaboradas a partir de extratos vegetais padronizados. Parte dos produtos cosméticos possui um ou mais ingredientes vegetais apenas para justificar o marketing ecológico, escondendo a presença de componentes químicos cuja segurança e eficácia propicia a satisfação do usuário. A adição do extrato vegetal padronizado em uma formulação cosmética agrega valor e tecnologia ao produto, fugindo dos cosméticos convencionais que contém apenas extratos não padronizados sendo estes carentes de informações, cuja eficácia clínica e seus benefícios são questionáveis (HEINRICH et al., 2004). A padronização de um extrato vegetal é um pré-requisito de qualidade, que garante a constância dos efeitos terapêuticos e a segurança de seus usuários (KLEIN et al., 2009).

Considerando-se as propriedades e a eficácia das pimentas, alguns cosméticos existentes no mercado mencionam o extrato líquido não padronizado desta especiaria em suas composições. Entretanto os fitocosméticos a base de pimenta, ainda são pouco explorados tecnologicamente e podem representar um investimento próspero para o mercado brasileiro, sendo este um dos maiores produtores de pimentas *Capsicum* do mundo (CARVALHO et al., 2006). Apesar de já ser muito utilizada na alimentação, não foram encontrados documentos, relatos nas mídias ou pesquisas científicas discutindo a ação direta da pimenta biquinho em produtos cosméticos, sendo necessário mais estudos para atingir outros segmentos ainda não explorados para a utilização desta forma varietal de pimenta ainda pouco pesquisada.

Em face ao exposto, e tendo em vista a importância do uso de substâncias de ação antioxidante na inativação dos radicais livres que provocam o envelhecimento cutâneo, e que várias pesquisas científicas têm apontado que as pimentas da espécie *Capsicum chinense* são boas fontes de compostos bioativos com potencial antioxidante, e que a variedade biquinho não apresenta pungência, o presente estudo procurou avaliar a possibilidade de aplicação do extrato líquido padronizado em capsantina da pimenta biquinho (*Capsicum chinense* Jacq.) no desenvolvimento de um produto cosmético com ação antioxidante e eficácia anti-aging, em substituição aos ativos sintéticos encontrados no mercado, apresentando deste modo, uma matéria-prima de origem vegetal e

sustentável como uma opção alternativa na elaboração de cosméticos inovadores e mais naturais.

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um produto cosmético contendo o extrato líquido da *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade Biquinho) padronizado em capsantina, avaliar sua atividade antioxidante *in vitro* e eficácia anti-aging *in vivo*.

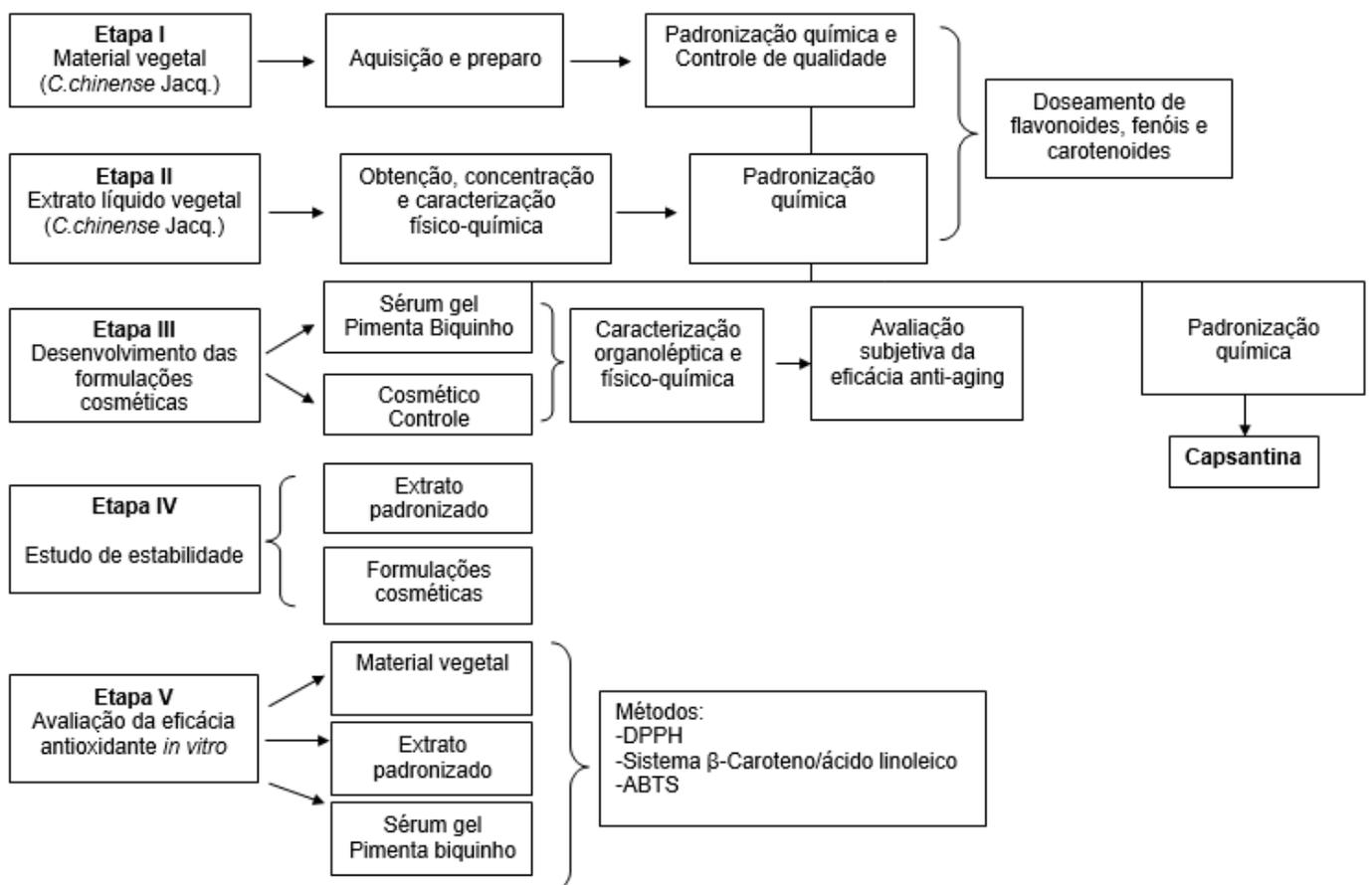
### 2.2. Objetivos Específicos

- Obter, processar e caracterizar a matéria-prima vegetal.
- Obter e caracterizar o extrato líquido a partir do pó da *Capsicum chinense* Jacq.
- Avaliar a atividade antioxidante total e determinar o teor de flavonoides, fenóis e carotenoides da matéria-prima vegetal e do extrato líquido.
- Validar o método analítico utilizado para a quantificação da capsantina no extrato líquido, por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).
- Desenvolver e caracterizar o produto cosmético na forma de um sérum gel, contendo o extrato padronizado da *Capsicum chinense* Jacq.
- Realizar o estudo de estabilidade acelerada do extrato líquido padronizado e da formulação cosmética, por um período de 90 dias.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e a eficácia anti-aging *in vivo* da formulação cosmética.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 10 estão descritas as etapas envolvidas na realização deste trabalho.

**Figura 10:** Fluxograma das etapas de trabalho



### 3.1 Material vegetal

O material vegetal constituído por pimentas da espécie *Capsicum chinense* Jacq., popularmente conhecidas como “pimenta biquinho”, foram adquiridas na fazenda Quati, localizada em Petrolina de Goiás a 16°5'44” de latitude Sul, 49° 20' 12” Oeste. O material foi identificado pelo professor Dr. Edemilson Cardoso da Conceição, com base em BERNARDO *et al.* (2015), e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, sob registro de nº 65904 (Apêndice 1).

As pimentas *C. chinense* Jacq. foram posteriormente pesadas, higienizadas e desidratadas em estufa com circulação de ar forçada a uma temperatura de 45 °C por 10 dias. Após a desidratação, o material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas e martelos e acondicionado ao abrigo da umidade e luz para posterior utilização.

### 3.2 Caracterização e Controle de Qualidade do pó da *Capsicum chinense* Jacq.

A caracterização e o controle de qualidade da matéria-prima vegetal foram realizados segundo os critérios da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) com adaptações.

#### 3.2.1 Análise microscópica do pó

A matéria-prima vegetal foi analisada utilizando uma lâmina de vidro, onde duas gotas do reagente Steinmetz foram adicionadas posteriormente. A lâmina foi então coberta com uma lamínula para análise em um Fotomicroscópio (Zeiss Axiostar Plus), acoplado a uma câmera Canon Power shot G10. Através do software Axion Vision 4.8, as imagens obtidas foram processadas.

#### 3.2.2 Determinação do Teor de Voláteis

Para a determinação do Teor de Voláteis, foi utilizado um analisador de umidade com lâmpada de halogênio 400 W modelo MB 35 (Olhaus®), onde 0,50 g da matéria-prima vegetal foi pesada e submetida a uma temperatura de 105° C. A análise foi realizada em triplicata e o teor de voláteis foi determinado em porcentagem conforme

apresentados no display da balança. Foi calculada a média e o desvio padrão dos valores obtidos.

### 3.2.3 Determinação do teor de cinzas totais

Utilizando uma balança analítica, alíquotas de 3,00 g da matéria-prima vegetal foram pesadas e transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, e incinerados em mufla (EDG COM 1P 3000, Brasil), aumentando-se gradativamente a temperatura seguindo um gradiente de 200°C por 30 minutos, 400°C por 60 minutos e 600°C por 90 minutos. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. O teor de cinzas totais (TCT) foi calculado como percentual pela média de três determinações independentes, segundo a Equação 6:

$$\text{TCT (\% m/m)} = \frac{m1}{m2} \times 100 \quad (\text{Eq.6}),$$

em que: m1 = massa do cadinho mais amostra calcinada; m2 = massa do cadinho mais amostra antes da calcinação.

### 3.2.4 Determinação da granulometria do pó

A granulometria do pó foi realizada com auxílio de tamises de aço inox com tampa e fundo coletor, de 710, 355, 250, 180 e 125 µm que foram previamente pesados e montados. Cerca de 25g de amostra foram pesadas em balança semi-analítica, sendo o pó posteriormente distribuído de maneira uniforme no tamis superior de malha de 710 µm. Empilhados, os tamises foram submetidos a vibrações com velocidade padronizada por um período de 15 minutos em um tamisador vibratório (Bertel<sup>®</sup>) para análises granulométricas. Após o período de tempo estabelecido, os tamises com porções de pó retido foram pesados separadamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores utilizados nos cálculos representam a média dos resultados obtidos nas análises. O percentual de pó retido em cada tamis foi calculado e o pó foi classificado conforme os parâmetros descritos na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010).

### 3.2.5 Determinação do índice de intumescência

Foram pesados 1g da matéria-prima vegetal e transferidos para uma proveta de 25 mL, com escala de 0,2 mL e tampa esmerilhada. Posteriormente foram adicionados, 25 mL de álcool 96° GL, com agitação em intervalos de 10 minutos durante a primeira hora e após repouso de três horas em temperatura ambiente, o volume final ocupado pela matéria-prima vegetal foi calculado, em mililitros, pela média das determinações, em triplicata, de acordo com a Equação 7:

$$II = V_f - V_i \quad (\text{Eq.7}),$$

em que: II= Índice de intumescência;  $V_f$  = volume final ocupado pela amostra (mL);  $V_i$  = volume inicial ocupado pela amostra (mL).

### 3.3 Obtenção do extrato líquido a partir do pó da pimenta *Capsicum chinense* Jacq.

O extrato líquido foi obtido por percolação, segundo metodologia descrita no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) com adaptações.

Para tanto, 4 Kg da matéria-prima vegetal, foram submetidos à maceração dinâmica em recipiente fechado, por um período de 24 horas, à temperatura ambiente, utilizando-se álcool etílico 96° GL como solvente extrator. Posteriormente, o material macerado foi transferido para um percolador de aço inox 304 com capacidade de 20 litros. O processo de percolação foi realizado com adição constante do álcool etílico. O gotejamento foi intenso até o esgotamento do solvente, tendo o cuidado para não deixar o pó sem o solvente, evitando assim seu ressecamento. O extrato percolado foi concentrado em equipamento de ventilação forçada a temperatura ambiente por quatro dias, sendo avaliado diariamente quanto ao seu teor de sólidos. Subsequentemente, o extrato líquido concentrado foi acondicionado em frasco de polietileno tampado, sob refrigeração à -20°C, para posterior caracterização e uso nos ensaios experimentais.

### **3.4 Caracterização físico-química do extrato líquido concentrado obtido a partir do pó da *Capsicum chinense* Jacq.**

A caracterização físico-química do extrato líquido concentrado obtido a partir do pó da *Capsicum chinense* Jacq., foi realizada segundo critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), com adaptações.

#### **3.4.1 Determinação do teor de sólidos**

Para a determinação do teor de sólidos, foi utilizado uma balança de precisão semi-analítica, acoplada a uma lâmpada de halogênio (marca OHAUS® e modelo MB35).

Uma amostra de 0,50 g do extrato líquido foi colocada na balança, e submetida a uma temperatura de 105° C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em percentual de umidade. O teor de sólidos no extrato foi obtido subtraindo o percentual de umidade de 100%.

#### **3.4.2 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)**

O potencial hidrogeniônico do extrato líquido foi determinado utilizando um pHmetro (Tecnal® Tec – 3MP, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os ensaios foram realizados em triplicata, com resultado expresso pela média.

#### **3.4.3 Determinação da densidade relativa**

A densidade relativa do extrato líquido foi determinada pelo método picnométrico, conforme descrito em Brasil (2010), a 25°C. Para tanto, foram determinadas as massas do picnômetro vazio, com água destilada, e finalmente com o extrato líquido concentrado. Foram utilizados picnômetros limpos, secos e previamente calibrados. A densidade foi calculada conforme a Equação 8:

$$DR = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (\text{Eq.8}),$$

Onde:  $m_1$  = massa do picnômetro + massa da água;  $m_2$  = massa do picnômetro + massa da amostra;  $m_0$  = massa do picnômetro vazio.

#### 3.4.4 Determinação da viscosidade

A viscosidade do extrato líquido da *Capsicum chinense* Jacq. foi determinada utilizando o viscosímetro Brookfield - DV-III, acoplado ao spindle 1 com uma velocidade de rotação de 200 RPM, torque 71,40% e temperatura de 21,5°C.

### 3.5 Doseamento de fenóis, flavonoides e carotenoides no pó e no extrato líquido concentrado da *Capsicum chinense* Jacq.

#### 3.5.1 Doseamento de fenóis totais

O teor de fenóis totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado, foram determinados segundo metodologia proposta por MOLE; WATERMAN (1987) com adaptações, baseado na complexação de compostos fenólicos presentes na amostra com uma solução de cloreto férrico. Como padrão utilizou-se o ácido tânico.

##### 3.5.1.1 Preparo da curva analítica

A partir de uma solução metanólica de ácido tânico de concentração 1 mg/mL, foram retiradas alíquotas de 75 µL, 150 µL, 200 µL, 250 µL, 300 µL e 350 µL, e transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL da solução de Lauril sulfato de sódio/Trietanolamina e 1 mL da solução de cloreto férrico, o volume foi completado para 4mL com água destilada. Após 15 minutos a leitura da absorbância foi realizada em 510nm em espectrofotômetro, e cada concentração foi preparada em triplicata. Em seguida uma curva analítica foi plotada relacionando a absorbância com a concentração de ácido tânico (mg/mL).

##### 3.5.1.2 Extração de fenóis da matéria-prima vegetal

Foram pesados 3,0 g da matéria-prima vegetal transferindo, em seguida, para um erlenmeyer com capacidade de 250 mL. Adicionou-se 150 mL de água destilada deixando sob aquecimento até ebulição, posteriormente o conteúdo foi transferido para um banho-maria a uma temperatura entre 80°C a 90°C, por um período de 30 minutos. O erlenmeyer foi resfriado em água corrente, e seu conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água destilada. Deixou-se decantar o

sedimento e filtrou-se através de papel de filtro qualitativo desprezando os primeiros 50 mL do filtrado. Cada amostra foi preparada em triplicata.

### 3.5.1.3 Teor de fenóis totais da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado

Em tubos de ensaio, foram adicionados 1mL da solução extrativa obtida a partir da matéria-prima vegetal, 2mL da solução de Lauril sulfato de sódio/Trietanolamina e 1mL da solução de cloreto férrico. Separadamente, foram transferidos 50 µL do extrato líquido concentrado para tubos de ensaio, contendo 2 mL da solução de lauril sulfato de sódio/trietanolamina e 1 mL da solução de cloreto férrico. Os tubos de ensaio foram agitados e mantidos em repouso por 15 minutos, e a absorbância das amostras foram lidas em comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicata. Através da curva padrão de ácido tânico e das diluições das amostras a concentração de fenóis totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a equação 9:

$$\%F_T \text{ (m/m)} = \frac{C_A \text{ (mg/ml)} \times FD \times 10^{-3} \times 100}{\text{Teor de sólidos (g)}} \quad (\text{Eq.9}),$$

em que:  $F_T$  = Concentração de fenóis totais;  $C_A$  = concentração da amostra utilizando a equação da curva padrão de ácido tânico;  $FD$  = Fator de diluição da amostra;  $10^{-3}$  = conversão de mg para g; 100 = porcentagem.

### 3.5.2 Doseamento de flavonoides totais

O teor de flavonoides presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado, foram determinados segundo a metodologia proposta por ROLIM *et al.* (2005) com adaptações. O método baseia-se na propriedade que os flavonoides possuem em absorver radiação no comprimento de onda da luz ultravioleta (UV) proporcionalmente à sua concentração.

#### 3.5.2.1 Preparo da curva analítica

Foi preparada uma solução padrão de rutina 0,1 mg/mL, utilizando metanol: ácido acético 0,02M (99:1). Posteriormente, alíquotas de 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500

$\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{L}$  foram retiradas da solução padrão, e o volume foi completado para 2 mL com a solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). As soluções foram homogeneizadas em agitador mecânico e a leitura da absorbância foi realizada em 361 nm. Cada ponto foi preparado em triplicata, e uma curva analítica foi plotada relacionando a absorbância com a concentração de rutina (mg/mL).

### 3.5.2.2 *Extração de flavonoides totais da matéria-prima vegetal*

Para a extração dos flavonoides, foram pesados 1,0 g da matéria-prima vegetal transferindo-a para um balão esmerilhado de 125 mL. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de uma solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1), aquecendo-se em banho-maria sob refluxo a uma temperatura entre 80 a 90°C, por cerca de 40 minutos. A solução foi resfriada em água corrente e filtrada através de um papel de filtro. As amostras foram preparadas em triplicata.

### 3.5.2.3 *Teor de flavonoides totais da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado*

As amostras extrativas da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado foram preparadas, separadamente, em solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1). Em seguida, efetuou-se a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 361 nm. A partir da equação da reta obtida na curva do gráfico do padrão, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides totais na solução extrativa. Todos os pontos foram analisados em triplicata. Através da curva padrão de rutina e das diluições das amostras a concentração de flavonoides totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a equação 10:

$$\% \text{Fl}_T (\text{m/m}) = \frac{C_A (\text{mg/ml}) \times \text{FD} \times 10^{-3} \times 100}{\text{Teor de sólidos (g)}} \quad (\text{Eq.10}),$$

Em que:  $\text{Fl}_T$  = Concentração de flavonoides totais; CA = concentração da amostra utilizando a equação da curva padrão de rutina; FD = Fator de diluição da amostra;  $10^{-3}$  = conversão de mg para g; 100 = porcentagem.

### 3.5.3 Doseamento de carotenoides totais

O teor de carotenoides totais na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado foi determinado segundo metodologia proposta por RODRIGUEZ-AMAYA (2001) com adaptações.

Uma amostra de 10g da matéria-prima vegetal e 1 g do extrato líquido concentrado da *Capsicum chinense* jacq., foram pesadas separadamente, e transferidas para Erlenmeyers de 50 mL adicionando 20 mL de acetona refrigerada ( $\pm 4$  °C). Posteriormente, as amostras foram filtradas a vácuo e transferidas para funis de separação, acrescentando-se 30 mL de éter de petróleo e 20 mL de água destilada. Em seguida, as fases inferiores foram descartadas e os resíduos foram lavados por mais duas vezes com 20 mL de água destilada, para remoção total da acetona. Os extratos restantes foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL e completados com éter de petróleo. A leitura da absorvância para as amostras foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o éter de petróleo como branco para calibração. O conteúdo de carotenoides totais foi expresso em  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/g da amostra avaliada, utilizando as Equações 11 e 12:

$$X(\mu\text{g}) = \frac{A \times y \text{ (ml)} \times 10^6 \times 10}{A^{1\%}_{1\text{cm}} \times 100}$$

(Eq.11)

$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{X (\mu\text{g})}{\text{Teor de sólidos (g)}}$$

(Eq.12),

Onde X é o peso ou a concentração do carotenoide, y é o volume do balão, A é absorvância em comprimento de onda especificado,  $A^{1\%}_{1\text{cm}}$  é o coeficiente de absorção do carotenoide no solvente utilizado (Para o  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo, a absorvância (A) a 450 nm o valor de  $A^{1\%}_{1\text{cm}}$  que deverá ser utilizado é de 2592). O valor  $10^6$  é para a conversão de g para  $\mu\text{g}$ , e o valor 100 é para converter o valor percentual de  $A^{1\%}_{1\text{cm}}$  para um valor centesimal, e 10 é o fator de diluição da solução.

### **3.6 Validação do método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para a quantificação do marcador capsantina no extrato líquido concentrado de *Capsicum chinense* Jacq.**

O método analítico utilizado para a quantificação do marcador capsantina no extrato líquido da *Capsicum chinense* Jacq., foi desenvolvido por MÍNGGUEZ-MOSQUERA e HORNERO-MÉNDEZ (1993), com adaptações.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) modelo e2695 (Waters<sup>®</sup>), equipado com bomba quaternária, e detector de arranjo de diodos PDA (Waters<sup>®</sup>). A análise de dados foi realizada utilizando o software Empower 2.0. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Promosil C18(4,6 mm de diâmetro interno x 250 mm de comprimento, tamanho de partícula de 5 µm, 100 Å), e pré coluna C18 (4 x 3,0 mm) Allcrom. A fase móvel foi constituída por acetona grau HPLC e água ultrapura, com fluxo gradiente de 1,5 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 29°C, sendo o volume de amostra injetado de 20µL. A detecção foi realizada em 450 nm, e o tempo de corrida foi de 30 minutos. Os solventes da fase móvel foram previamente filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm (Millipore) e degaseificados em banho de ultrassom.

As amostras do padrão de capsantina (Sigma Audrich<sup>®</sup>) foram preparadas com metanol grau HPLC, e foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore), antes de sua análise no cromatógrafo.

#### *3.6.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico (System suitability)*

A eficiência do sistema cromatográfico utilizado nas análises foi avaliada quanto à sua capacidade em fornecer resultados de exatidão e precisão aceitáveis. Os experimentos foram realizados antes da validação do método analítico desenvolvido, e conduzidos segundo as recomendações descritas no guia de validação de métodos analíticos e procedimentos para a indústria US-FDA (United States Food and Drug Administration, 2000). Os parâmetros de adequabilidade do sistema avaliados foram: fator de retenção (k); resolução (Rs); número de pratos teóricos (N); e fator de cauda (TF).

### 3.6.2 Validação do método analítico

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo os critérios estabelecidos na RDC 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e na Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014 (BRASIL, 2014). Os parâmetros avaliados para a validação do método proposto foram: Seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

#### 3.6.2.1 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação em uma amostra (BRASIL, 2014).

A seletividade do método foi determinada pela identificação do marcador capsantina, baseado na análise dos perfis cromatográficos, nos tempos de retenção e nos espectros de absorção na região do ultravioleta dos picos obtidos, tanto para o padrão de referência (0,007 mg/mL) quanto para a amostra do extrato líquido concentrado, nos quais 10,10 g do extrato líquido concentrado foram transferidos para um balão de 25 mL, sendo completado com acetona grau HPLC (404 mg/mL).

#### 3.6.2.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método é determinada por meio de sua capacidade em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do marcador na amostra analisada (BRASIL, 2014).

A linearidade do método para o marcador capsantina foi avaliada mediante a construção de uma curva analítica, relacionando a área média obtida por meio de três curvas diferentes, com a concentração de cada nível. Para tanto, uma solução mãe do padrão capsantina foi preparada, em triplicata, na concentração de 7,0 µg/mL, de maneira independente e em dias consecutivos. A partir da solução mãe obtida e por sucessivas diluições em metanol, a curva analítica foi construída, utilizando sete níveis de concentrações diferentes: 0,48; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8; 6,0; 7,2 µg/mL. Os resultados obtidos foram submetidos à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para obtenção da equação da reta, e a linearidade foi estimada por meio do coeficiente de correlação (r).

Para a determinação da linearidade da curva da capsantina presente no extrato líquido da pimenta *Capsicum chinense* Jacq., preparou-se em triplicata, uma solução mãe em concentração de 404 mg/mL. A partir de cada solução mãe e por sucessivas diluições em acetona, foi preparada uma curva analítica, utilizando as seguintes concentrações: 26,93; 67,33; 134,66; 269,33; 404 mg/mL. Os resultados obtidos foram submetidos à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para obtenção da equação da reta, e a linearidade foi estimada por meio do coeficiente de correlação (r).

### 3.6.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas), sendo expresso pelo desvio padrão relativo DPR (%). Para a avaliação da repetibilidade, foram preparadas seis soluções do extrato líquido de *Capsicum chinense* Jacq. a 100% da concentração do teste, isto é, na concentração de 270 mg/mL, utilizando acetona como solvente na diluição. As análises foram efetuadas em um mesmo dia, por um único analista. Na precisão intermediária, o procedimento de preparo e leitura das amostras foi realizado conforme descrito para a repetibilidade, entretanto efetuadas em dias diferentes e por analistas distintos.

Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo entre as amostras (DPR%), calculado de acordo com a equação 13:

$$\text{DPR (\%)} = \left( \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 13}),$$

Onde: DPR: Desvio padrão relativo entre as amostras; DP: Desvio padrão; CMD: Concentração média determinada.

### 3.6.2.4 Exatidão

O ensaio da exatidão foi avaliado em termos de recuperação do padrão, através do método de adição do padrão de referência, onde uma quantidade conhecida do padrão capsantina foi adicionada a uma quantidade também conhecida do extrato líquido de *Capsicum chinense* Jacq., em triplicata, utilizando três níveis de concentração: baixo (135mg/mL), médio (270 mg/mL) e alto (404 mg/mL), resultando em 9 determinações. A

exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a equação 14:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 14}),$$

#### 3.6.2.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir de pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas, em relação ao método original. Para tanto, os fatores testados foram: Temperatura do forno da coluna (28°C e 30°C) e taxa de fluxo da fase móvel (1,4 mL/min e 1,6 mL/min). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de soluções analisadas nas condições usuais descritas no método, por meio do coeficiente de variação (DPR%).

#### 3.6.2.6 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Partindo da equação da reta obtida pelo ensaio de linearidade para o padrão de referência, o LD e LQ da capsantina foram obtidos utilizando o cálculo da inclinação da curva analítica (IC), e do desvio padrão ( $\sigma$ ), conforme as seguintes equações:

$$\text{LD} = 3,3 \cdot \sigma / \text{IC} \quad (\text{Eq. 15}),$$

$$\text{LQ} = 10 \cdot \sigma / \text{IC} \quad (\text{Eq. 16}),$$

### 3.7 Quantificação da capsantina no extrato líquido concentrado de *Capsicum chinense* Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

Para a quantificação do teor de capsantina no extrato líquido de *Capsicum chinense* Jacq., 1,35 mg da amostra foram dissolvidas em 5 mL de acetona grau HPLC. Deixou-se em banho de ultrassom por 30 min. As amostras foram analisadas em CLAE de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.6. Todas as análises foram realizadas em sextuplicatas independentes.

### **3.8 Identificação da capsantina no pó da *Capsicum chinense* Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência**

As amostras foram preparadas em triplicata, com uma concentração de 200 mg/mL utilizando a matéria-prima vegetal pulverizada e acetona grau HPLC como diluente. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram filtradas, e passadas em membrana de 0,45 µm (Millex®), sendo colocadas em vials e submetidas à análise por CLAE, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 3.6.

### **3.9 Elaboração das formulações fitocosméticas**

#### *3.9.1 Delineamento de formulações*

Foram preparadas sete formulações cosméticas com diferentes bases galênicas, sendo 2 emulsões (P1 e P7), 3 géis-cremes (P2, P3, P5) e 2 géis (P4 e P6), utilizadas como excipiente na preparação do sérum, todas compostas pelo extrato líquido padronizado da pimenta *Capsicum chinense* Jacq., e por ingredientes previamente selecionados e avaliados, de acordo com as características físico-químicas e os atributos desejados para o produto final. A cuidadosa seleção dos ingredientes assim como suas concentrações foram fundamentais para definir a segurança e eficácia dos cosméticos. Dentre as sete formulações preparadas, apenas uma foi escolhida considerando-se os seguintes fatores:

- ✓ Físicos: Onde foram observadas as propriedades físicas tais como aspecto, cor, uniformidade, dentre outras;
- ✓ Químicos: Onde foram avaliadas a integridade da estrutura química, tendo as características físico-químicas (pH e densidade) como parâmetro;
- ✓ Sensoriais: A preferência dos consumidores por produtos cosméticos depende de várias propriedades das formulações, incluindo, odor, textura, espalhabilidade, aderência e oleosidade residual após a aplicação.

### 3.9.2 Preparação das formulações

Para o presente trabalho, preparou-se duas formulações cosméticas de sêrum em forma de gel, a partir do SIMULGEL™ EG (Acrilato de Sódio / Copolímero de Acrilonildimetil Taurato de Sódio / Isohexadecano / Polissorbato 80), um polímero líquido pré-neutralizado que pode ser utilizado em processos quentes ou frios. Dentre as duas formulações elaboradas, em uma foi incorporado o extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., na outra formulação denominada Controle manteve-se apenas a base cosmética sem a adição do extrato líquido padronizado. Na Tabela 4, estão descritos os componentes utilizados para a produção do teste piloto do cosmético, bem como suas respectivas concentrações percentuais e funções (BRASIL, 2007; European Commission Health and Consumers, 2018).

**Tabela 4:** Composição química das formulações cosméticas Sérum gel pimenta Biquinho e Controle.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (%)		FUNÇÃO
	Sérum gel Pimenta Biquinho	Controle	
<b>FASE A</b>			
Isononanoato de etil-hexilo	5,000	5,000%	Emoliente
Acrilato de Sódio / Copolímero de Acrilonildimetil Taurato de Sódio / Isohexadecano / Polissorbato 80	4,500	4,500%	Estabilizante de textura
Ciclopentasiloxano / Dimeticone Crosspolimero	30,000	30,000%	Formador de filme de toque seco
<b>FASE B</b>			
Água	14,370	19,870%	Solvente
Propilenoglicol	13,500%	13,500%	Umectante
Hidroxiacetofenona	0,500%	0,500%	Calmante
Triglicerídes do Ácido Cáprico Caprílico	2,500%	2,500%	Condicionante
Pentaeritrilo Tetra-di-t-butilhidroxihidrocinnamato	0,100%	0,100%	Antioxidante da fórmula
Álcool	0,200%	0,200%	Solvente
<b>FASE C</b>			
Extrato líquido de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	5,500% (0,062% de capsantina)	-----	Antioxidante para a pele
Caprilato de propilheptil	2,000%	2,000%	Emoliente
Hialuronato de Sódio / Fenoxietanol / Metilparabeno / Propilparabeno	3,000%	3,000%	Formador de filme
Glicereth-7 Triacetato	2,500%	2,500%	Emoliente
Acetato Cetílico / Álcool de lanolina acetilado	2,000%	2,000%	Emoliente
Esqualano	1,000%	1,000%	Emoliente
<b>FASE D</b>			
Água / Hexapeptídeo Acetílico-8 / Fenoxietanol / Metilparabeno / Etilparabeno / Butilparabeno / Propilparabeno	5,000%	5,000%	Condicionante
Pentapeptídeo-18 / Caprililglicol / Glicerina	4,000%	4,000%	Condicionante
PCA sódico	1,500%	1,500%	Hidratante
Carbonato de Dipropil Heptil	2,000%	2,000%	Emoliente
Essência	0,750%	0,750%	Perfume/Fragrância
Metilcloroisotiazolinona / Metilisotiazolinona	0,080%	0,080%	Conservante

**Legenda:** Controle: Cosmético sem o extrato padronizado; (-----)- Matéria-prima que não foi incorporada ao cosmético.

Os cosméticos foram preparados seguindo o método descrito a seguir:

- Os componentes da fase A foram adicionados em um béquer, e agitados com agitador mecânico até completa homogeneização, à temperatura ambiente.

- Em outro béquer, foram adicionadas as seguintes matérias primas da fase B: Água, Propilenoglicol, Hidroxiacetofenona e Álcool. Em seguida esta mistura foi aquecida a 50 °C, com agitação manual até completa solubilização. Posteriormente resfriou-se a mistura até uma temperatura de 25°C.

- Em um terceiro béquer, foram adicionadas as seguintes matérias primas da fase B: Triglicérides do ácido Cáprico Caprílico e Pentaeritríto Tetra-di-t-butilhidroxihidrocínato. Em seguida esta mistura foi aquecida a 100 °C, com agitação mecânica até completa solubilização. Posteriormente resfriou-se a mistura até uma temperatura de 25°C.

- Misturou-se os componentes da fase B com a fase A, sob agitação com agitador mecânico, até total homogeneização.

- Por fim, adicionou-se as fases C e D sobre a mistura fase A + B, sob agitação com agitador mecânico, até total homogeneização à temperatura ambiente.

- O pH das formulações cosméticas foi aferido, e os valores encontravam-se na faixa entre 5,5 e 6,5. Os cosméticos foram mantidos em repouso por 24 horas, à temperatura ambiente, e posteriormente foram avaliadas suas características organolépticas e físico-químicas.

A elaboração das duas formulações cosméticas, teve como propósito principal, avaliar *in vivo* a eficácia anti-aging e a apreciabilidade do cosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., mediante a um teste comparativo com o respectivo cosmético controle (placebo), cujo extrato líquido padronizado não foi incorporado à sua formulação.

### 3.9.3 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação produz um estresse na amostra simulando um aumento na mobilidade das partículas antecipando possíveis instabilidades (BRASIL, 2004).

Antes de iniciar os estudos de estabilidade, o fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. e o cosmético controle, foram submetidos ao teste de centrifugação, onde, cerca de 5 g das amostras foram centrifugadas em centrífuga Daiki<sup>®</sup>, com um ciclo de 3.000 rpm durante um período de 30 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram analisadas visualmente, a fim de serem observadas possíveis precipitações, separações de fases, formações de “cakings”, coalescências entre outras alterações. A não ocorrência de alterações nos produtos centrifugados indicou que os mesmos poderiam ser submetidos aos testes de estabilidade acelerada, sem necessidade de reformulação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **3.10 Estudo de estabilidade acelerada do extrato líquido padronizado de *Capsicum chinense* Jacq. e das formulações cosméticas**

Tanto o extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. quanto as formulações cosméticas desenvolvidas, foram submetidas à testes para a comprovação de suas respectivas estabilidades. O estudo da estabilidade fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito, desde sua fabricação até o término de sua validade. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto (BRASIL, 2004).

O estudo de estabilidade foi conduzido segundo critérios propostos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004), com adaptações.

#### **3.10.1 Determinação das características físico-químicas e organolépticas**

Para a avaliação das características organolépticas das amostras submetidas ao teste de estabilidade, foram analisados os seguintes parâmetros: aspecto, cor e odor. Também foram observadas alterações como: precipitação, separação de fases e formação de caking. O aspecto e a cor das amostras foram analisados visualmente sob condições de luz branca natural e artificial. O odor foi avaliado diretamente no produto, através do olfato. Os resultados foram obtidos por comparação com as amostras padrão de referência, sendo estas os primeiros protótipos produzidos para o Sérum gel pimenta biquinho (protótipo P6) e para o cosmético Controle.

O pH foi analisado por potenciometria, utilizando um equipamento digital portátil microprocessado modelo MPA-210 (Ádamo), previamente calibrado com soluções tampão 7,0 e 4,0. A densidade foi determinada pelo método picnométrico, utilizando um picnômetro em aço inox 304, de 25 mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### *3.10.2 Ciclos de Congelamento e Descongelo*

Em frasco de vidro neutro, transparente, e com tampa vedada, cerca de 50g das amostras foram intercaladas em estufa a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  e freezer a  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ , a cada 24 horas por um período de 12 dias, totalizando seis ciclos. As avaliações das amostras em estudo foram realizadas diariamente, segundo suas características físico-químicas e organolépticas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

### *3.10.3 Estudo de estabilidade acelerada*

Em frasco de vidro neutro, transparente, e com tampa vedada, cerca de 50g das amostras, foram acondicionadas em condições diferentes de temperatura, tais como, ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), Estufa ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e geladeira ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ), durante um período de 90 dias sendo monitoradas periodicamente. Todas as amostras, em triplicata, foram avaliadas durante os intervalos de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias para verificar possíveis alterações nas características organolépticas (aspecto, cor e odor) e físico-químicas (pH e densidade).

### *3.10.4 Critérios utilizados para aprovação das amostras submetidas ao estudo de estabilidade*

As interpretações dos resultados obtidos durante o estudo da estabilidade das amostras obedeceram aos critérios estabelecidos pelo formulador. As amostras foram analisadas em comparação aos padrões de referência, sendo estes os primeiros protótipos produzidos para o Sêrum gel pimenta biquinho (protótipo P6) e para o cosmético Controle. Os critérios adotados para a avaliação dos resultados obtidos ao longo do estudo de estabilidade foram (BRASIL, 2004):

✓ Aspecto: as amostras aprovadas mantiveram-se íntegras durante todo o teste em relação aos seus aspectos iniciais, em todas as condições a que foram

submetidas, mesmo em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos em que pequenas alterações são aceitáveis;

✓ Cor e odor: pequenas alterações na cor e no odor das amostras foram aceitas em temperaturas elevadas ou muito baixas;

✓ Valor de pH: Amostras com leves modificações no pH, com variações de até  $\pm 10\%$ ;

✓ Densidade: amostras com leves modificações, que não comprometeram a percepção visual das amostras e o volume ocupado por elas.

### **3.11 Análise cromatográfica da capsantina no fitocosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado de *Capsicum chinense* Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência**

As amostras foram preparadas a partir do fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, em triplicata, com uma concentração de 400 mg/mL utilizando acetona como diluente. Antes de serem analisadas no cromatógrafo, as amostras foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex®), sendo colocadas em vials e submetidas à análise por CLAE, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.6.

### **3.12 Determinação da atividade antioxidante total *in vitro* da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético obtidos a partir da *Capsicum chinense* Jacq.**

#### *3.12.1 Obtenção das soluções extrativas a partir da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho*

Soluções extrativas foram preparadas na concentração de 200 mg/mL para a matéria-prima vegetal, 100 mg/mL para o extrato líquido padronizado e 600 mg/mL para o fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, utilizando álcool etílico 96°GL como solvente extrator. Em seguida, os balões contendo as misturas foram deixados em banho de ultrassom por 30 minutos, e seus conteúdos foram filtrados em funil de polietileno, utilizando papel de filtro qualitativo.

### 3.12.2 *Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH*

A determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), foi conduzida conforme metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) com adaptações. O método baseia-se na captura do radical livre DPPH por agentes antioxidantes existentes na amostra, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm (BRASIL, 2007a).

A partir das soluções extrativas obtidas, foram preparadas em tubos de ensaio cinco diluições diferentes, em triplicata, para cada solução. Em ambiente escuro, foram transferidas alíquotas de 20 µL;40 µL;60 µL;80 µL e 100 µL de cada solução extrativa para tubos de ensaio contendo 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM), preparado no dia da análise, completando o volume final para 4,0mL com álcool metílico. Posteriormente, os tubos de ensaio com o conteúdo foram homogeneizados em vórtex e deixados em repouso por um período de 30 minutos. Após repouso de 30 minutos, fez-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 515nm para efetuar o cálculo do IC<sub>50</sub>. Foram utilizados 100 µL da solução de álcool metílico com 3,9 mL da solução de DPPH como o controle final, e utilizou-se o álcool metílico como branco.

Para a construção das curvas analíticas, em ambiente escuro, foram transferidas alíquotas de aproximadamente, 4 mL de cada solução de DPPH (nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/mL) para cubetas de vidro e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Utilizou-se álcool metílico, como branco, para zerar o espectrofotômetro. Posteriormente foram plotadas as concentrações de DPPH no eixo X e as respectivas absorvâncias no eixo Y, onde a equação da reta foi então calculada.

O Cálculo da atividade antioxidante foi feita, com base nas curvas analíticas de captura do DPPH pelas soluções extrativas, onde a partir das equações das retas obtidas pôde-se estimar as quantidades de amostras necessárias para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e para a avaliação dos resultados obtidos na construção da curva analítica, foi realizada análise de regressão linear, calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r).

### 3.12.3 Determinação da atividade antioxidante total no Sistema $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico

A determinação da atividade antioxidante total no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, foi conduzida conforme metodologia descrita por MILLER (1971), com adaptações. É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm, baseado na leitura referente à oxidação do  $\beta$ -caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (BRASIL, 2006).

A partir das soluções extrativas descritas no item 3.13.1, obtidas utilizando a matéria-prima vegetal e o extrato líquido padronizado, foram preparadas três diluições em concentrações de 0,10 mg/mL; 0,20 mg/mL e 0,30 mg/mL, empregando o álcool etílico 96°GL como diluente. Para a avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético não foi necessário realizar a diluição de sua solução extrativa.

Para a determinação da atividade antioxidante, preparou-se a solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico em erlenmeyer, revestido com papel alumínio, através da adição de 40  $\mu$ L de ácido linoléico, 530  $\mu$ L de Tween 40 e 50  $\mu$ L da solução  $\beta$ -caroteno em 1 mL de clorofórmio. A solução obtida foi homogeneizada e o clorofórmio foi, então, evaporado com auxílio de um aparelho oxigenador. Posteriormente adicionou-se água destilada, pré-tratada com oxigênio, até que fosse obtida uma absorbância entre 0,6 nm e 0,7 nm a 470 nm. Foram transferidas alíquotas de 5 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, para diferentes tubos de ensaio contendo 0,4 mL das amostras diluídas e soluções extrativas, anteriormente preparadas. Para controle negativo foram utilizados 5 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, e para controle positivo utilizou-se 0,4 mL da solução de trolox (200 mg/L). Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e mantidos em banho-maria a 40°C. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 470 nm, onde a primeira leitura foi efetuada após 2 minutos de preparada a mistura, e posteriormente em intervalos de quinze minutos até o tempo final 120 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e para zerar o espectrofotômetro utilizou-se água destilada como branco. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da oxidação.

### 3.12.4 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>:

A atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), foi conduzida segundo metodologia descrita por RE (1999) e modificado por KUSKOSKI *et al.* (2004). O método basea-se na habilidade que os antioxidantes possuem em capturar o cátion ABTS<sup>•+</sup>, promovendo a perda da coloração do meio reacional.

A partir das soluções extrativas descritas no item 3.13.1, obtidas utilizando a matéria-prima vegetal e o extrato líquido padronizado, foram preparadas cinco diluições em concentrações de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mg/mL, empregando o álcool etílico 96°GL como diluente. Para a avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético não foi necessário realizar a diluição de sua solução extrativa.

Para a determinação da atividade antioxidante, o radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado a partir da reação de 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) e 88 µL de solução aquosa de persulfato de potássio a 140 mM. A mistura permaneceu no escuro, a temperatura ambiente, por 16 horas e posteriormente foi diluída em 1 mL de etanol, a fim de que fosse obtida uma absorbância de 0,7 nm ( $\pm 0,05$ ) a 734 nm em espectrofotômetro. Foi utilizado o álcool etílico como branco.

A solução padrão de trolox (2 mM) foi preparada dissolvendo-se 25 mg de Trolox em álcool etílico até completar o volume para 50 mL, em balão volumétrico. A partir da solução padrão de trolox (2 mM), foram preparadas soluções de 100, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µM. Alíquotas de 30 µL, das cinco concentrações das soluções de trolox, das amostras diluídas e soluções extrativas, separadamente, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3,0 mL da solução resultante do radical ABTS<sup>•+</sup>. Posteriormente, as amostras contidas nos tubos foram homogeneizadas em vortex, e a leitura da absorbância foi realizada 6 minutos após a adição do radical, a um comprimento de onda de 734 nm, utilizando álcool etílico como branco para zerar o espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A partir das concentrações de trolox e as respectivas absorbâncias, a equação da reta foi obtida e utilizada para calcular a absorbância referente a 1.000 µM de trolox. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições das amostras, plotou-se uma curva analítica das concentrações em função das absorbâncias. Determinou-se, então, a

equação da reta que foi utilizada para calcular a atividade antioxidante, substituindo a absorvância equivalente a 1000 µM do padrão.

### **3.13 Avaliação subjetiva da eficácia clínica anti-aging, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica**

A eficácia clínica anti-aging das fórmulações cosméticas foram determinadas por avaliação médica subjetiva dos participantes voluntários, para comparação da condição antes e após tratamento, baseada em escalas relatadas na literatura (BAZIN; DOUBLET (2007); TSUKAHARA et al., 2000). Os estudos foram realizados pelo laboratório IPclin Instituto de Pesquisa Integrada Ltda, de acordo com protocolos aprovados por Comissão de Ética Médica, seguindo os preceitos da Declaração de Helsinque e da Resolução 466/12 (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 2012), com número de parecer substanciado do CEP 2.841.563 (Anexos 1 e 2).

#### *3.13.1 Seleção de voluntários*

Durante as pesquisas de eficácia clínica subjetiva para avaliação do efeito anti-aging com apreciabilidade cosmética do Sérum gel pimenta biquinho e do cosmético controle, foram selecionadas 66 voluntárias com idades entre 35 a 65 anos, sendo 33 participantes por produto avaliado, fototipos I a IV (FITZPATRICK), sexo feminino, com pele da face íntegra e com presença de rugas no momento do exame inicial.

#### *3.13.2 Critérios de inclusão de voluntários*

No processo seletivo dos voluntários para este estudo, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- ✓ Idade de 35 a 65 anos;
- ✓ Presença de rugas na face;
- ✓ Estar em condições saudáveis, correspondentes aos requisitos pré-definidos pelo médico responsável;
- ✓ Pele íntegra na região do teste (face);

- ✓ Usuário ocasional de produtos da categoria;
- ✓ Fototipo de I a IV segundo a classificação de Fitzpatrick;
- ✓ Inexistência de históricos de irritação e/ou alergia ao material utilizado em estudo;
- ✓ Concordância em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido;
- ✓ Pessoas que queiram participar da pesquisa por livre e espontânea vontade, sem lucro financeiro, sendo somente ressarcidos os custos de transporte e alimentação.

### *3.13.3 Critérios de não inclusão / exclusão de voluntários*

Os critérios de não inclusão / exclusão de voluntários, indica o subgrupo de indivíduos que, embora preencha os critérios de inclusão, também apresenta características ou manifestações que podem interferir na qualidade dos dados, assim como na interpretação dos resultados. No processo seletivo de voluntários, foram utilizados os seguintes critérios de não inclusão / exclusão:

- ✓ Doenças de pele: vitiligo, psoríase, lúpus, dermatite atópica;
- ✓ Marcas cutâneas na área experimental que interfiram na avaliação de possíveis reações cutâneas (distúrbios da pigmentação, malformações vasculares, cicatrizes, aumento de pilosidade, efélides e nevus em grande quantidade, queimaduras solares);
- ✓ Dermatoses ativas (local e disseminada) que possam interferir nos resultados do estudo;
- ✓ Gestantes ou lactantes;
- ✓ Antecedentes de reações alérgicas, irritação ou sensações de desconforto intensas à categoria de produto testada;
- ✓ Participantes com histórico de alergia ao material utilizado no estudo;
- ✓ Antecedentes de atopia;
- ✓ Portadores de imunodeficiências;

- ✓ Transplantados renais, cardíacos ou hepáticos;
- ✓ Exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento até 15 dias antes da avaliação inicial;
- ✓ Uso dos seguintes medicamentos de uso tópico sistêmico: Imunossupressores, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais, e corticoides até duas semanas antes da seleção;
- ✓ Tratamento com vitamina A ácida e/ou seus derivados via oral ou tópica até 01 mês antes do início do estudo;
- ✓ Vacinação até 03 semanas antes do estudo;
- ✓ Estar participando de outro estudo;
- ✓ Qualquer condição não mencionada acima que, na opinião do investigador, possa comprometer a avaliação do estudo;
- ✓ Histórico de ausência de aderência ou de indisposição em aderir ao protocolo de estudo;
- ✓ Profissionais diretamente envolvidos na realização do presente protocolo e seus familiares.

#### 3.13.4 *Produtos avaliados*

Os produtos cosméticos avaliados foram um sérum em forma de gel constituído por extrato padronizado da *Capsicum chinense* Jacq. sendo denominado Sérum gel pimenta biquinho, e outro sérum em forma de gel constituído somente pela base galênica do cosmético, sendo este denominado Controle. Uma amostra de cada produto foi armazenada e mantida no laboratório IPclin<sup>®</sup> por um período de 1 mês, após o tempo de estudo. Os participantes utilizados na avaliação de cada um dos produtos foram escolhidos de forma aleatória obedecendo somente aos critérios de não inclusão / exclusão de voluntários.

#### 3.13.5 *Aplicação do produto*

Para as avaliações de aceitabilidade dermatológica, apreciabilidade cosmética e eficácia clínica anti-aging, o produto foi aplicado pelos próprios participantes, em sua

residência e segundo o modo de uso informado pelo Patrocinador. O produto foi utilizado pelos participantes da pesquisa durante  $30 \pm 2$  dias. O objetivo e a metodologia da pesquisa foram esclarecidos para os voluntários e estes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Os participantes utilizados nos experimentos foram escolhidos de forma aleatória.

### 3.13.6 Avaliações

#### 3.13.6.1 Avaliação da Eficácia Clínica Subjetiva Anti-aging

Para a avaliação da eficácia clínica dos produtos cosméticos, foram avaliados no início e após os  $30 \pm 2$  dias de uso do produto em domicílio, os seguintes parâmetros:

- ✓ Rugas tipo pé-de-galinha - Classificado de acordo com o atlas BAZIN; DOUBLET (2007).
- ✓ Sulcos nasolabiais (Skin aging ATLAS, volume 1)
- ✓ Rugas na testa - Classificado de acordo com: TSUKAHARA et al., 2000.
- ✓ Elasticidade, firmeza e hidratação - Classificado como: 1 = muito hidratada/firme/elástica; 2 = hidratada/firme/elástica; 3 = pouco hidratada/firme/elástica; 4 = muito pouco hidratada/firme/elástica.

#### 3.13.6.2 Avaliação da Apreciabilidade Cosmética (Opinião dos participantes da pesquisa)

Para a avaliação da apreciabilidade cosmética, as voluntárias responderam a um questionário após os  $30 \pm 2$  dias de uso do produto em domicílio, referente aos seguintes parâmetros:

- ✓ Com o uso do produto, você percebeu sua pele mais hidratada? Classificação: S = Sim; N = Não.
- ✓ Com o uso do produto, você percebeu sua pele menos flácida? Classificação: S = Sim; N = Não.
- ✓ Com o uso do produto, você percebeu que as rugas e linhas de expressão da face diminuíram? Classificação: S = Sim; N = Não.

✓ Com o uso do produto, você sentiu a pele mais forte e firme? Classificação: S = Sim; N = Não.

✓ Com o uso do produto, você sentiu melhora nos sinais de envelhecimento? Classificação: S = Sim; N = Não.

✓ Com o uso do produto, você sentiu que ocorreu a prevenção de novas rugas e linhas de expressão? Classificação: S = Sim; N = Não.

✓ Você compraria esse produto? Classificação: S = Sim; N = Não.

### **3.14 Análise Estatística**

Os testes de estabilidade acelerada, os testes de ciclos de congelamento/descongelamento e a avaliação subjetiva da eficácia clínica anti-aging com apreciabilidade cosmética, foram avaliados estatisticamente através do software RStudio versão 3.4.0 (2017-04-21), utilizando a análise de variância ANOVA com avaliação de dados pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) com um intervalo de confiança de 95%, e o teste U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### 4.1 Aquisição e preparo da matéria-prima vegetal

A princípio foram adquiridos 35,235 kg dos frutos da pimenta biquinho, após o processo de desidratação em estufa a 45 °C por um período de 10 dias, o peso foi reduzido para 5,280 kg, ocorrendo uma perda de 85% em relação à sua massa inicial. Posteriormente, os frutos desidratados foram pulverizados em moinho de facas e martelos, e seu peso final foi reduzido para 4,480 kg. Deste modo o rendimento total para o preparo da matéria-prima vegetal, a partir dos frutos frescos, foi de 12,71% sobre o peso da matéria-prima vegetal na forma de pó (Figura 11).

**Figura 11:** (A) Frutos da pimenta *C. chinense* Jacq. desidratados; (B) Frutos desidratados pulverizados.



**Fonte:** O autor.

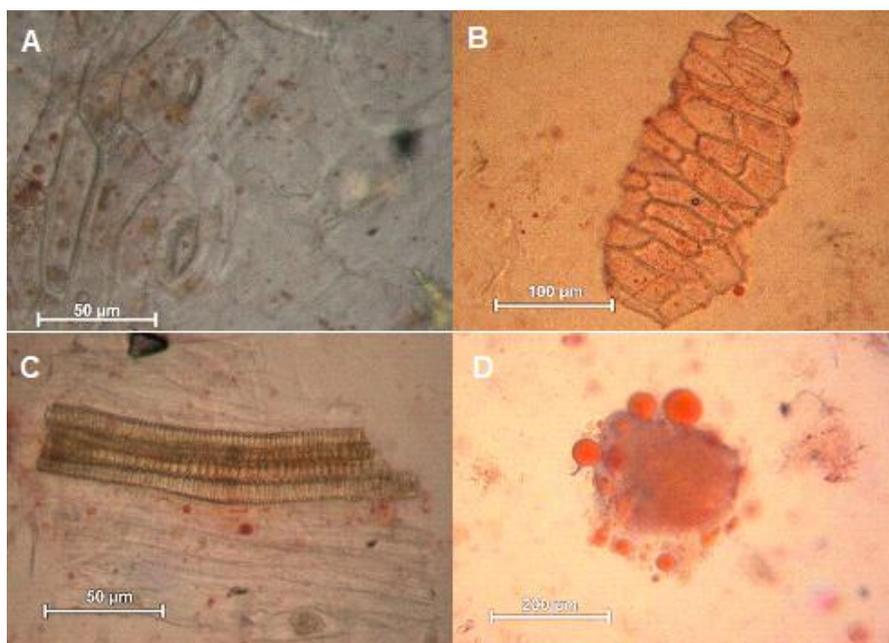
Ainda que tenha ocorrido perda de matéria-prima vegetal, a secagem da pimenta é um processo necessário visto que auxilia na conservação dos frutos, proporciona estabilidade dos compostos químicos e dos componentes aromáticos, protege contra a degradação enzimática e oxidativa, permitindo a redução do peso e a economia de energia para manter a matriz vegetal conservada (PARK; YADO; BROD, 2001).

## 4.2 Caracterização e Controle de Qualidade do pó da *Capsicum chinense* Jacq.

### 4.2.1 Análise microscópica da matéria-prima vegetal pulverizada

Na análise microscópica da matéria-prima vegetal pulverizada notou-se a presença de estômatos (Fig. A); fragmento de epiderme (Fig. B); fragmento vascular (Fig. C) material lipídico (Fig. D).

**Figura 12:** Fotomicrografia do pó do fruto seco da pimenta *C. chinense* jacq. evidenciadas pelo reagente de Steinmetz.



**Nota:** Estruturas presentes na matéria-prima pulverizada de *C. chinense* jacq: Estômatos (Fig. A); fragmento de epiderme (Fig. B); fragmento vascular (Fig. C); material lipídico (Fig. D).

**Fonte:** O autor

A técnica de análise microscópica permite o estudo da natureza íntima dos vegetais, ou seja, de suas células, tecidos, órgãos e microestruturas em geral. O controle de qualidade da droga vegetal deve ser realizado precedendo ao seu uso, e envolve análise macro e microscópica como primeira etapa para estabelecer a autenticidade, a identidade e avaliar o grau de pureza da amostra analisada (CHOI et al., 2002).

### 4.2.2 Determinação da perda por dessecação

O teor de perda por dessecação encontrado na matéria-prima vegetal obtida a partir da pimenta *C. chinense* Jacq. foi de 4,62%. O método consiste na determinação de substâncias voláteis de qualquer natureza, eliminados em condições específicas para o

ensaio (BRASIL, 2010). Mesmo após o processo de desidratação as matérias primas vegetais demonstram uma tendência em manter retida certa quantidade de água, podendo acarretar na degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. Portanto, faz-se necessário adotar o ensaio de determinação da perda por dessecação como um índice de qualidade e conservação, uma vez que o baixo conteúdo de umidade na droga vegetal indica que houve eficiência durante o processo de secagem e que o material é estável (BRASIL, 2014; COUTO *et al.*, 2009).

A Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> ed. (2010) estabelece que o teor de perda por dessecação para drogas vegetais deve apresentar um valor máximo na faixa entre 6 a 15%. Segundo SILVA (2017) o teor de umidade encontrado foi de 5,50%, porém seu estudo foi realizado com o farelo da pimenta biquinho, desidratada em estufa de circulação de ar forçada a uma temperatura de 65 °C por 48 horas. No presente estudo o teor de perda por dessecação encontra-se dentro do limite especificado, indicando que o processo de secagem foi eficiente e que a matéria-prima vegetal não estava propensa ao desenvolvimento de microorganismos e instabilidades químicas (WHO, 1998).

#### 4.2.3 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais é um método aplicado para quantificar substâncias inorgânicas não voláteis e pode ser utilizada, como parâmetro de controle de qualidade, evidenciando falsificações ou adulterações. Deste modo, a droga vegetal carbonizada à altas temperaturas converte toda a sua matéria orgânica em dióxido de carbono, restando apenas compostos minerais na forma de cinzas (FARIAS, 2010; BRASIL, 2014).

O resultado obtido para o teor de cinzas totais neste trabalho foi de 6,34%. A Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> ed. (BRASIL, 2010) estabelece que o teor máximo de cinzas totais aceitáveis para drogas vegetais, encontra-se na faixa entre 2 e 20%, conforme descrito nas monografias. SILVA (2017), obteve teor de cinzas de 6,62% para o farelo obtido a partir da pimenta biquinho. REIS (2015), avaliando as características físico-químicas dos frutos da pimenta biquinho, encontrou um teor de cinzas igual a 1,17% para os frutos *in natura*. Deste modo, o resultado obtido no presente trabalho encontra-se dentro da faixa estabelecida nos compêndios, estando abaixo do valor determinado por SILVA (2017) demonstrando que a matéria-prima vegetal analisada, apresentou uma

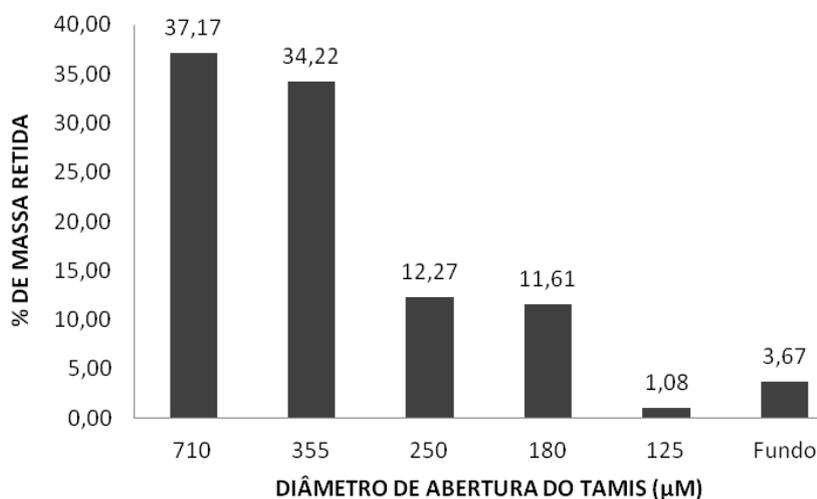
pureza maior do que o encontrado na pesquisa citada, uma vez que quanto menor for o valor encontrado para o teor de cinzas totais, menor será o indicativo de substâncias inorgânicas não voláteis na amostra analisada.

#### 4.2.4 Determinação da granulometria do pó

A granulometria é um método que está diretamente relacionado com a eficiência do processo extrativo, uma vez que partículas muito finas impedem a absorção do líquido extrator e diminuem a eficiência da extração, já partículas de alta granulometria não apresentam grande superfície de contato, também diminuindo a eficiência (PÉRTILE, 2007).

A distribuição granulométrica do pó obtido a partir dos frutos desidratados de *Capsicum chinense* Jacq. (pimenta biquinho), permitiu classificá-lo como pó grosso, uma vez que a maioria de suas partículas passou pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu\text{m}$  e menos de 40% passaram pelo tamis com abertura nominal de malha de 355  $\mu\text{m}$  (BRASIL, 2010) (Figura 13).

**Figura 13:** Distribuição granulométrica das partículas do pó obtido a partir da *Capsicum chinense* Jacq.



**Fonte:** Próprio autor.

A distribuição granulométrica do pó obtido a partir dos frutos desidratados de *Capsicum chinense* Jacq., mostrou-se adequado para o processo de extração, tendo as características necessárias para evitar a formação de canais preferenciais ou

empacotamento da amostra durante o processo de percolação, visto que matérias-primas vegetais com partículas muito finas não são consideradas as mais adequadas para o processo de extração, devido a formação de canais preferenciais, dificultando a difusão do solvente no material vegetal (MARQUES; VIGO, 2009).

#### 4.2.5 Determinação do Índice de intumescência

O índice de intumescência informa sobre o comportamento de um material vegetal ao ser misturado com um agente intumescente, e este ensaio permite definir o volume de solvente que será utilizado durante o processo de percolação (WHO, 1998; COUTO *et al.*, 2009).

O índice de intumescência encontrado para o pó de *C. chinense* Jacq. utilizando etanol 96°GL como agente intumescedor, foi de  $1,27 \pm 0,12$  mL por grama de amostra. Este resultado sugere que a matéria-prima vegetal analisada apresenta em sua composição polissacarídeos como, por exemplo, mucilagens, que se caracteriza pelo aumento do volume ocupado pela amostra quando o solvente é adicionado (WHO, 1998).

### 4.3 Obtenção do extrato líquido a partir do pó da pimenta *Capsicum chinense* Jacq.

O extrato líquido obtido a partir do pó da *Capsicum chinense* Jacq., foi elaborado por processo extrativo denominado percolação. No processo de extração por percolação o solvente passa através da camada porosa do material vegetal em leito fixo, extraíndo as substâncias solúveis. Em geral, uma passagem apenas pela amostra não é suficiente para obter um bom rendimento, por isso faz-se necessário reciclar o solvente por mais vezes para enriquecer ao máximo a solução extrativa nos compostos que se deseja extrair (NAVIGLIO *et al.*, 2007). A percolação é um método simples realizado à temperatura ambiente, por isso, utilizá-lo como método extrativo é vantajoso se comparado a outros processos de extração, por apresentar menor risco de reações químicas, com conseqüente formação de artefatos resultantes da ação combinada entre solventes e altas temperaturas (NAVARRO, 2005).

O solvente utilizado no processo de extração por percolação foi o etanol 96°GL, e sua escolha fundamentou-se na polaridade e solubilidade do marcador capsantina, visto

que as diferentes classes de compostos existentes nas plantas apresentam diferentes polaridades, fato que possibilita selecionar e extrair a substância ou classe de substâncias de interesse dependendo do solvente extrator escolhido (MACIEL *et al.*, 2002). As xantofilas tais como a capsantina possuem caráter mais polar que os carotenos, já que suas moléculas são constituídas por átomos de oxigênio, por isso são solúveis em solventes mais polares, como os álcoois (etanol, metanol) (KOPEC *et al.*, 2012; BROWN, 1935).

O etanol é um solvente amplamente utilizado na obtenção de extratos líquidos para a aplicação na indústria farmacêutica e cosmética. A presença do etanol favorece a extração de substâncias de polaridade intermediária devido a sua baixa constante dielétrica e por sua estrutura molecular com propriedade anfifílica, sendo constituída por uma parte hidrofílica (hidroxila) e uma parte hidrofóbica (cadeia carbônica) (DE MEDEIROS e KANIS, 2010; MORESCO, 2013)

O solvente extrator escolhido foi considerado adequado para a extração da capsantina, uma vez que a literatura estabelece a sua solubilidade em solventes orgânicos, tais como etanol, metanol, acetona e clorofórmio (GANGOLLI, 2005; HIRASA e TAKEMASA, 1998).

Após a maceração dinâmica por 24 horas, o extrato líquido obtido a partir do pó da *Capsicum chinense* Jacq., foi submetido ao processo de percolação sendo posteriormente concentrado em equipamento de ventilação forçada. O rendimento do extrato líquido concentrado obtido foi de 10 %, onde 20 L do extrato líquido percolado e macerado foram reduzidos à 2 L após sua concentração por ventilação forçada (Figura 14).

**Figura 14:** Extrato líquido concentrado de *C. chinense* Jacq.



Fonte: Próprio autor.

#### **4.4 Caracterização físico-química do extrato líquido concentrado obtido a partir do pó da *Capsicum chinense* Jacq.**

A caracterização físico-química do extrato líquido da pimenta *Capsicum chinense* Jacq. foi realizada segundo parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 5:

**Tabela 5:** Caracterização físico-química do extrato de *C. chinense* Jacq.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultados</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>CV (%)</b>
Teor de sólidos (%)	19,16	1,03	5,35
pH	3,70	0,058	1,56
Densidade relativa (g/mL)	1,040	0,0014	0,13
Viscosidade (cP)	3,25	0,025	0,78

Legenda: pH: Potencial hidrogeniônico; cP: Centipoise; CV: Coeficiente de variação.

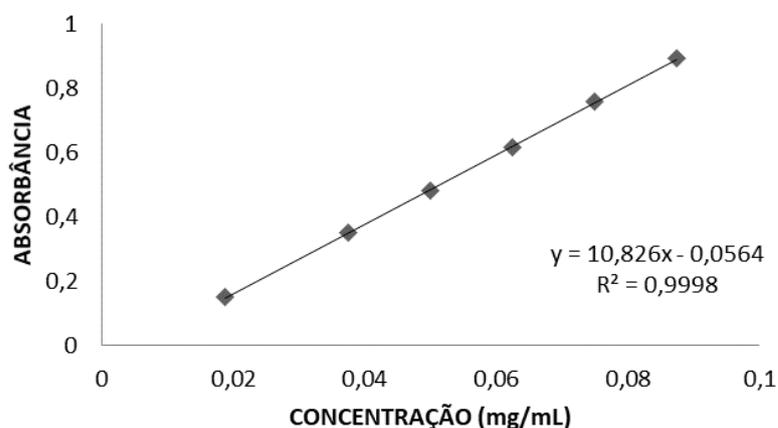
A avaliação das propriedades físico-químicas do extrato líquido concentrado se faz necessária, uma vez que estes dados podem fornecer informações úteis sobre a padronização da amostra, garantindo a qualidade bem como suas condições de segurança e reprodutibilidade dos efeitos terapêuticos (KLEIN *et al.*, 2009).

## 4.5 Doseamento de fenóis, flavonoides e carotenoides totais no pó e no extrato líquido concentrado da *Capsicum chinense* Jacq.

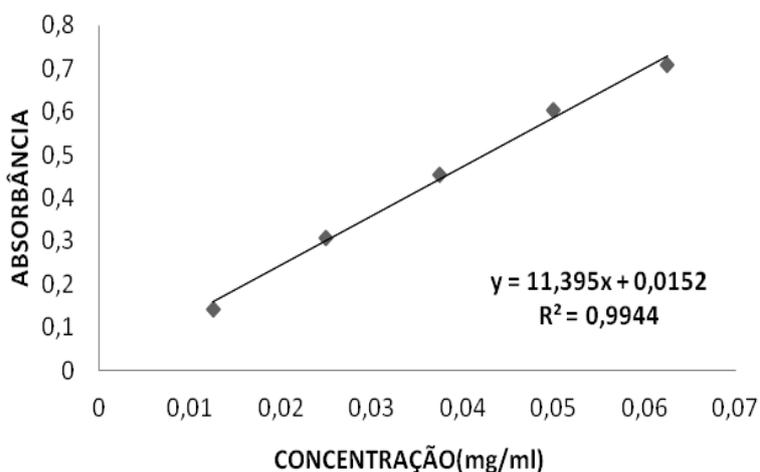
### 4.5.1 Doseamento de fenóis totais

A determinação da concentração de fenóis totais na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado, obtidos a partir da *Capsicum chinense* Jacq., foram feitas com base na equação da reta originada a partir da curva padrão de ácido tânico construída correlacionando a concentração da amostra (mg/mL) com as absorbâncias analisadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 510 nm (Figuras 15 e 16).

**Figura 15:** Curva padrão de ácido tânico para determinação do teor de fenóis totais na matéria-prima vegetal de *C. chinense* Jacq.



**Figura 16:** Curva padrão de ácido tânico para determinação do teor de compostos fenólicos totais no extrato líquido concentrado de *C. chinense* Jacq.



A concentração de fenóis totais encontrados na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado da *C. chinense* Jacq., estão descritos na Tabela 6:

**Tabela 6:** Conteúdo de fenóis totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado.

Amostra	Concentração de fenóis totais (mg/100g)	Desvio padrão	CV (%)
Matéria-prima vegetal	18	0,007	1,90
Extrato líquido concentrado	168	0,012	1,80

Legenda: CV: Coeficiente de variação.

A concentração de fenóis totais encontrado no extrato líquido concentrado da *C. chinense* Jacq., foi maior se comparado ao valor obtido para a matéria-prima vegetal. Verificou-se que o solvente e a técnica de extração utilizada no preparo do extrato líquido concentrado foram capazes de extrair compostos fenólicos em maior proporção que a determinada na avaliação da matéria-prima vegetal. Os resultados obtidos demonstram a relevância de se promover a extração dos compostos fitoquímicos presentes em matrizes vegetais, isto porque a extração visa identificar, isolar, purificar e retirar os metabólitos secundários por meio da adição de solventes específicos (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos são substâncias originadas do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Suas estruturas moleculares são constituídas por anéis aromáticos, com um ou mais substituintes hidroxílicos incluindo seus grupos funcionais. Esses compostos são amplamente encontrados nos vegetais, apresentando estruturas variáveis e por isso, são considerados multifuncionais. Estes compostos englobam várias substâncias diferentes, a saber: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, taninos condensados e hidrolisados e ligninas (ANGELO e JORGE, 2007).

Na maioria das pimentas, o conteúdo de compostos fenólicos aumenta à medida que seus frutos atingem um avançado grau de maturação. Provavelmente, esse aumento nos teores de fenólicos em frutos maduros ocorra pelo fato de que esses compostos são,

também, responsáveis pela coloração e sabor da grande maioria dos vegetais (HOWARD *et al.* 2000; KAYS, 1991).

Os compostos fenólicos nas pimentas do gênero *Capsicum* demonstram boa capacidade antioxidante, interagindo preferencialmente com o radical peroxil impedindo sua autooxidação e a oxidação lipídica em tecidos vegetais e animais (DECKER, 1998). Deste modo justifica-se a necessidade de investigação do teor de fenóis tanto na matéria-prima vegetal quanto no extrato líquido da *C. chinense* Jacq., realizados neste trabalho.

OLIVEIRA (2011) avaliou o teor de fenóis totais em extratos alcoólicos das pimentas dedo-de-moça e de cheiro ardida, pelo método de Folin-Denis, obtendo como resultado valores de 24,35 mg/100g e 24,09 mg/100g de amostra, respectivamente.

LIMA *et al.* (2012) determinou o teor de fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, na pimenta dedo-de-moça comercializada na cidade de Imperatriz do Maranhão, utilizando extrato aquoso, hidroetanólico e etanólico da pimenta, e encontraram valores de fenóis totais de 0,51; 0,43 e 1,50mg/100g de amostra, respectivamente. Os pesquisadores comprovaram, ainda, que o álcool etílico apresentou melhor poder extrator para compostos fenólicos na pimenta, se comparado com as demais soluções mencionadas no trabalho citado.

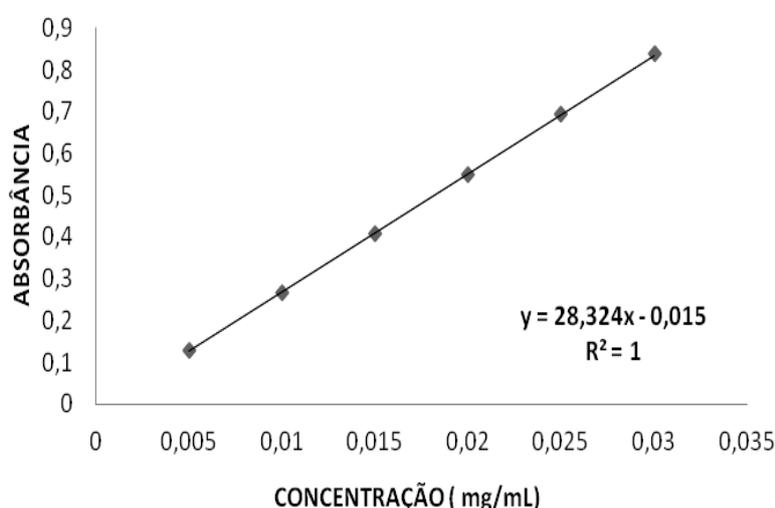
PEDÓ *et al.* (2014) verificou pelo método de Folin-Ciocalteu, diferentes teores de polifenóis em pimenta doce submetida a variadas formas de adubação, cujos valores foram de 6,37 a 6,96 mg/100g de amostra.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que as pimentas do gênero *Capsicum*, particularmente a *C. chinense* Jacq. da variedade biquinho, são ricas fontes de compostos fenólicos totais.

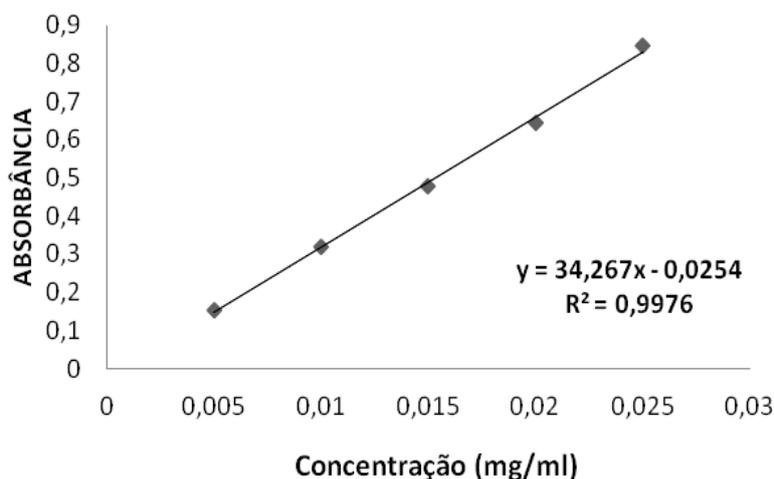
#### 4.5.2 Doseamento de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi calculado utilizando a equação linear baseada na curva de calibração  $y = 28,324x - 0,015$  para a matéria-prima vegetal, e  $y = 34,267x - 0,0254$  para o extrato líquido concentrado, onde  $y$  é a absorbância e  $x$  é o conteúdo de flavonoides totais. O flavonoide rutina foi utilizado como padrão para a construção das curvas analíticas demonstradas abaixo:

**Figura 17:** Curva analítica de rutina para determinação do teor de flavonoides totais na matéria-prima vegetal de *C. chinense* Jacq.



**Figura 18:** Curva analítica de rutina para determinação do teor de flavonoides totais no extrato líquido concentrado de *C. chinense* Jacq.



A concentração de flavonoides totais encontrados na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado da *C. chinense* Jacq., estão representados na tabela 7:

**Tabela 7:** Conteúdo de flavonoides totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado

Amostra	Concentração de flavonoides totais (mg/100g)	Desvio padrão	CV (%)
Matéria-prima vegetal	10	0,030	5,53
Extrato líquido concentrado	90,7	0,017	2,27

Legenda: CV: Coeficiente de variação

Mediante aos resultados obtidos, observou-se que o extrato líquido concentrado apresentou maior concentração de flavonoides se comparado aos resultados alcançados, para o mesmo fitocomposto, na matéria-prima vegetal. Este ocorrido sugere que a quantidade de flavonoides pode variar conforme a procedência das amostras, os solventes utilizados no processo extrativo e a técnica de extração (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2008).

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários fenólicos, largamente distribuídos no reino vegetal, tendo, como característica marcante a capacidade de atuar como antioxidantes sequestradores de radicais livres, mais especificamente os radicais superóxido e peróxido (WILMSEN; SPADA; SALVADOR, 2005). De forma geral, a atividade antioxidante dos flavonoides está relacionada com sua estrutura molecular, dependendo assim do número de substituintes hidroxil que apresenta na sua constituição. Deste modo, quanto maior o número de substituintes hidroxil, maior será o potencial antioxidante do composto flavonoide (HAVSTEEN, 2002).

MENICHINI *et al.*, (2009) avaliando os teores de flavonoides totais em extrato etanólico dos frutos maduros da pimenta *C. chinense* Jacq. (variedade habanero), pelo método de complexação com cloreto de alumínio, encontraram um valor correspondente a 45 mg/100 g dos frutos *in natura*.

LIMA *et al.*, (2012) obtiveram um teor de flavonoides equivalente a 47 mg/100g em extrato alcoólico de pimentas dedo de moça comercializadas em Imperatriz-MA. LOIZZO *et al.*, (2013), detectaram valores máximos de 44 e 37 mg /100 g de extrato seco para duas diferentes cultivares da espécie *C. annuum*. SHOTORBANI *et al.*, (2013), demonstraram um teor máximo de 7,5 mg/100g de fruto fresco em pimentas vermelhas doces da espécie *C. annuum* L. Todas as determinações do teor de flavonoides citadas, foram realizadas pelo método de complexação com cloreto de alumínio.

Os valores determinados neste trabalho indicam que a *C. chinense* Jacq. (pimenta biquinho) possui níveis satisfatórios de flavonoides em sua composição, sendo comprovado por SEVERO (2015) que obteve uma concentração de flavonoides totais referentes a 8,14 mg/100g para o farelo da pimenta biquinho, e SILVA (2017) que determinou um teor de flavonoides igual a 219,04 mg/100g para o extrato líquido da mesma variedade de pimenta, ambos utilizando o método descrito por FRANCIS (1982).

Neste sentido, os dados anteriormente apresentados fundamentam a importância do estudo do teor de flavonoides realizado neste trabalho, uma vez que este fitocomposto também possui potencial de uso na fabricação de produtos industrializados devido às suas propriedades antioxidantes.

#### 4.5.3 Doseamento de carotenoides totais

A matéria-prima vegetal e o extrato líquido concentrado, obtidos a partir da pimenta biquinho (*C. chinense* Jacq.), foram submetidos ao teste de doseamento de carotenoides totais, cujos resultados encontram-se descritos na Tabela 8:

**Tabela 8:** Conteúdo de carotenoides totais presentes na matéria-prima vegetal e no extrato líquido concentrado

Amostra	Concentração de carotenoides totais (mg/100g)	Desvio padrão	CV (%)
Matéria-prima vegetal	9,10	0,022	9,46
Extrato líquido concentrado	83,7	0,016	1,96

Legenda: CV: Coeficiente de variação.

Os resultados obtidos demonstraram uma concentração de carotenoides maior para o extrato líquido da *Capsicum chinense* Jacq., em comparação aos valores observados, durante a análise do mesmo metabólito secundário, na matéria-prima vegetal. Segundo RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, (2008), existem vários fatores que tornam difícil a análise de carotenoides dentro de uma matriz vegetal: a variabilidade qualitativa e quantitativa da composição na amostra, a ampla variação nas quantidades dos carotenoides dentro de uma mesma amostra. Além disso, o conteúdo de carotenoides em fontes vegetais depende da quantidade e do tipo da amostra analisada, forma de extração, perdas físicas ocorridas durante o procedimento, degradação oxidativa durante a análise ou estocagem da amostra, entre outros (RODRIGUEZ-AMAYA e AMAYA-FARFAN, 1992).

Os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais devido à sua ampla distribuição no reino vegetal, sua grande diversidade estrutural e por sua multifuncionalidade, sendo definidos quimicamente como tetraterpenoides. Por serem compostos bioativos multifuncionais, alguns destes carotenoides são pró-vitaminas A, ou seja, transformam-se em vitamina A no organismo. Outros não são precursores de vitamina A, mas agem como agentes antioxidantes, na eliminação de radicais livres. Os carotenoides em geral apresentam propriedades antioxidantes, sendo conhecidos por reagirem com o oxigênio singlete, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular, o qual apresenta dois elétrons de spins opostos ocupando orbitais diferentes ou não (RODRIGUES-AMAYA, 1999).

Um dos atributos mais característicos nos frutos das pimentas do gênero *Capsicum* é sua diversidade de cores, que ocorre devido a um conteúdo notável de diferentes tipos de carotenoides (BURRUEZO *et al.*, 2010). A sua coloração vai de amarelo a vermelho, sendo que estes pigmentos, essenciais para o uso como corantes alimentícios, também conferem a esses frutos um notável valor nutricional. Deste modo, muitos carotenoides encontrados em pimentas apresentam excelentes propriedades antioxidantes. O potencial antioxidante dos carotenoides se deve a presença de um sistema de duplas ligações conjugadas, que confere a estes a capacidade de desativar as espécies reativas (MATSUFUJI *et al.*, 1998). Estes pigmentos podem atuar tanto na proteção de células contra radicais livres, como sequestrar espécies reativas de oxigênio (YOUNG e LOWE, 2007).

OLIVEIRA (2011), estudando o teor de carotenoides em quatro espécies de pimentas do gênero *Capsicum* observou uma variação de 57 mg/100 g para pimenta de cheiro ardida e 40mg/100 g para pimenta de cheiro.

NEITZKE *et al.*, (2015), analisaram o teor de carotenoides em variedades de pimentas do gênero *Capsicum baccatum* utilizando o mesmo método deste trabalho, e encontraram valores de 71,55 mg/100 g para a pimenta Cambuci e 39,75 mg/100g para a pimenta dedo-de moça.

SILVA (2017), avaliando a potencialidade das pimentas biquinho como alimento natural, relatou uma quantidade de carotenoides totais igual a 10,84 mg/100 g. CARVALHO *et al.*, (2013) determinou por cromatografia a líquido de alta eficiência os teores de carotenoides na pimenta biquinho, revelando um conteúdo de 71,33 mg/100 g do fruto.

CARVALHO *et al.*, (2014) ao determinar o teor de carotenoides para a pimenta biquinho em avançado grau de maturação, verificaram um valor de 10,42 mg/100 g de extrato. BERNARDO *et al.* (2015) avaliaram o extrato de pimenta-biquinho como forma de conservação desta hortaliça, e verificaram um teor de carotenoides máximo de 76 mg/100 g da amostra.

Em estudo sobre a caracterização e quantificação de constituintes antioxidantes de pimenta *C. annuum L.*, os autores verificaram 45,59 mg/100 g de carotenoides totais, para as pimentas maduras *in natura* (MARÍN *et al.*, 2004). COLLERA-ZÚÑIGA *et al.*, (2005), realizando um estudo comparativo da composição de carotenoides em três variedades de pimentas mexicanas do gênero *C. annuum L.*, identificaram, para carotenoides totais, valores de 6,76 a 7,52 mg/100g.

De um modo geral, os resultados determinados neste trabalho sugerem que as amostras da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado, obtidos a partir da *C. chinense* Jacq. variedade biquinho, apresentam bons níveis de carotenoides totais, tornando estas matrizes vegetais excelentes fontes de carotenoides, com potencial aplicabilidade na elaboração de produtos farmacêuticos e cosméticos com atividade antioxidante.

#### **4.6 Validação de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para a quantificação do marcador capsantina no extrato líquido concentrado de *Capsicum chinense* Jacq.**

Métodos analíticos que não estejam descritos na Farmacopeia, empregados para análise qualitativa e quantitativa do ativo vegetal e do produto acabado, devem ser validados segundo parâmetros preconizados pela RDC 166/2017. A validação tem como principal objetivo, demonstrar que o método analítico desenvolvido é apropriado para a finalidade almejada, quer seja uma determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa do analito de interesse (BRASIL, 2014).

Os parâmetros avaliados para a validação do método analítico, utilizado na quantificação da capsantina no extrato líquido da *C. chinense* Jacq., foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

##### *4.6.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico (System suitability)*

Os testes de adequação do sistema são parte integrante do método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência, sendo utilizados para verificar se tanto a resolução quanto a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequados para a realização das análises (BRASIL, 2010). Os parâmetros a serem avaliados e seus limites foram recomendados, de acordo com a US-FDA (2000).

Para tanto, antes de iniciar os experimentos de validação, as condições do sistema cromatográfico utilizado foram avaliadas através da realização de um conjunto de testes, com o intuito de garantir que os resultados de exatidão e precisão gerados fossem aceitáveis. Os parâmetros avaliados para verificar a adequabilidade do sistema foram: fator de retenção ( $k$ ); resolução ( $R_s$ ); número de pratos teóricos ( $N$ ), e fator de cauda (TF). Nestes testes, cada um dos parâmetros foi avaliado quanto a sua adequabilidade para as análises do padrão e das demais amostras, realizando-se os testes no comprimento de onda adequado para a avaliação da capsantina (RIBANI *et al.*, 2004; US-FDA, 2000; DOLAN, 2004)

Os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico estão expostos na Tabela 9, atestando que o sistema está apto a gerar resultados de exatidão e precisão adequados para a quantificação do marcador químico capsantina.

**Tabela 9:** Resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema (system suitability) para o marcador químico capsantina.

Parâmetros	Especificação (FDA)*	Resultado
Fator de retenção (k)	> 2	7,05
Resolução (Rs)	> 2	12,9
Fator de cauda (T)	≤ 2	1,26
Número de pratos teóricos (N)	> 2000	11.500

\*Fonte: US-FDA (2000)

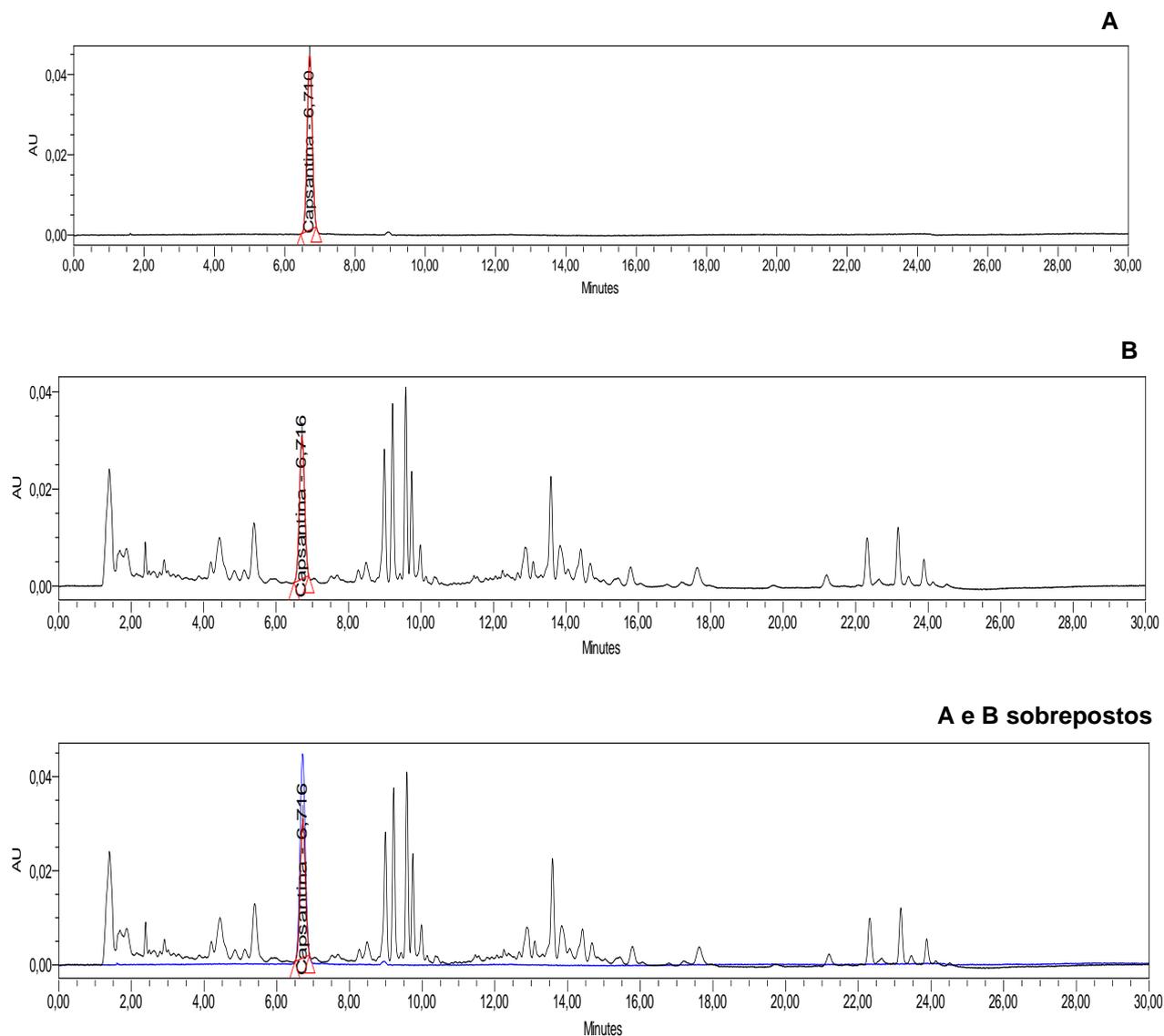
#### 4.6.2 Validação do método analítico proposto

##### 4.6.2.1 Seletividade

O ensaio de seletividade verifica a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2014). A análise foi feita por meio de comparação entre os tempos de retenção e espectros de absorção ultravioleta dos picos do marcador capsantina no padrão (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Brasil Ltda) e na amostra.

A seletividade foi comprovada para o método analítico proposto neste trabalho, uma vez que o pico da capsantina foi separado, de forma inequívoca, dos demais componentes interferentes presentes na amostra (Figura 19). Os espectros de absorção na região UV-visível mostram a pureza do pico da capsantina tanto na amostra do padrão quanto no extrato líquido, demonstrando se tratar apenas do composto capsantina, não havendo a presença de interferentes (Figura 20).

**Figura 19:** Cromatogramas HPLC-PDA do padrão (A) Capsantina; (B) No extrato líquido de *C. chinense* Jacq. Pimenta biquinho; (C) Sobreposição de A e B. Condições cromatográficas: Coluna Promosil C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm, 29°C / Acetona: H<sub>2</sub>O, gradiente / 1,5 mL/min.

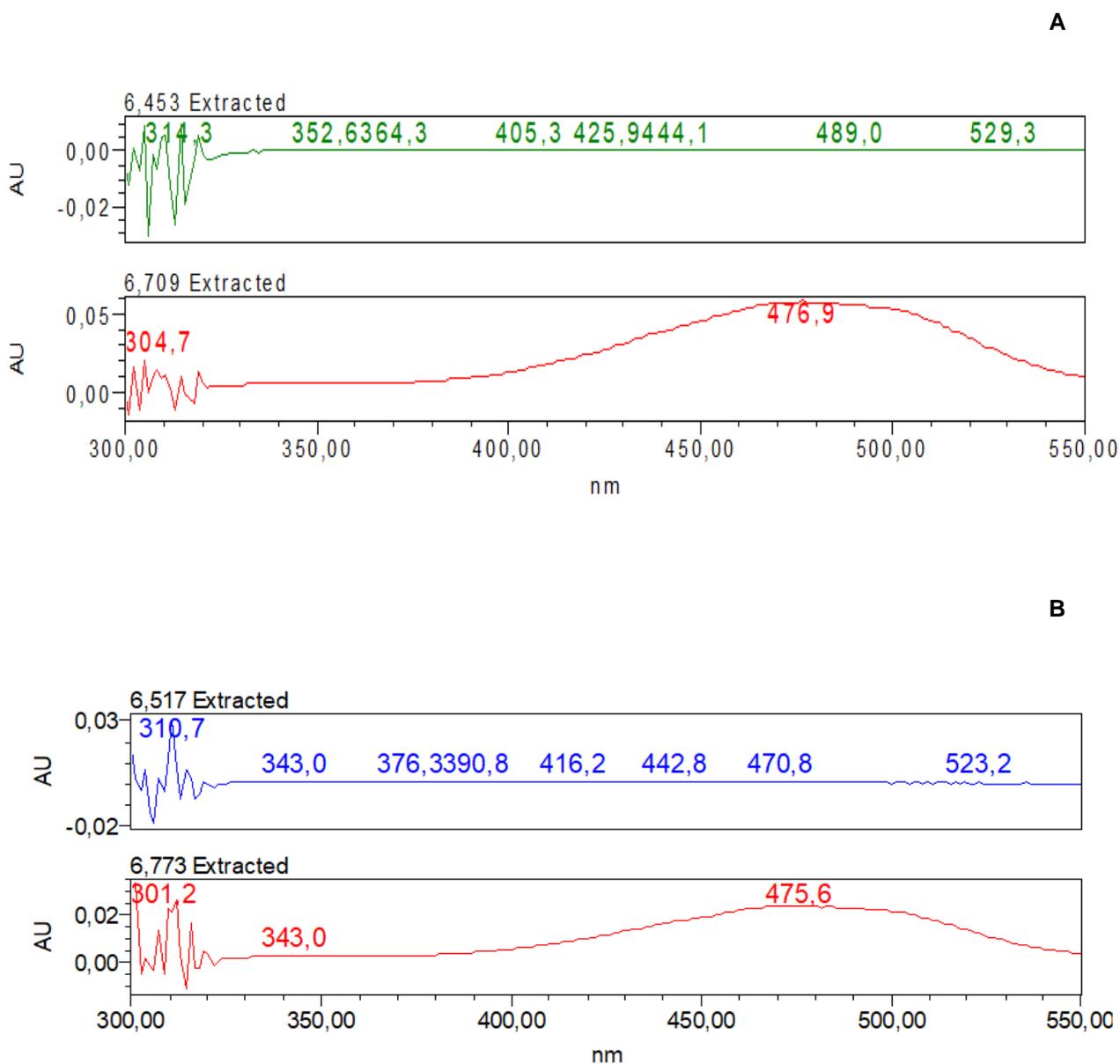


Fonte: Software Enpower 2.0.

Os espectros de absorção na região UV-visível são a primeira ferramenta de pesquisa para a identificação dos carotenoides. O comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e a forma do espectro são específicos do sistema de duplas ligações conjugadas denominado cromóforos, que proporcionam aos carotenoides sua cor aparente e fornecem o espectro de absorção visível, servindo como base para a sua identificação e quantificação (Figura 20). A maioria dos carotenoides podem absorver no máximo três comprimentos de onda, resultando em três picos de espectros, e quanto

maior o número de duplas conjugadas, maiores serão os valores  $\lambda_{\text{máx}}$  (BRITTON *et al.*, 1995).

**Figura 20:** Espectros de absorção na região UV-visível do marcador capsantina: (A) No padrão; (B) No extrato líquido da *C. chinense* Jacq. (Pimenta biquinho).



Fonte: Software Enpower 2.0.

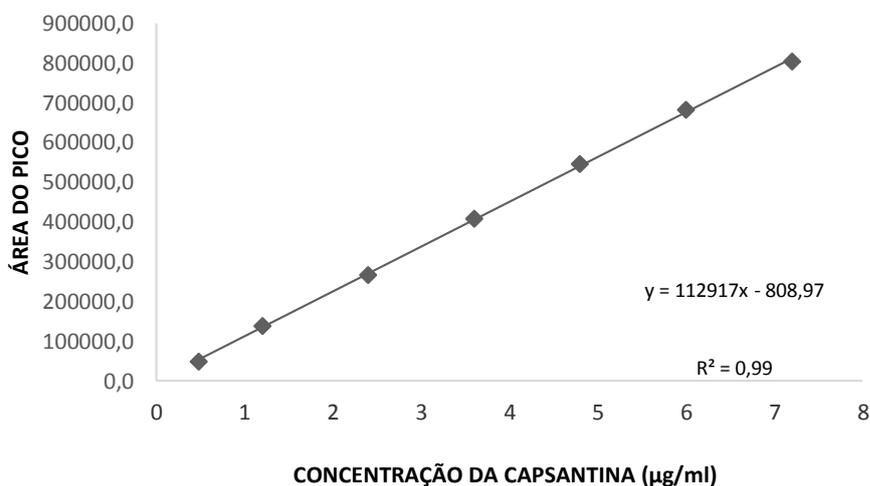
#### 4.6.2.2 Linearidade

A linearidade consiste na capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que seus resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2014). A linearidade da curva analítica foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados em um intervalo

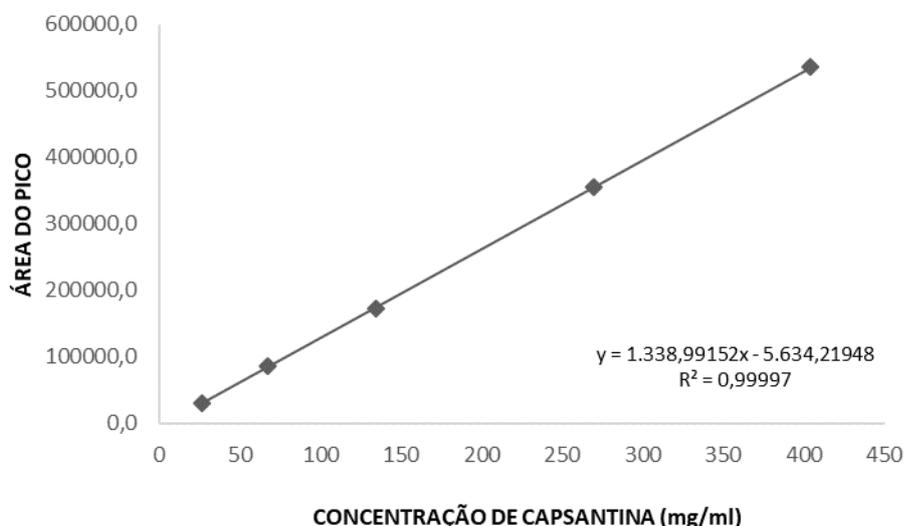
de concentrações determinadas tanto para o padrão quanto para o extrato líquido de *C. chinense* Jacq. Este parâmetro foi avaliado mediante a análise do coeficiente de correlação (r), obtido pelo método de regressão linear da curva analítica construída para o padrão e para o extrato líquido de *C. chinense* Jacq. (pimenta biquinho). Brasil (2014), preconiza que quando a curva analítica for elaborada com o padrão o valor do coeficiente de correlação deve ser maior ou igual a 0,99, e quando for elaborada para amostras poderá ser aceito um valor de “r” maior ou igual a 0,98.

O estudo de linearidade para a quantificação da capsantina no padrão e no extrato líquido da *C. chinense* Jacq., exibiram resultados satisfatórios, já que as curvas analíticas obtidas apresentaram valores de coeficiente de correlação (r) maiores do que 0,99 (BRASIL, 2014). Desta forma, a metodologia analítica desenvolvida neste trabalho mostrou linearidade, uma vez que foi capaz de apresentar valores de área do pico diretamente proporcionais às concentrações de capsantina presente nas amostras do padrão e do extrato líquido (Figuras 21 e 22).

**Figura 21:** Curva analítica média do padrão capsantina.



**Figura 22:** Curva analítica média do extrato líquido de *C. chinense* Jacq.



#### 4.6.2.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada pela proximidade dos resultados obtidos nas análises de seis determinações a 100% da concentração do teste. Os ensaios realizados para análise de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação de 3,52% e 3,02%, respectivamente (Tabelas 10 e 11).

**Tabela 10:** Repetibilidade do método analítico para quantificação de capsantina.

Análise	Concentração de Capsantina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)	Teor Médio (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
1	3,05	1,12			
2	3,06	1,13			
3	3,23	1,19	1,13	0,04	3,52
4	3,11	1,15			
5	2,89	1,07			
6	2,95	1,09			

Legenda: CV:Coeficiente de variação.

**Tabela 11:** Precisão intermediária do método analítico para quantificação de capsantina.

Análise	Concentração de Capsantina (µg/mL)	Teor (%)	Teor Médio (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
1	3,05	1,12			
2	3,06	1,13			
3	3,23	1,19			
4	3,11	1,15			
5	2,89	1,07			
6	2,95	1,09			
7	3,02	1,11	1,12	0,03	3,02
8	2,98	1,09			
9	2,95	1,09			
10	3,08	1,13			
11	3,14	1,16			
12	3,06	1,12			

Legenda: Coeficiente de variação.

Os valores obtidos indicam a precisão do método desenvolvido para a quantificação da capsantina, tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que o desvio padrão relativo entre os resultados das replicatas realizadas foram menores que 5%, conforme especificação da ANVISA (BRASIL, 2017).

#### 4.6.2.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a conformidade entre os resultados obtidos em um ensaio e o valor de referência reconhecido como verdadeiro (BRASIL, 2014). A exatidão foi avaliada em termos de recuperação do padrão de referência, através do método de adição de padrão nas amostras do extrato líquido de *C. chinense* Jacq., utilizando três níveis de concentração: baixo (135mg/mL), médio (270 mg/mL) e alto (404 mg/mL). Os resultados obtidos para a determinação da exatidão pelo teste de recuperação estão representados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Determinação da exatidão do método analítico pelo teste de recuperação do padrão realizado no extrato líquido de *C. chinense* Jacq.

Nível	Concentração Teórica (mg/mL)	Concentração do padrão recuperado (µg/mL)	Média (%)	Desvio padrão	CV (%)	Padrão recuperado (%)	Média da recuperação do padrão (%)	Desvio padrão	CV geral (%)
BAIXA	135	3,18	3,14	0,03	0,95	105,72	102,91	2,30	2,24
	135	3,12				103,92			
	135	3,13				104,09			
MÉDIA	270	2,99	3,04	0,10	3,32	99,66	102,91	2,30	2,24
	270	2,97				98,95			
	270	3,16				105,11			
ALTA	404	3,12	3,10	0,02	0,62	103,95	102,91	2,30	2,24
	404	3,09				102,76			
	404	3,09				102,95			

Legenda: CV: Coeficiente de variação.

Conforme exposto na Tabela 12, o percentual de recuperação do padrão variou de 98,95 a 105,72%, com média de 102,91% e coeficiente de variação geral de 2,24%, sugerindo a exatidão do método desenvolvido para a quantificação de capsantina no extrato líquido de *C. chinense* Jacq. Segundo RIBANI *et al.*, (2004), os intervalos de recuperação aceitáveis dependem da complexidade analítica da amostra, e admitem valores que variam de 50% a 120% para a exatidão, com um coeficiente de variação máximo de 15%.

#### 4.6.2.5 Robustez

O teste de robustez mede a capacidade que o método analítico apresenta em resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos iniciais (BRASIL, 2014). Para tanto, a robustez do método foi avaliada a partir de pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas em relação ao método original, tais como temperatura da coluna (28°C e 30°C) e taxa de fluxo da fase móvel (1,4 mL/min e 1,6 mL/min). Os resultados obtidos para a robustez avaliada neste trabalho estão descritos na Tabela 13.

**Tabela 13:** Robustez do método analítico para quantificação de capsantina no extrato líquido de *C. Chinense* Jacq.

Condição Analítica	Média da área do Pico ( $\mu\text{v}^*\text{S}$ )	Média do tempo de retenção (Min.)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
Método original	353343,667	6,46	0,0286628	0,443857
Temperatura 30°C	372065	6,13	0,163	2,587
Temperatura 28°C	372241,667	6,23	0,1158333	1,826
Fluxo 1,6 mL/min	348642,667	5,92	0,192812	3,115314
Fluxo 1,4 mL/min	397440	6,66	0,256472	4,084599

Legenda: CV: Coeficiente de variação.

Os ensaios de robustez mostraram que as pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas em relação ao método original, não resultaram em problemas na quantificação da capsantina, sendo que os valores de coeficiente de variação obtidos com estas alterações foram inferiores a 5% (BRASIL, 2017). Portanto, os resultados obtidos evidenciaram a robustez do método analítico utilizado para a quantificação da capsantina no extrato líquido de *C. chinense* Jacq.

#### 4.6.2.6 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

De acordo com BRASIL (2017), o limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, nas condições experimentais estabelecidas para a análise, e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, nas condições experimentais adotadas para a análise.

O limite de detecção (LD) do método analítico avaliado foi de 0,48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e o limite de quantificação (LQ) correspondeu a 1,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os resultados obtidos demonstraram a capacidade do método proposto neste trabalho, em detectar e quantificar concentrações do marcador químico capsantina, compatíveis com as quantidades presentes na amostra do extrato líquido concentrado da *Capsicum chinense* Jacq.

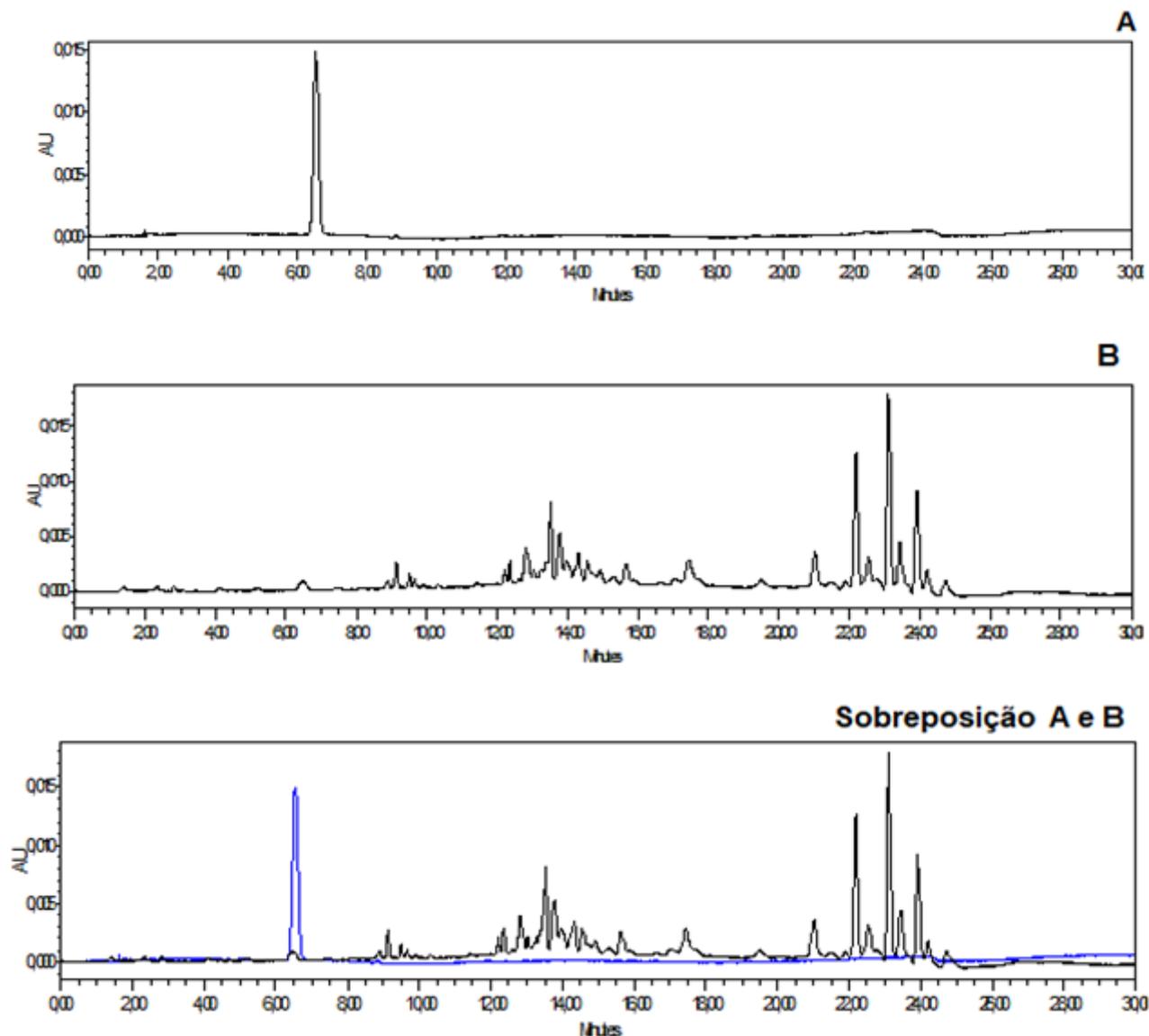
#### **4.7 Quantificação da capsantina no extrato líquido concentrado de *Capsicum chinense* Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência**

O teor total da capsantina quantificada mostrou que o extrato líquido obtido a partir da pimenta biquinho, possui teor de 1,13% de capsantina com concentração média de 3,05 µg/mL e coeficiente de variação de 3,52%. Os resultados obtidos sugerem que o extrato líquido de *C. chinense* Jacq. pode ser uma alternativa como princípio ativo antioxidante para indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, com potencial aplicabilidade no desenvolvimento dos mais diversos tipos de formulações. O método analítico para a quantificação da capsantina, validado neste trabalho, pode ser uma ferramenta importante no controle de qualidade de extratos líquidos produzidos a partir dos frutos das pimentas *Capsicum*.

#### **4.8 Identificação de capsantina no pó da *Capsicum chinense* Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência**

A identificação do marcador capsantina a partir da matéria-prima vegetal da *Capsicum chinense* Jacq. variedade biquinho, foi realizada por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.6 deste trabalho. O pico da capsantina na matéria-prima vegetal foi identificado pelo seu tempo de retenção (6,485 minutos), em comparação com o tempo de retenção (6,710 minutos) observado para o padrão da capsantina (Figura 23). A detecção da capsantina nas amostras foi feita no comprimento de onda de absorção máxima de 450nm.

**Figura 23:** Cromatogramas HPLC-PDA do padrão (A) Capsantina; (B) No pó de *C. chinense* Jacq. Pimenta biquinho; (C) Sobreposição de A e B. Condições cromatográficas: Coluna Promosil C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm, 29°C / Acetona: H<sub>2</sub>O, gradiente / 1,5 mL/min.



Fonte: Software Enpower 2.0

A quantificação da capsantina na matéria-prima vegetal por método cromatográfico, no entanto, não foi possível uma vez que a quantidade deste marcador químico na amostra encontra-se abaixo do limite de quantificação, inviabilizando sua determinação com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) equivale à concentração mais baixa da curva de calibração, e uma vez estabelecida, deve ser utilizado como limite operacional. Um resultado obtido abaixo do LQ pode indicar a presença do analito de interesse, porém não quantifica a

concentração real na amostra. Em outras palavras, extrapolações para valores abaixo da curva de calibração não são recomendadas (BRASIL, 2014).

Entretanto, a técnica de identificação dos compostos fitoquímicos presentes nas drogas vegetais, por cromatografia a líquido de alta eficiência, pode ser utilizada como forma de avaliar a qualidade da matéria-prima com finalidade terapêutica. O teor dos constituintes na matéria-prima vegetal pode variar consideravelmente com a época, local da coleta, formas de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento (KLEIN *et al.*, 2009). Muitos fatores afetam a proporção de capsantina na pimenta, além do grau de maturação, variedade e diversidade genética, estudos anteriores apontam que os processos de secagem e moagem das pimentas, podem favorecer a perda de capsantina nas amostras analisadas (SHAH *et al.*, 2014).

Os resultados apresentados indicam a presença da capsantina na matéria-prima vegetal, obtida a partir da *C. chinense* Jacq. (pimenta biquinho), tornando-a uma fonte natural de obtenção para este carotenoide.

## **4.9 Elaboração das fórmulações fitocosméticas**

### *4.9.1 Delineamento de formulações*

A elaboração das formulações cosméticas foram realizadas conforme diretrizes descritas no Manual de Boas Práticas em Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos para a Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos (BRASIL, 2007) com adaptações.

Foram propostas sete formulações protótipos com diferentes bases galênicas, sendo 2 emulsões (P1 e P7), 3 géis-cremes (P2, P3, P5) e 2 géis (P4 e P6), utilizadas como excipiente na preparação do sérum, sendo aplicados os mesmos percentuais do extrato líquido padronizado de *Capsicum chinense* Jacq. em todas as amostras (Figura 24). Os ingredientes utilizados na fabricação dos produtos cosméticos propostos foram de origem sintética e natural. A cuidadosa seleção dos ingredientes assim como suas concentrações foram fundamentais para definir a segurança e eficácia do produto. Foi levada em conta a estrutura química dos ativos, pois, isto forneceu informações a respeito de sua atividade biológica e química. Outros pontos foram considerados, como as

possíveis interações com outros ingredientes da formulação e potencial de penetração cutânea, segundo informações descritas na literatura (BRASIL, 2007).

**Figura 24:** Sete protótipos (testes piloto) do cosmético desenvolvidos a partir do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., pimenta biquinho.



**Fonte:** O próprio autor.

O protótipo P6 foi considerado, o mais estável das amostras elaboradas (Figura 25), uma vez que em quinze dias de repouso suas características físico-químicas e organolépticas não sofreram alterações relevantes, sugerindo que as condições encontradas na base galênica preparada para este protótipo, impossibilitou a isomerização e a oxidação dos pigmentos carotenoides evitando deste modo a perda pronunciada de cor, seguida da oxidação do produto. Entre as características químicas e biológicas dos carotenoides, encontra-se um sistema de duplas ligações conjugadas responsáveis pelo poder corante e por sua atividade antioxidante, ao passo que esse mesmo sistema é responsável pela instabilidade e conseqüente isomerização e oxidação durante seu processamento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

**Figura 25:** Protótipo P6, a amostra considerada mais estável entre os sete protótipos desenvolvidos.



**Fonte:** O próprio autor.

#### *4.9.2 Preparação das formulações*

A fórmula cosmética escolhida e elaborada neste trabalho, a partir do protótipo P6, foi um sérum com base gel. O sérum é um produto de uso facial que se diferencia do tradicional creme ou hidratante, por sua textura e ingredientes utilizados em sua composição. Usualmente, são mais fluídos e menos gordurosos, favorecendo a penetração dos ativos com maior rapidez, consequentemente atingindo regiões mais profundas da pele. Por ser composto por elevadas concentrações de ingredientes ativos, o sérum atua de forma mais efetiva que os demais produtos cosméticos de uso facial (LICE, 2012).

A base do sérum foi constituída por um gel, sendo este estruturado em uma rede tridimensional formada por macromoléculas gelificantes, entre as quais se distribui o líquido. O gel é uma forma cosmética bem aceita pelos consumidores, em virtude de seu aspecto transparente, na maioria das vezes, e por sua fácil aplicabilidade. São bem tolerados por todos os tipos de pele, são livres de gorduras e não mancham tecidos. Os géis, em geral, apresentam boa compatibilidade com vários ativos anti-aging, possuem efeito emoliente, produzem sensação de frescor sobre a pele após sua aplicação e secam rapidamente sem deixar resíduos (OLIVEIRA, 2009).

O estudo neste trabalho é quali-quantitativo, onde se desenvolveu em laboratório uma formulação cosmética utilizando ingredientes específicos com o intuito de disponibilizar um produto que atenda as demandas de mercado concernentes a um fitocosmético, com atividade antioxidante e ação anti-aging, de fácil aplicação e boa espalhabilidade, com pouca carga oleosa, que tenha toque seco sem deixar resíduos.

Os componentes da fórmulação do sérum gel atendem as seguintes legislações vigentes:

✓ RDC Nº 07, DE 10/02/2015 - Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências;

✓ RDC 03 de 18/01/12 - Lista de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas;

✓ RDC 29 de 01/06/2012 - Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Segue abaixo os atributos referentes aos principais componentes do sérum gel:

**Acrilato de Sódio / Copolímero de Acrilodimetil Taurato de Sódio / Isohexadecanogente / Polisorbato 80:** espessante e emulsificante na forma líquida, sendo um polímero pronto e fácil de usar. Estabiliza perfeitamente emulsões a altas temperaturas, e permite obter textura rica e sedosa em fórmulas fáceis de aplicar (SEPPIC products).

**Ciclopentasiloxano / Dimeticona Crespolímero:** atua como agente espessante em formulações água-em-óleo e água-em-silicone, de fácil manuseio, proporciona toque seco deixando a pele sedosa e livre de gordura. É compatível com uma ampla variedade de ingredientes lipofílicos tais como fragrâncias, vitaminas e derivados de vitaminas (DOW CORNING, 2015).

**Isononanoato de etilhexilo:** é um éster usado como um emoliente leve e atraente para conceitos modernos de cuidados com a pele. Sua esterificação é feita a partir da reação do ácido isononanóico e 2-etilhexanol, sendo um emoliente de toque seco e baixa viscosidade (PROSPECTOR- Dragoxat<sup>®</sup> 89).

**Propilenoglicol:** um agente umectante com habilidade de atrair e reter água em um produto. Ele é um dos materiais mais efetivos aprovados como umectante para cosméticos e alimentos, sendo superior a outros compostos como sorbitol, manitol e glicerina em sua habilidade de reter água (DOW).

**Caprilato de propilheptil:** é um óleo transparente, incolor, e quase inodoro de polaridade baixa, com baixo peso molecular. Pode ser utilizado como um emoliente de propagação rápida com uma sensação de suavidade multidimensional para todos os tipos de aplicações cosméticas (PROSPECTOR- Cetiol® Sensoft).

**Hialuronato de Sódio / Fenoxietanol / Metilparabeno / Propilparabeno:** solução de hialuronato de sódio de alto peso molecular a 1% altamente purificado, obtido por biotecnologia. Formador de filme visco-elástico levemente permeável e invisível, que protege e retém grande quantidade de umidade na superfície da pele (SARFAM).

**Esqualano:** é um dos emolientes mais versáteis e de mais alta qualidade do mercado, devido ao seu perfil sensorial, biocompatibilidade e composição consistentemente robusta. É um hidrocarboneto apolar, totalmente saturado e muito estável que é facilmente incorporado em emulsões, sendo compatível com a maioria dos ingredientes cosméticos (APRINNOVA- Neossance™ Squalane).

**Água / Hexapeptídeo Acetílico-8 / Fenoxietanol / Metilparabeno / Etilparabeno / Butilparabeno / Propilparabeno:** hexapeptídeo modulador da tensão muscular facial e agente condicionante (GALENA-Lipotec/Espanha).

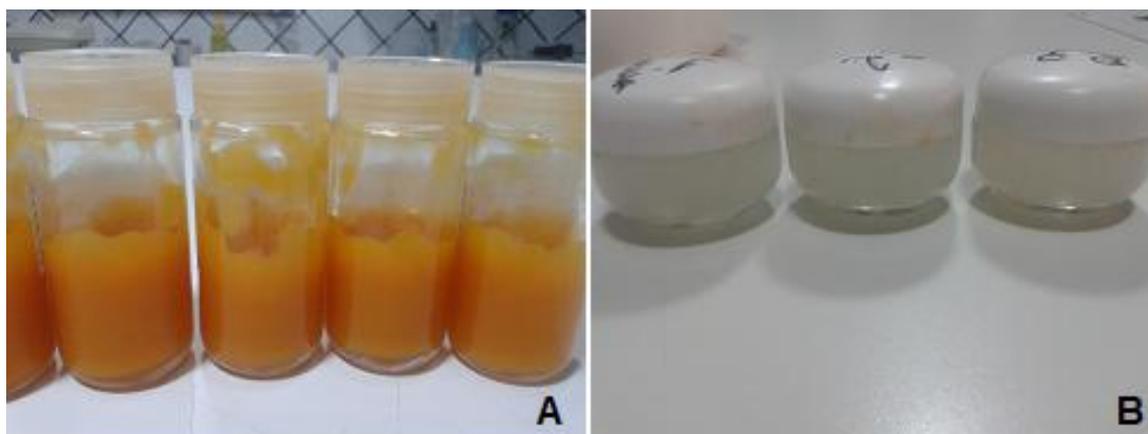
**Pentapeptídeo-18 / Caprililglicol / Glicerina:** pentapeptídeo e agente condicionante que proporciona o relaxamento da musculatura da face, através da redução da excitabilidade neuronal e da modulação do neurotransmissor acetilcolina (LIPOTEC, 2013).

**PCA sódico:** um umectante natural derivado do ácido glutâmico obtido através do melaço da cana-de-açúcar. Presente em grande quantidade na pele humana como um dos componentes do NMF (Fator de Hidratação Natural), este umectante ajuda a manter a pele hidratada. É extremamente seguro devido a sua biodegradabilidade, é considerado um produto compatível ecologicamente (INFINITY PHARMA, 2013).

**Carbonato de Dipropil Heptil:** emoliente robusto e versátil de alta qualidade. Possui sensorial leve, não pegajoso e formador de filme não oclusivo, além de alta compatibilidade dérmica. Por ser sintético, não possui resíduos de outras cadeias graxas, resultando em menor residual branco na pele (EMBACAPS-BASF).

As fórmulas cosméticas desenvolvidas, foram um sérum gel contendo o extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., que recebeu a denominação de Sérum gel pimenta biquinho, e uma outra fórmula contendo a mesma base galênica, porém sem a adição do extrato, sendo esta denominada Controle (Figura 26). A elaboração das duas formulações Sérum gel pimenta biquinho e Controle, tiveram como propósito avaliar a atividade antioxidante e a eficácia do cosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., mediante a um teste comparativo de eficácia com o cosmético Controle mencionado anteriormente.

**Figura 26:** Protótipos das formulações cosméticas: (A) Sérum gel pimenta biquinho; (B) cosmético Controle.



**Fonte:** O próprio autor.

Ao final do processo de elaboração dos dois protótipos, as formulações cosméticas apresentaram-se estáveis, não sendo observadas separações de fases ou coalescências nos mesmos. Os valores de pH obtidos foram iguais a 5,68 para o Sérum gel pimenta biquinho e 5,83 para o cosmético Controle, ambos compatíveis com a pele da face (LEONARDI, GASPAR, CAMPOS, 2002). As características organolépticas avaliadas, tais como, aspecto, cor e odor, apresentaram resultados satisfatórios e adequados para formulações cosméticas com finalidade anti-aging (BRASIL, 2004).

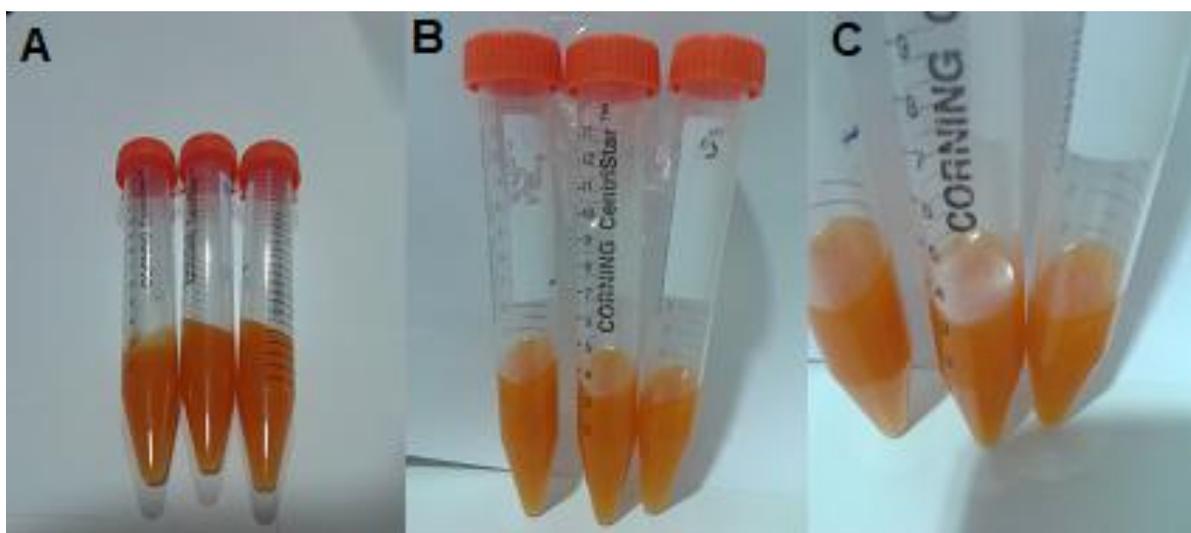
Desta forma, os dois protótipos foram conduzidos para o teste de centrifugação, e posteriormente, a avaliação de suas estabilidades foram estudadas pelo teste do ciclo de congelamento/descongelamento e pelo teste de estabilidade acelerada em diferentes condições de temperatura.

#### 4.9.3 Teste de centrifugação

Antes que fossem iniciados os estudos de estabilidade dos protótipos *Sérum gel pimenta biquinho* e *Controle*, as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação, que por sua vez produziu estresse na fórmula cosmética simulando um aumento na força gravitacional, intensificando o grau de mobilidade das partículas antecipando possíveis instabilidades, podendo dessa forma, prever se o produto sofreria instabilidades físico-químicas ao longo do tempo (BRASIL, 2004; AZZINI, 1999).

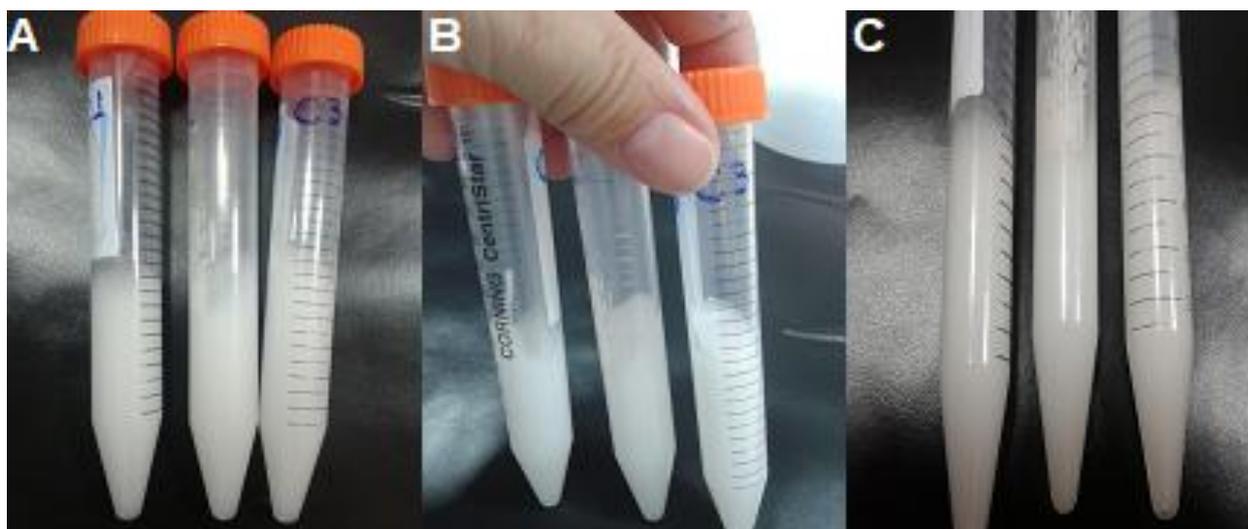
As Figuras 27 e 28 exibem os aspectos das amostras, avaliadas posteriormente à realização do teste de centrifugação. Após o período de centrifugação das amostras, observou-se que as formulações cosméticas denominadas *Sérum gel pimenta biquinho* e *Controle*, não apresentaram quaisquer alterações em relação ao seu aspecto original, evidenciando que todas as amostras avaliadas mostraram-se estáveis, indicando assim não haver necessidade de reformulação do produto (BRASIL, 2004).

**Figura 27:** Teste de centrifugação em triplicata do produto cosmético *Sérum gel pimenta biquinho*: (A) Visão frontal do produto com ausência de instabilidade; (B) e (C) Visão lateral do produto com ausência de instabilidade.



Fonte: O próprio autor.

**Figura 28:** Teste de centrifugação em triplicata do produto cosmético Controle: (A) Visão frontal do produto com ausência de instabilidade; (B) e (C) Visão lateral do produto com ausência de instabilidade.



Fonte: O próprio autor.

As formulações Sérum gel pimenta biquinho e Controle, desenvolvidas neste estudo, não apresentaram separação de fases, precipitações ou coalescência frente ao teste de centrifugação, sendo ambas as amostras consideradas estáveis, e assim, podendo ser submetidas aos testes de ciclo de congelamento/descongelamento e de estabilidade acelerada.

#### **4.10 Estudo de estabilidade acelerada do extrato líquido padronizado de *Capsicum chinense* Jacq. e das formulações cosméticas**

##### *4.10.1 Estudo de estabilidade do extrato líquido padronizado em capsantina*

O teste de estabilidade tem como objetivo fornecer evidências de como a qualidade de um produto pode variar com o tempo, sob a influência de diversos fatores ambientais tais como temperatura, umidade e luz. Após a realização do teste de estabilidade é possível estimar um prazo de validade para os produtos avaliados, além de recomendar condições de armazenamento adequadas. Então, o prazo de validade pode ser definido como o tempo em que um produto mantém suas características de qualidade dentro de padrões estabelecidos por lei e/ou aceitáveis por parte do consumidor, desde a sua fabricação (BRASIL, 2004; ORIQUI, 2013).

Diversos são os fatores que podem afetar a estabilidade dos extratos obtidos a partir das drogas vegetais, dentre eles estão, pH, solvente, temperatura, luz, reações químicas como hidrólise e oxidação, entre outros. Uma vez que a adição de substâncias ativas nas formulações cosméticas pode causar instabilidade a estas, faz-se necessário avaliar primeiramente a estabilidade dos extratos líquidos antes que sejam incorporados aos produtos (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2007). Por esse motivo o extrato líquido padronizado de *Capsicum chinense* Jacq. foi avaliado quanto à sua estabilidade, sendo submetido a ciclos de congelamento/descongelamento e aos testes de estabilidade acelerada por um período de 90 dias.

Com relação aos ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras do extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. mantiveram-se estáveis durante os 12 dias de ciclos, mantendo suas características organolépticas e físico-químicas dentro dos parâmetros pré-determinados, conforme suas características iniciais. Para o teste de estabilidade acelerada, realizado no período de 90 dias, observou-se que os diversos parâmetros estudados permaneceram praticamente inalteráveis, com variações dentro dos limites preconizados. Os parâmetros organolépticos não sofreram variações sob nenhuma das condições nas quais as amostras foram submetidas. Nos testes físico-químicos, o pH sofreu variações inferiores a 10%, assim como a densidade que se manteve entre 1,030 e 1,047 g/mL com variação média de 0,58%. Os parâmetros e as especificações utilizadas como padrão durante os estudos de estabilidade e ciclos de congelamento e descongelamento encontram-se expostos na tabela 14.

**Tabela 14:** Parâmetros e especificações do extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. submetido a estudo de estabilidade.

PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO
Aspecto	Líquido
Cor	Vermelho
Odor	Característico do produto
pH	3,3 - 4,3
Densidade (g/mL)	0,945 - 1,115

Os resultados obtidos para os parâmetros de pH e densidade, observados ao longo de 90 dias e após os 6 ciclos de congelamento e descongelamento encontram-se descritos nas Tabelas 15, 16 e 17. Durante os estudos de estabilidade, conduzidos por 90 dias, os parâmetros físico-químicos estudados foram o pH e a densidade. O pH é um parâmetro importante no estudo da estabilidade dos extratos de origem vegetal, uma vez que alterações nesta grandeza ocorrem em função da presença de impurezas, hidrólise, decomposição, erro na forma de obtenção do extrato, tempo de estocagem e condições inadequadas de armazenamento. Já a densidade é um parâmetro muito utilizado na identificação e no controle de qualidade das soluções extrativas vegetais, uma vez que este parâmetro é uma grandeza específica utilizada para distinguir o grau de pureza de uma solução (CAMELO, 2010; ANDRE *et al.*, 2013).

**Tabela 15:** Valores de pH para o extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. avaliado ao longo de 90 dias.

Tempo (dias)	Temperatura ambiente* (25±2°C)	CV (%)	Geladeira* (5±2°C)	CV (%)	Estufa* (50±2°C)	CV (%)
0	3,590 ± 0,015	0,42	3,610 ± 0,015	0,42	3,620 ± 0,015	0,42
7	3,587 ± 0,046	1,16	3,603 ± 0,042	0,64	3,680 ± 0,052	1,69
15	3,667 ± 0,046	1,50	3,733 ± 0,053	0,31	3,653 ± 0,011	0,88
30	3,613 ± 0,017	0,32	3,697 ± 0,044	1,36	3,607 ± 0,044	0,85
60	3,583 ± 0,026	0,43	3,627 ± 0,031	0,84	3,497 ± 0,044	0,72
90	3,530 ± 0,030	0,75	3,523 ± 0,031	0,91	3,533 ± 0,0173	0,91

\*Resultados expressos como média ± desvio padrão.

**Tabela 16:** Valores de densidade para o extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. avaliado ao longo de 90 dias.

Tempo (dias)	Densidade* (g/mL) (25±2°C)	CV (%)	Densidade* (g/mL) (5±2°C)	CV (%)	Densidade* (g/mL) (50±2°C)	CV (%)
0	1,039 ± 0,002	0,15	1,041 ± 0,002	0,15	1,042 ± 0,001	0,14
7	1,035 ± 0,013	1,28	1,050 ± 0,002	0,17	1,050 ± 0,000	0,06
15	1,042 ± 0,002	0,19	1,042 ± 0,002	0,15	1,037 ± 0,002	0,22
30	1,039 ± 0,001	0,10	1,038 ± 0,001	0,11	1,029 ± 0,004	0,45
60	1,028 ± 0,005	0,51	1,040 ± 0,003	0,24	1,047 ± 0,000	0,06
90	1,038 ± 0,001	0,10	1,032 ± 0,001	0,10	1,036 ± 0,000	0,06

\*Resultados expressos como média ± desvio padrão.

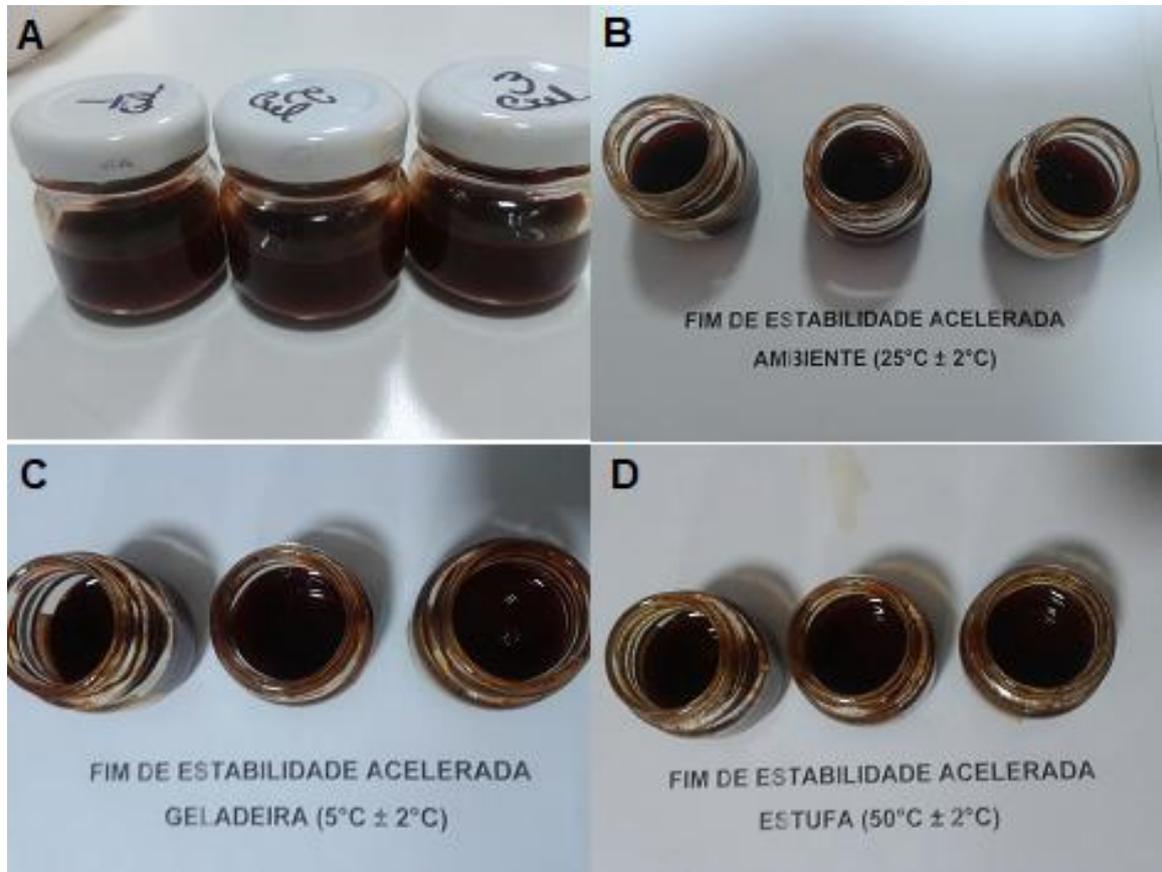
**Tabela 17:** Valores de pH e densidade para o extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq. avaliado ao longo de 12 dias durante o ciclo congelamento/descongelamento.

Ciclos (dias)	pH* (gela/degela)	CV (%)	Densidade* (g/mL) (gela/degela)	CV (%)
1	3,607 ± 0,015	0,42	1,041 ± 0,001	0,15
4	3,723 ± 0,020	0,56	1,046 ± 0,008	0,75
7	3,587 ± 0,011	0,32	1,038 ± 0,002	0,17
10	3,700 ± 0,043	1,18	1,039 ± 0,002	0,15
12	3,630 ± 0,005	0,32	1,035 ± 0,002	0,15

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

O extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., mostrou-se estável frente aos testes de estabilidade acelerada e o ciclo de congelamento e descongelamento no qual foi submetido, uma vez que não foram observadas alterações relevantes no seu aspecto, cor ou odor (Figura 29). Tanto o pH quanto a densidade não apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ), ao longo dos 90 dias de estabilidade acelerada e durante os 6 ciclos de congelamento e descongelamento. Estes resultados observados indicam o grau de estabilidade relativa do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., pimenta biquinho, nas variadas condições de temperatura a que foi submetido, desde sua elaboração até o término de sua validade (BRASIL,2004).

**Figura 29:** Amostras de extrato líquido padronizado de *C. chinense* jacq.: (A) Antes do início da estabilidade acelerada; (B) Após 90 dias de testes na temperatura ambiente; (C) Após 90 dias de testes na Geladeira; (D) Após 90 dias de testes na estufa.



Fonte: Próprio autor

#### 4.10.2 Estudo de estabilidade das formulações cosméticas

##### 4.10.2.1 Determinação das características físico-químicas e organolépticas das fórmulações cosméticas

As fórmulações cosméticas *Sérum gel pimenta biquinho* e *Controle* foram avaliadas quanto às suas características organolépticas e físico-químicas, logo após a manipulação dos produtos em testes de bancada e posteriormente a um intervalo de tempo de 24 horas. Os parâmetros estabelecidos após a avaliação das características organolépticas e físico-químicas dos produtos analisados estão descritos na Tabela 18.

**Tabela 18:** Determinação dos parâmetros organolépticos e físico-químicos das fórmulas cosméticas Sérum gel pimenta biquinho e Controle.

Amostra	Aspecto	Cor	Odor	pH	Densidade (g/mL)
Sérum gel pimenta biquinho	Gel	Laranja	Característico do produto	5,0-6,5	0,850-1,000
Controle	Gel	Branco	Característico do produto	5,0-6,5	0,850-1,000

Legenda; pH: Potencial hidrogeniônico.

As características organolépticas e físico-químicas são de grande importância para o controle de qualidade dos produtos cosméticos, uma vez que fornecem parâmetros que permitem avaliar de forma imediata o estado em que se encontra a amostra em estudo, através de análises comparativas possibilitando a verificação de alterações tais como: separação de fases, precipitação, turvação, mudanças de pH e/ou densidade, permitindo o reconhecimento primário do produto. Uma amostra de referência deve ser sempre utilizada para avaliar as características dos produtos, neste caso utilizou-se como padrão referencial o protótipo P6, mencionado no item 4.9.1 do presente trabalho. Por isso, a verificação da conformidade das características organolépticas e físico-químicas de um produto cosmético, deve ser considerada como uma condição indispensável para a garantia da qualidade, segurança e eficácia, e não apenas uma imposição regulatória (BRASIL, 2004).

#### *4.10.2.2 Ciclos de Congelamento e Descongelo*

Neste teste, as amostras foram acondicionadas em temperaturas alternadas em estufa a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  e freezer a  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ , a cada 24 horas por um período de 12 dias, totalizando seis ciclos. Ao final dos ciclos de temperatura, as características físico-químicas e organolépticas foram avaliadas novamente, comparando-se às características originais do produto. O ensaio que envolve ciclos de congelamento e descongelamento possibilita a avaliação da estabilidade de um produto mediante a antecipada divergência de temperatura, que o produto poderia sofrer durante o seu armazenamento ou transporte (NOVAK, 2013).

Para a análise das características organolépticas, tanto do Sérum gel pimenta biquinho quanto do Controle, não foram observadas quaisquer alterações no aspecto, cor ou odor. É de grande importância que as características organolépticas de um fitocosmético mantenham-se estáveis, sem alterações, visto que podem comprometer a eficácia e segurança do produto, além de influenciar o consumidor no momento da aquisição do produto (BRASIL, 2004).

Após análise estatística dos valores relativos ao pH e à densidade, não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para estes dois parâmetros durante os 12 dias de teste, tanto para o Sérum gel pimenta biquinho quanto para o cosmético Controle, cujos valores obtidos se mantiveram dentro da normalidade e praticamente constantes ao longo do tempo. Os resultados obtidos para a avaliação do pH e da densidade no ciclo de congelamento e descongelamento, dos cosméticos Serum gel pimenta biquinho e Controle, estão descritos na tabela 19.

**Tabela 19:** Resultados obtidos para a avaliação do pH e da densidade ciclo congela/descongela para os cosméticos Serum gel pimenta biquinho e Controle.

Ciclo (dias)	Amostra Sérum gel pimenta biquinho				Amostra Controle			
	pH*	CV (%)	Densidade* (g/mL)	CV (%)	pH*	CV (%)	Densidade* (g/mL)	CV (%)
1	5,67 ± 0,036	0,64	0,984 ± 0,001	0,16	5,82 ± 0,012	0,21	0,986 ± 0,000	0,06
4	5,70 ± 0,030	0,53	0,984 ± 0,001	0,16	5,91 ± 0,018	0,32	0,988 ± 0,000	0,06
7	5,66 ± 0,023	0,41	0,987 ± 0,002	0,21	5,82 ± 0,009	0,16	0,992 ± 0,002	0,20
10	5,68 ± 0,030	0,54	0,990 ± 0,001	0,15	5,86 ± 0,008	0,14	0,994 ± 0,002	0,20
12	5,67 ± 0,026	0,47	0,986 ± 0,002	0,21	5,97 ± 0,012	0,21	0,995 ± 0,003	0,30

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Diante do exposto, verifica-se que as características organolépticas se mantiveram normais sem alterações consideráveis, e as características físico-químicas (pH e densidade) não apresentaram variações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) durante os ciclos de congelamento e descongelamento, indicando que a adição do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq. na fórmulação cosmética desenvolvida neste trabalho, não interferiu na estabilidade da base galênica utilizada. Portanto, os resultados obtidos para o teste do ciclo de congelamento e descongelamento, dos cosméticos Sérum gel pimenta biquinho e Controle, foram considerados adequados, pois todas as amostras

mantiveram-se estáveis durante os 12 dias de teste, não sendo observados sinais de instabilidades organolépticas ou físico-químicas.

#### 4.10.2.3 Estudo de estabilidade acelerada

O teste de estabilidade acelerada foi realizado com o intuito de prever e estimar a estabilidade e o tempo de vida útil das formulações cosméticas, em um intervalo de tempo maior que no teste do ciclo de congelamento e descongelamento, e sob condições de temperatura menos intensas (BRASIL, 2004).

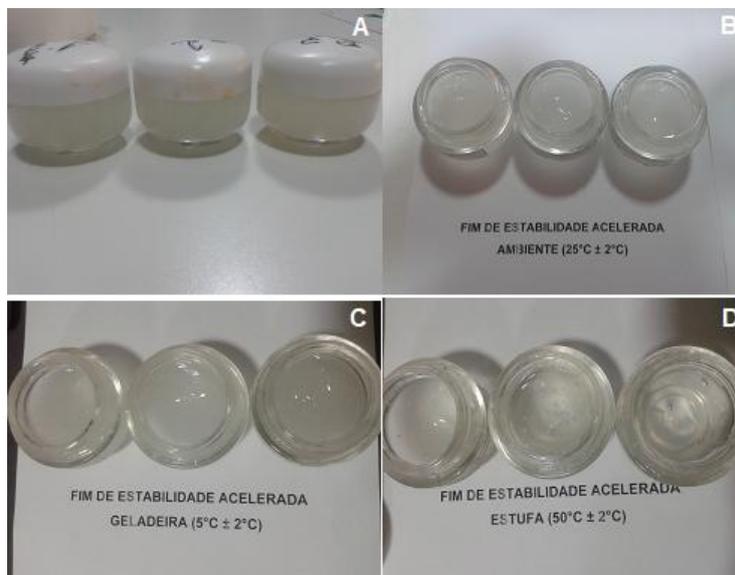
As amostras do Sêrum gel pimenta biquinho e do cosmético Controle, submetidas ao teste de estabilidade acelerada, permaneceram estáveis em relação às suas características organolépticas (aspecto, cor e odor), durante os 90 dias de estudo, e em todas as condições de temperatura nos quais foram submetidos (Figuras 30 e 31). A avaliação dos parâmetros organolépticos em uma formulação cosmética é de fundamental importância, uma vez que são fatores determinantes para a aceitação do produto pelos consumidores. Verificar periodicamente possíveis alterações dessas características em um cosmético, ao longo do teste de estabilidade acelerada, pode assegurar que mudanças indesejáveis que poderão ocorrer no produto não serão percebidas pelos sentidos e não trarão quaisquer tipos de prejuízos futuros (BRASIL, 2004).

**Figura 30:** Amostras do Sêrum gel pimenta biquinho: (A) Antes do teste de estabilidade acelerada; (B) Após o teste de estabilidade acelerada a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ); (C) Após o teste de estabilidade acelerada na geladeira ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ); (D) Após o teste de estabilidade acelerada na estufa ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ).



Fonte: O próprio autor

**Figura 31:** Amostras do cosmético Controle: (A) Antes do teste de estabilidade acelerada; (B) Após o teste de estabilidade acelerada a temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ); (C) Após o teste de estabilidade acelerada na geladeira ( $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ); (D) Após o teste de estabilidade acelerada na estufa ( $50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



Fonte: O próprio autor.

As Tabelas 20 e 21, apresentaram os perfis da estabilidade das formulações cosméticas S rum gel pimenta biquinho e do controle, em rela o aos parâmetros físico-químicos (valores de pH e densidade), verificados ao longo do teste de estabilidade acelerada.

**Tabela 20:** Resultados obtidos para a avalia o do pH e da densidade durante os testes de estabilidade acelerada para o cosmético Serum gel pimenta biquinho.

Tempo (dias)	Temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )		Geladeira ( $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )		Estufa ( $50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )	
	pH*	Densidade* (g/mL)	pH*	Densidade* (g/mL)	pH*	Densidade* (g/mL)
0	$5,68 \pm 0,025$	$0,984 \pm 0,002$	$5,70 \pm 0,025$	$0,984 \pm 0,002$	$5,65 \pm 0,025$	$0,983 \pm 0,001$
7	$5,61 \pm 0,021$	$0,981 \pm 0,002$	$5,59 \pm 0,042$	$0,985 \pm 0,001$	$5,59 \pm 0,075$	$0,984 \pm 0,000$
15	$5,69 \pm 0,015$	$0,980 \pm 0,002$	$5,66 \pm 0,072$	$0,981 \pm 0,001$	$5,60 \pm 0,020$	$0,985 \pm 0,002$
30	$5,66 \pm 0,064$	$0,981 \pm 0,001$	$5,57 \pm 0,023$	$0,983 \pm 0,004$	$5,53 \pm 0,012$	$0,987 \pm 0,001$
60	$5,58 \pm 0,015$	$0,984 \pm 0,001$	$5,64 \pm 0,015$	$0,986 \pm 0,001$	$5,33 \pm 0,027$	$0,979 \pm 0,001$
90	$5,58 \pm 0,020$	$0,976 \pm 0,003$	$5,62 \pm 0,006$	$0,978 \pm 0,002$	$5,28 \pm 0,036$	$0,988 \pm 0,000$

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 21:** Resultados obtidos para a avaliação do pH e da densidade durante os testes de estabilidade acelerada para o cosmético Controle.

Tempo (dias)	Temperatura ambiente (25 ± 2°C)		Geladeira (5 ± 2°C)		Estufa (50 ± 2°C)	
	pH*	Densidade* (g/mL)	pH*	Densidade* (g/mL)	pH*	Densidade* (g/mL)
0	5,83 ± 0,015	0,987 ± 0,001	5,82 ± 0,015	0,987 ± 0,001	5,82 ± 0,015	0,987 ± 0,000
7	5,79 ± 0,046	0,988 ± 0,002	5,74 ± 0,042	0,986 ± 0,001	5,88 ± 0,053	0,987 ± 0,012
15	5,86 ± 0,046	0,987 ± 0,002	5,89 ± 0,053	0,981 ± 0,007	5,91 ± 0,011	0,989 ± 0,010
30	5,83 ± 0,017	0,994 ± 0,004	5,83 ± 0,044	0,988 ± 0,005	5,83 ± 0,044	0,986 ± 0,020
60	5,80 ± 0,026	0,995 ± 0,004	5,83 ± 0,031	0,996 ± 0,000	5,66 ± 0,044	0,988 ± 0,000
90	5,75 ± 0,030	0,995 ± 0,001	5,77 ± 0,031	0,995 ± 0,002	5,65 ± 0,017	1,000 ± 0,000

\*Resultados obtidos com seus respectivos desvios padrão.

De acordo com os resultados obtidos para os pHs, tanto o cosmético Sérum gel pimenta biquinho quanto o cosmético Controle, não demonstraram diferenças estaticamente significativas ( $p > 0,05$ ) durante o período de 90 dias que foram avaliados. As pequenas variações que foram observadas no decorrer das avaliações dos pHs, são indícios de que não ocorreram reações críticas indesejáveis entre os componentes das formulações cosméticas pesquisadas, por isso mantiveram-se dentro das condições almejadas. A avaliação do pH no decorrer do teste de estabilidade acelerada, é de grande relevância para investigar alterações na estrutura da formulação cosmética, que nem sempre são notórios visualmente (BRASIL, 2004). O valor médio observado para o pH nas amostras foram entre 5,28 a 5,91, sendo todas biocompatíveis com o pH fisiológico da pele em geral, cujo valor está entre 4,0 a 7,0 (LAMBERS et al., 2006)

Com relação à densidade das amostras avaliadas, foram constatadas que, durante todo o teste de estabilidade acelerada ocorrida em 90 dias, não ocorreram variações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), de modo que as amostras permaneceram estáveis se comparadas ao tempo inicial. A manutenção da densidade também é um parâmetro importante a ser avaliado durante o teste de estabilidade acelerada de uma formulação cosmética, isto por que, assim como o pH a densidade é uma ferramenta importante para pesquisar possíveis alterações na estrutura da formulação. No caso de amostras líquidas ou semi-sólidas este parâmetro pode indicar a incorporação de ar ou a perda de componentes voláteis (BRASIL, 2004).

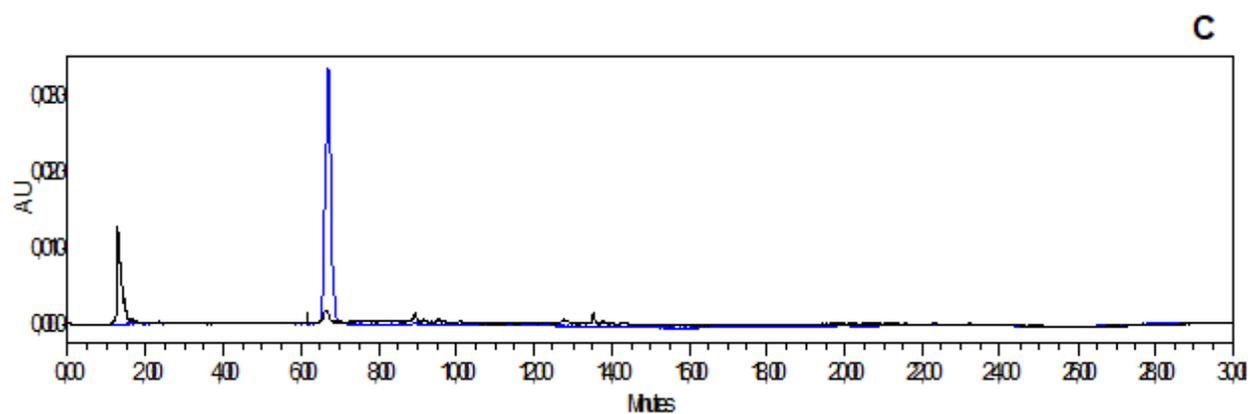
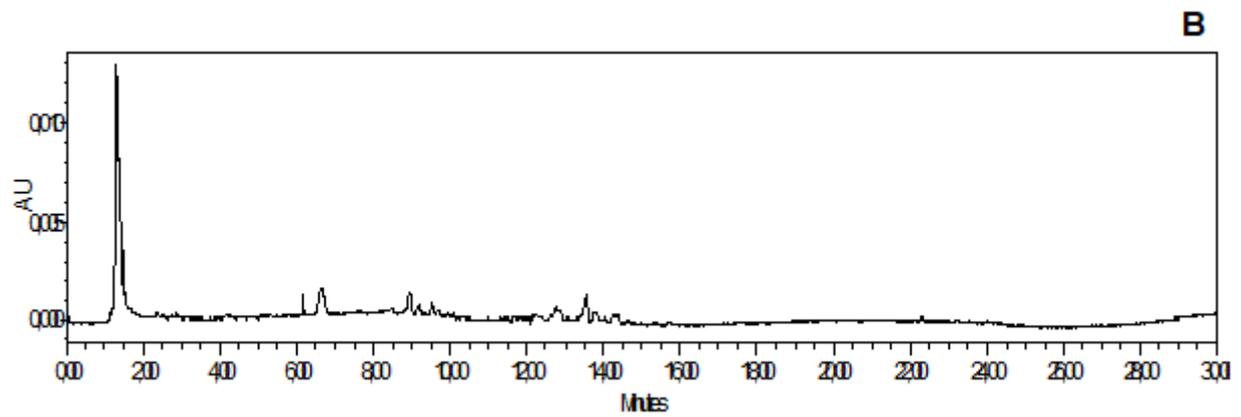
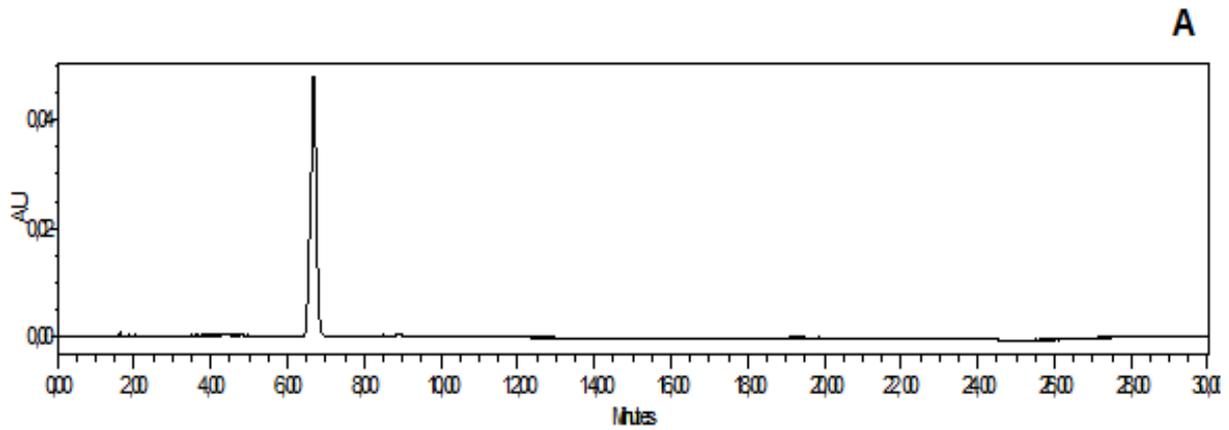
Mediante os resultados expostos, verificou-se que as formulações cosméticas S rum gel pimenta biquinho e Controle, apresentaram características organolépticas adequadas, não sendo observadas varia es consideráveis no aspecto, cor e odor, ou ainda, separa o de fases, coalescência ou precipitado. Os parâmetros físico-químicos, tais como pH e densidade, não demonstraram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) ao longo dos 90 dias de teste, com varia es abaixo de 10%, se comparado às amostras de referência no tempo inicial (BRASIL, 2004). Estas informa es indicam que as formula es cosméticas avaliadas mantiveram-se estáveis ao longo do teste de estabilidade acelerada durante o intervalo de tempo de 90 dias, e que a adi o do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq. (pimenta biquinho), na f rmula o cosmética desenvolvida neste trabalho, parece não interferir na estabilidade da base galênica utilizada.

#### **4.11 Análise cromatográfica da capsantina no fitocosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado de *Capsicum chinense* Jacq. por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência**

A identifica o do marcador capsantina no fitocosmético S rum gel pimenta biquinho, elaborado a partir do extrato padronizado de *C. chinense* Jacq., foi realizado por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, de acordo com as condi es cromatográficas descritas no  tem 3.6 deste trabalho. O pico da capsantina foi identificado pelo seu tempo de reten o ( $t_r = 6,316$ ), em compara o com os valores obtidos para o padrão da capsantina (Figura 32). A detec o da capsantina na amostra do fitocosmético foi feita no comprimento de onda de absor o máxima de 450nm.

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de arranjo de diodos, mostrou ser um método adequado para a detec o da capsantina no S rum gel pimenta biquinho, visto que permitiu a identifica o do marcador estudado e boa resolu o do pico encontrado, mesmo para um nível baixo de detec o. Em geral o detector de fotodiodos permite a detec o a vários comprimentos de onda, e quando   exigida uma alta sensibilidade, este método   uma das melhores alternativas. Além disso, este detector facilita a identifica o de xantofilas sob a forma esterificada, como   o caso da capsantina (QUIRÓS & COSTA, 2006; OLIVER & PALOU, 2000).

**Figura 32:** Cromatogramas HPLC-PDA (A) Padrão de Capsantina; (B) Da Capsantina no S erum gel pimenta biquinho a 400 mg/mL; (C) Sobreposi o de A e B. Condi es cromatográficas: Coluna Promosil C18, 250 x 4.6 mm, 5  m, 29 C / Acetona: H<sub>2</sub>O, gradiente / 1,5 mL/min.



Fonte: Software Enpower 2.0.

Os fitocosméticos ou cosméticos são misturas complexas de ativos naturais e substâncias sintéticas com diferentes concentrações, e esta condição pode ter inviabilizado a quantificação da capsantina no Sérum gel pimenta biquinho, por método cromatográfico, uma vez que a concentração deste marcador químico no produto encontrava-se abaixo do limite de quantificação. Apesar de existirem outros carotenoides presentes na formulação cosmética do Sérum gel pimenta biquinho, nesta amostra foi identificado o marcador químico capsantina (Figura 32).

O resultado apresentado aponta a presença do carotenoide capsantina no Sérum gel pimenta biquinho, desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq. (pimenta biquinho), que pode ser um indicativo de possível atividade antioxidante da formulação cosmética.

#### **4.12 Determinação da atividade antioxidante total *in vitro* da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético obtidos a partir da *Capsicum chinense* Jacq.**

Neste trabalho, foram utilizadas três metodologias para avaliar o potencial antioxidante total da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético sérum gel, obtidos a partir da *Capsicum chinense* Jacq. Para tanto, as metodologias aplicadas nos testes foram: DPPH; Sistema  $\beta$ caroteno/ácido linoleico e ABTS.

As pimentas do gênero *Capsicum* possuem propriedades antioxidantes, cujos frutos são ricos em metabólitos secundários com atividade inibidora da oxidação, particularmente as vitaminas A, E e C, os pigmentos vegetais carotenoides, os flavonoides e demais compostos fenólicos. Estes compostos oferecem ação inativadora e protetora contra os diversos danos provocados pelos radicais livres, e isto tem despertado o interesse da comunidade científica. Por isso, esta capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de várias metodologias que incluem a remoção de um radical peroxil, a capacidade de redução de metais, a capacidade de remoção de radicais orgânicos, peroxidação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil e a quantificação de subprodutos formados no decorrer da peroxidação de lipídeos. Na literatura estão disponíveis diversos métodos para a avaliação da atividade antioxidante total, entretanto alguns são mais indicados que

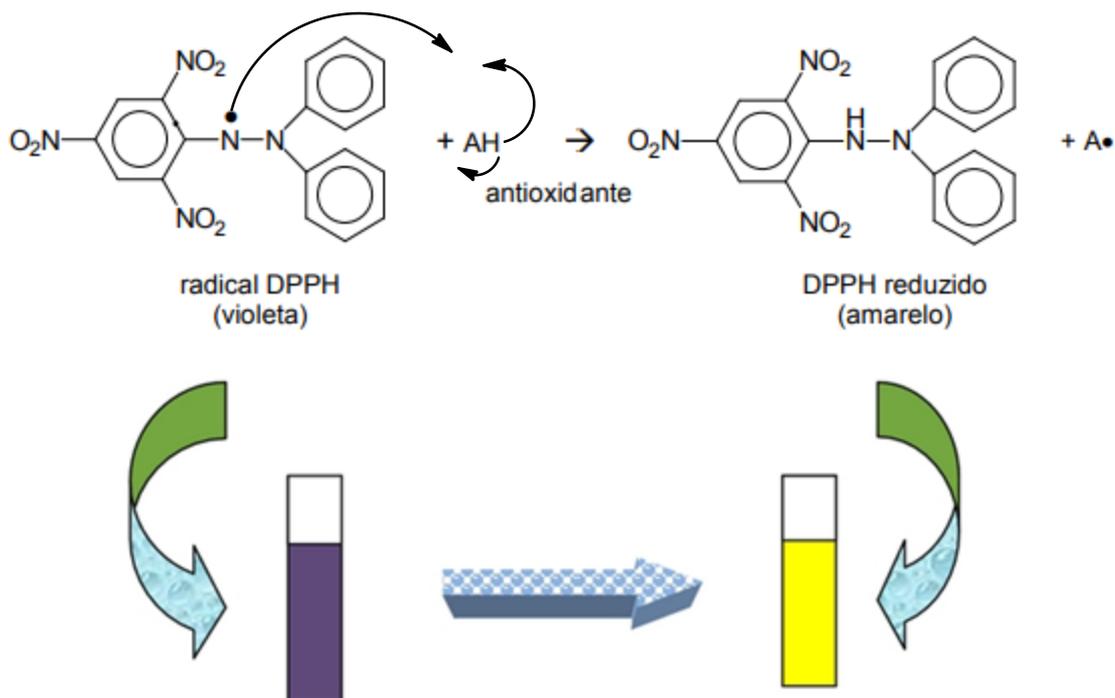
outros, dependendo das características dos metabólitos secundários que constituem os vegetais (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

#### 4.12.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

O método químico para a avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH se baseia na reação de redução entre compostos antioxidantes e o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), estabilizado em solução metanólica. A estabilidade do DPPH em solução metanólica, deve-se ao fato dos álcoois serem excelentes doadores e receptores de átomos de hidrogênio, que por consequência proporcionam um aumento significativo na solubilidade e na taxa constante de transferência de hidrogênio para o radical DPPH<sup>•</sup>, principalmente para o átomo de nitrogênio que se encontra ligado a dois anéis aromáticos. A redução do DPPH<sup>•</sup> é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorvância em comprimento de onda de 515nm. O DPPH é um radical orgânico composto por átomos de nitrogênio, estável, de coloração violeta e que possui absorção no comprimento de onda entre 515-520 nm (PRADO, 2009; OLIVEIRA, 2015).

A capacidade de captura do radical livre DPPH pelas amostras constituídas por substâncias antioxidantes, é estabelecida por sua habilidade em transferir átomos de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. Na presença de um agente antioxidante, o átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio diminuindo a intensidade de absorção, e conseqüentemente a solução com o radical de coloração violeta perde cor tornando-se amarela (Figura 33). O método do DPPH<sup>•</sup> é considerado um ensaio fácil, rápido e estável, por isso tem sido muito utilizado para se determinar a atividade antirradicalar dos antioxidantes. Frequentemente os resultados obtidos para o ensaio do DPPH<sup>•</sup> são apresentados através do valor de IC<sub>50</sub>, proporcionando uma melhor análise, uma vez que esse parâmetro indica a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% o DPPH, e quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior será a atividade antioxidante da amostra (LIMA, 2008; ARBOS *et al.*, 2010).

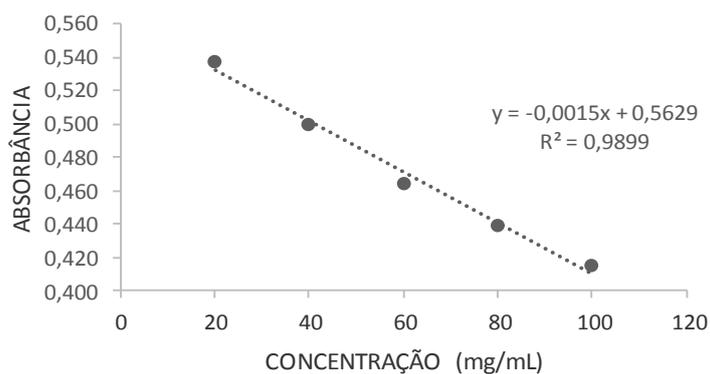
**Figura 33:** Estrutura molecular do DPPH• e reação de redução na presença de um antioxidante



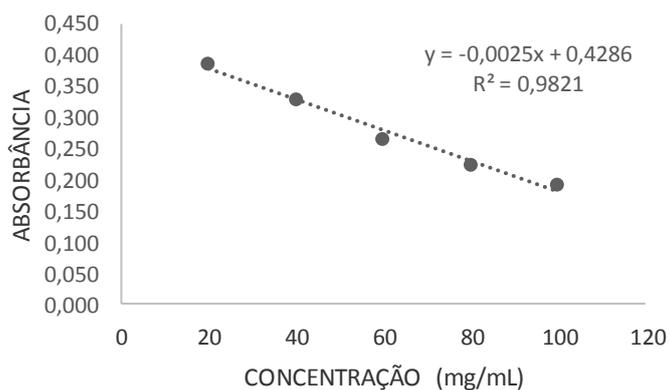
**Fonte:** Adaptado de Molyneux (2004)

As Figuras 34, 35 e 36, mostram os gráficos relacionando a concentração das amostras analisadas (Matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e cosmético Sérum gel pimenta biquinho) com suas respectivas absorvâncias, assim como as equações da reta e seus coeficientes de correlação, obtidos por regressão linear das curvas analíticas. A determinação da atividade antioxidante foi feita com base na curva analítica de captura do radical DPPH pelos compostos antioxidantes presentes nas soluções extrativas, onde a partir da equação da reta originada foi possível calcular a quantidade de amostra (solução extrativa), necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, o IC<sub>50</sub> (Tabela 22).

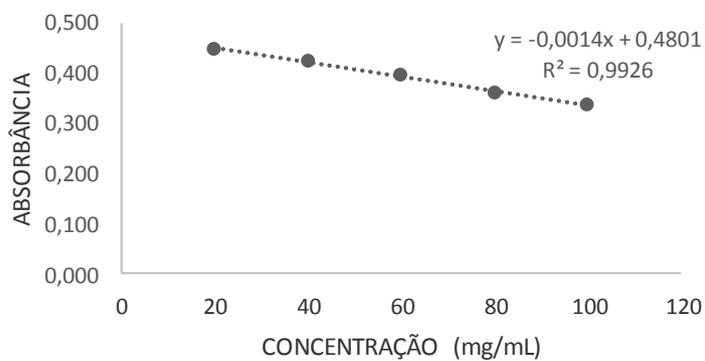
**Figura 34:** Curva analítica da matéria-prima obtida a partir da *C. chinense* Jacq.



**Figura 35:** Curva analítica do extrato líquido padronizado de *C. chinense* Jacq.



**Figura 36:** Curva analítica do fitocosmético sérum gel de *C. chinense* Jacq.



**Tabela 22:** Atividade antioxidante pelo método DPPH obtidos para matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e fitocosmético Sérum gel de *C. chinense* Jacq.

Amostra	Atividade antioxidante em IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Matéria-prima vegetal	194,6
Extrato líquido padronizado	73,7
Fitocosmético Sérum gel	100
BHT	3,9

A atividade antioxidante do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq. apresentou-se superior se comparado ao fitocosmético Sérum gel e a matéria-prima vegetal, uma vez que o valor do seu IC<sub>50</sub> foi menor do que os resultados obtidos para as demais amostras citadas. No entanto, é necessário salientar que os extratos vegetais são soluções concentradas obtidas a partir de matérias primas vegetais, que passam por processos extrativos tendo em vista a obtenção seletiva de metabólitos secundários, que por sua vez apresentam propriedades antioxidantes (RODRIGUES *et al.*, 2016). Os resultados obtidos apontam o extrato líquido padronizado como uma boa fonte de compostos antioxidantes, ainda que tenha apresentado menor eficiência em comparação ao padrão BHT. O BHT é um antioxidante sintético muito utilizado no desenvolvimento de produtos industrializados. A estrutura fenólica e o alto grau de pureza deste composto lhe conferem potente atividade antioxidante (RAMALHO & JORGE, 2006).

A avaliação do IC<sub>50</sub> para a matéria-prima vegetal, se comparado com o resultado obtido para o extrato líquido padronizado, comprova a relevância de se promover a extração dos metabólitos secundários a partir dos insumos vegetais, visto que o extrato líquido padronizado apresentou maior eficiência antioxidante.

Diversos estudos apontam os extratos vegetais como detentores de atividade antioxidante, sugerindo sua utilização em formulações cosméticas tópicas para prevenção e tratamento dos danos causados pelos radicais livres (FRIES & FRASSON, 2010). O desenvolvimento de um produto cosmético antioxidante é complexo, pois existem vários fatores que podem influenciar no desempenho da formulação. Um destes fatores é a

redução da concentração dos biocompostos antioxidantes presentes no extrato líquido padronizado, que são diluídos durante o processo de fabricação da mistura complexa que constitui o cosmético (FONSECA *et al.*, 2008). Deste modo a atividade antioxidante do fitocosmético fica de certa forma comprometida, se comparada ao do extrato líquido padronizado.

OLIVEIRA (2011), avaliando a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de quatro variedades de pimentas do gênero *Capsicum* pelo método DPPH, encontrou valores de IC<sub>50</sub> equivalentes a 480,02 µg/mL para a pimenta malagueta, 1008,24 µg/mL para a pimenta dedo-de-moça, 1798,93 µg/mL para a pimenta de cheiro e 651,14 µg/mL para a pimenta de cheiro ardida.

NASCIMENTO (2012), ao analisar a atividade antioxidante do extrato etanólico da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), utilizando a técnica de captura do radical DPPH, obteve um valor de IC<sub>50</sub> correspondente a 302,3 µg/mL para o extrato etanólico, e 3,3 µg/mL para o padrão ácido ascórbico.

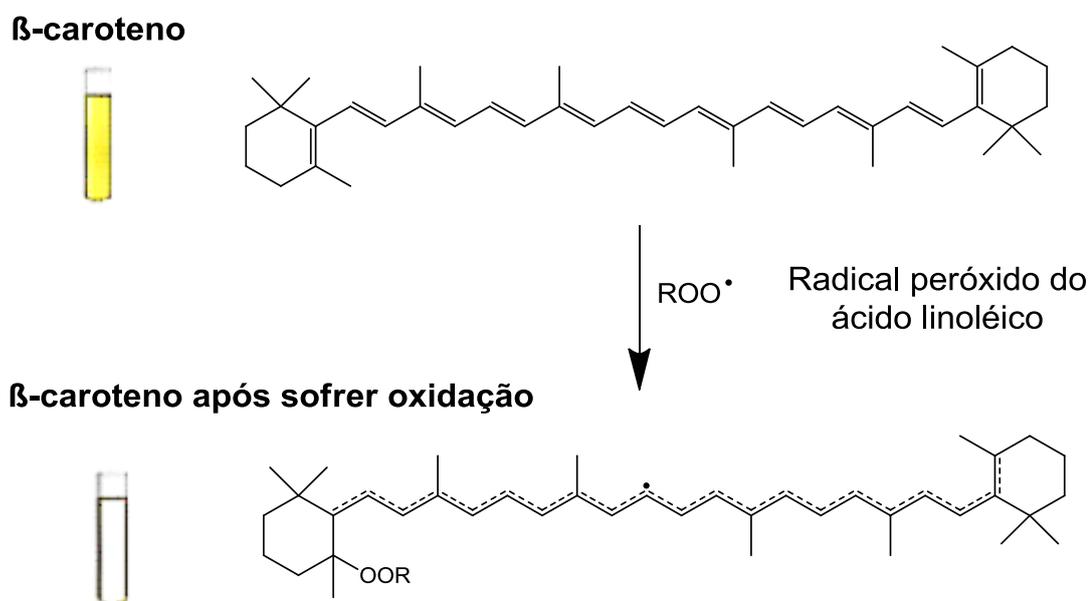
Apesar das diferenças de IC<sub>50</sub> observadas neste estudo, os resultados obtidos pelo ensaio de DPPH foram adequados, indicando que a matéria-prima vegetal, o extrato líquido padronizado e o fitocosmético sérum gel, obtidos a partir da *C. chinense* Jacq. foram capazes de doar átomos de hidrogênio estabilizando o radical DPPH, apresentando deste modo atividades antioxidantes consideráveis (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

#### 4.12.2 Determinação da atividade antioxidante total no Sistema $\beta$ -caroteno / ácido linoléico

O método se baseia na descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido linoléico, que ocorre em função, das estruturas radiculares formadas pela oxidação do ácido linoleico atacar as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, que por sua vez perde seu cromóforo resultando na despigmentação da solução (Figura 37). Este ensaio tem a capacidade de estimar a relativa habilidade que os compostos antioxidantes apresentam, de seqüestrar o radical peróxido formado pela peroxidação lipídica do ácido linoléico ( $ROO^\bullet$ ), que por sua vez oxida o  $\beta$ -caroteno presente na emulsão (MILLER, 1971; HUANG e WANG, 2004; SILVA, 2008).

Para a realização do método frequentemente utiliza-se um antioxidante sintético como padrão positivo para comparação dos resultados, e os mais utilizados são o BHT (butilhidroxidotolueno) e o trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico). Esse método tem sido muito utilizado para analisar matrizes complexas constituídas por compostos termolábeis, uma vez que durante a realização do ensaio não são exigidas o uso de elevadas temperaturas (LIMA, 2008)

**Figura 37:** Despigmentação da solução de  $\beta$ -Caroteno proporcionada pelos radicais livres formados a partir da oxidação do ácido linoléico.



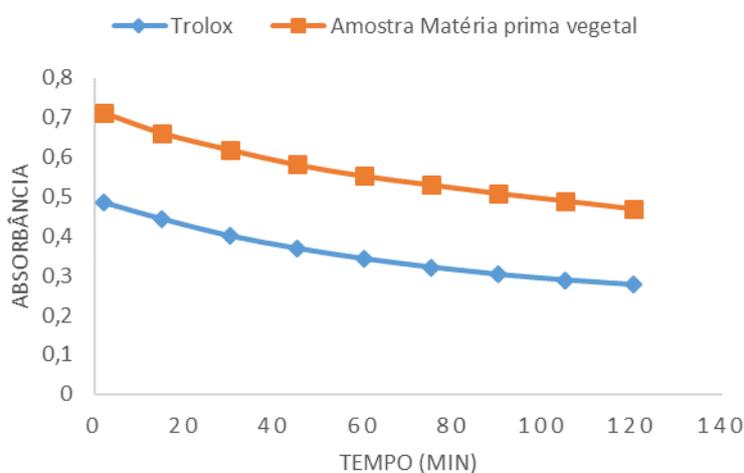
**Fonte:** Adaptado de Fotia & Amorati (2009).

Na Tabela 23 estão descritos os resultados de inibição da oxidação lipídica promovidas pelas amostras em estudo, obtidas pelo ensaio de avaliação da atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. O acompanhamento da atividade foi realizado em intervalos de 15 min, durante 120 min. A partir dos valores das absorbâncias, foram construídas as figuras 38, 39 e 40 onde encontram se representadas as cinéticas dos potenciais antioxidantes pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico (% de inibição) para as amostras da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético S rum gel obtidos a partir da *C. chinense* Jacq., a pimenta biquinho.

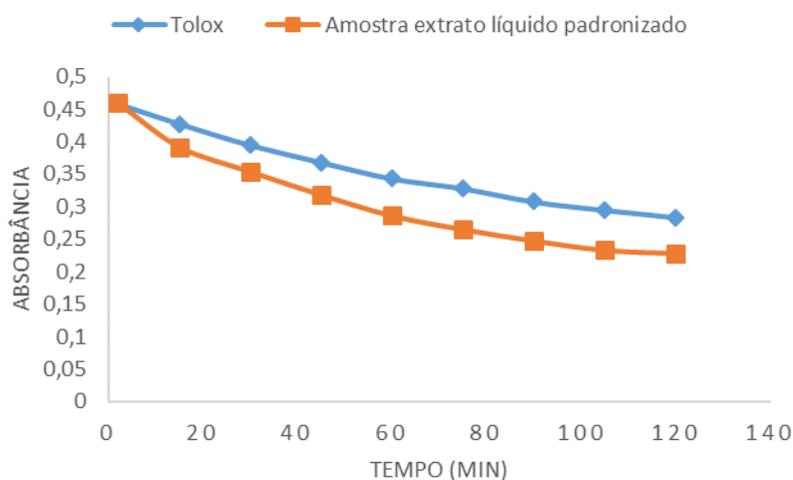
**Tabela 23:** Atividade antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para a matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e fitocosmético s rum gel da *C. chinense* Jacq.

Amostra	Inibi�o da oxida�o do $\beta$ -caroteno (%)	Inibi�o da oxida�o do $\beta$ -caroteno pelo Trolox (%)
Matéria-prima vegetal	33,03	42,73
Extrato líquido padronizado	42,08	52,24
Fitocosmético s�rum gel	19,35	47,62

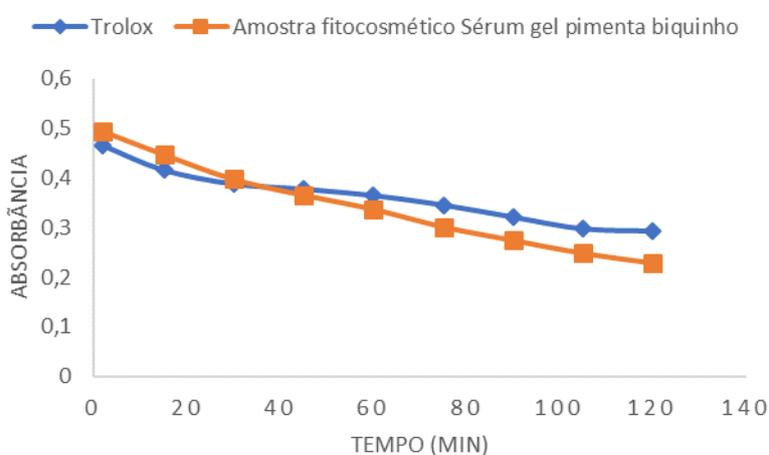
**Figura 38:** Cinética de inibi o da oxida o no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico da matéria-prima vegetal obtida a partir da *C. chinense* Jacq. e do controle padrão trolox.



**Figura 39:** Cinética de inibição da oxidação no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do extrato líquido padronizado obtido a partir da *C. chinense* Jacq. e do controle padrão trolox.



**Figura 40:** Cinética de inibição da oxidação no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do fitocosmético sérum gel obtido a partir da *C. chinense* Jacq. e do controle padrão trolox.



Analisando a Tabela 23, é possível observar que os percentuais de inibição da oxidação proporcionados pelas amostras da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, são menores que os valores obtidos utilizando o padrão trolox. Isto pode ser justificado pelo alto grau de pureza do trolox, que por sua vez é um análogo do  $\alpha$ -tocoferol hidrossolúvel, que devido à sua solubilidade em água apresenta potente atividade antioxidante (WU *et al.*, 1991).

Dentre as amostras estudadas, a que melhor contribuiu para a preservação do  $\beta$ -caroteno contra a oxidação foi o extrato líquido padronizado, seguida da matéria-prima vegetal. O fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, foi o que apresentou menor eficiência contra a oxidação do sistema, provavelmente por apresentar menor concentração de metabólitos secundários antioxidantes disponíveis na mistura complexa da base que compõem o fitocosmético, ou pela quantidade do extrato líquido padronizado empregado na elaboração do cosmético, ser inferior ao necessário para produzir um efeito antioxidante mais adequado (FONSECA *et al.*, 2008).

Outro fator que pode interferir no desempenho da amostra avaliada, é o tipo do método utilizado para determinar a sua capacidade antioxidante. Os antioxidantes podem ser polares, apolares ou anfipáticos, assim a escolha do método de análise deve ser feita conforme a natureza dos compostos investigados. A análise da atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, recebe influência de uma série de fatores, dentre os quais, o mais importante deve-se a polaridade das substâncias presentes nos extratos vegetais, já que o meio de reação é caracterizado por ser uma emulsão apresentando conjuntamente, regiões polares e apolares (ADOM *et al.*, 2002; PRADO, 2009).

No método de determinação da capacidade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, é possível observar uma redução gradativa da absorbância ao analisar amostras com baixas concentrações de agentes antioxidantes (ALMEIDA *et al.*, 2006). Por isso, ao avaliar as curvas de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno para as amostras pesquisadas neste estudo, foi possível observar um menor decréscimo das absorbâncias, para o extrato líquido padronizado (Figura 39), se comparado com as amostras matéria-prima vegetal e fitocosmético sérum gel (Figuras 38 e 40). Estes resultados corroboram com os valores obtidos para a inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno (Tabela 23), confirmando uma concentração maior de agentes antioxidantes disponíveis no extrato líquido padronizado. Percebe-se, ainda, que a partir dos 80 minutos, todas as amostras, inclusive o fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, atuaram a favor da proteção da emulsão contendo o  $\beta$ -caroteno, ou seja, não demonstraram decréscimo da absorbância assim como observado, também, para o padrão trolox.

COSTA *et al.* (2010), avaliando as atividades antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, do pimentão Magali (*Capsicum annum* L.), obtiveram valores de 33,76%; 47,82%; 35,54% e 30,80% respectivamente.

Em estudo, PEREIRA (2013) avaliou o efeito antioxidante de extratos de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum* em óleo de soja sob diferentes condições de estocagem, para o ensaio no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, foram encontrados os valores de 23,5 % para a pimenta Malagueta (*Capsicum frutescens*); 41,6 % para a pimenta Cumari (*Capsicum baccatum*); 9,5 % para a pimenta Bode (*Capsicum chinense*) e 33,9 % para a pimenta Dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*).

Observa-se que todos os valores citados estão próximos ou bem abaixo dos valores de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno alcançados pelo uso da matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e fitocosmético Sérum gel, obtidos a partir da pimenta biquinho.

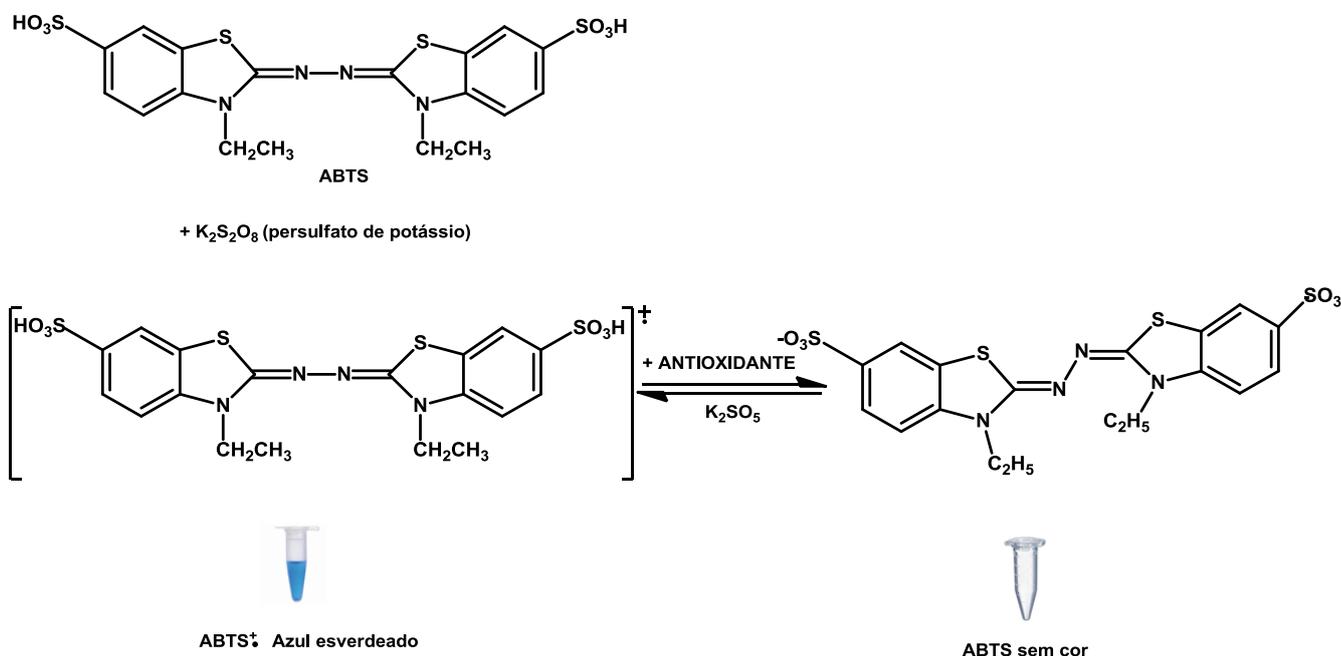
Os resultados apresentados neste estudo, apontam que as amostras analisadas atuaram na inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno na emulsão, proporcionando sua proteção contra a degradação promovida pelos radicais livres formados a partir do ácido linoléico, confirmando deste modo as suas atividades antioxidante (MILLER, 1971).

#### 4.12.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>:

O método de determinação da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) baseia-se na capacidade que os antioxidantes possuem em capturar o cátion ABTS<sup>•+</sup>. A captura deste radical promove um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas graficamente (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURACALIXTO, 2006).

De acordo com RE *et al.* (1999), o ensaio fundamenta-se na geração do radical ABTS<sup>•+</sup> estável, de coloração azul esverdeado, através da reação de oxidação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante, o ABTS<sup>•+</sup> é reduzido a ABTS propiciando a perda da coloração da solução (Figura 41). A porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup> é determinada em função do Trolox, à medida que a solução perde sua coloração. Este método é aplicável nos estudos de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

**Figura 41:** Redução do ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação a partir do persulfato de potássio



Fonte: Rufino *et al.*, 2007.

O método ABTS<sup>•+</sup> é um dos testes mais rápidos para a determinação da atividade antioxidante e que oferece resultados mais reprodutíveis, além de apresentar excelente estabilidade e oferecer vários máximos de absorção e uma boa solubilidade (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

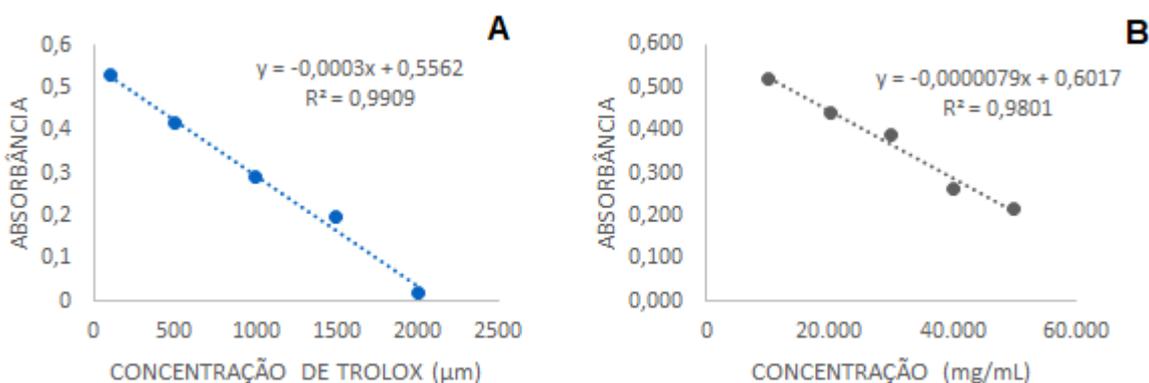
Na Tabela 24 estão descritos os valores referentes a captura do radical ABTS<sup>•+</sup>, pelas amostras da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético sérum gel, obtidos a partir da *C. chinense* Jacq. As Figuras 42, 43 e 44, mostram os gráficos relacionando a concentração das amostras analisadas com suas respectivas absorbâncias (para o padrão trolox, matéria-prima vegetal, o extrato líquido padronizado e o fitocosmético Sérum gel) assim como as equações da reta e seus coeficientes de correlação obtidos por regressão linear das curvas analíticas.

**Tabela 24:** Atividade antioxidante equivalente ao trolox da matéria-prima vegetal, do extrato líquido padronizado e do fitocosmético sérum gel obtidos a partir da *C. chinense* Jacq.

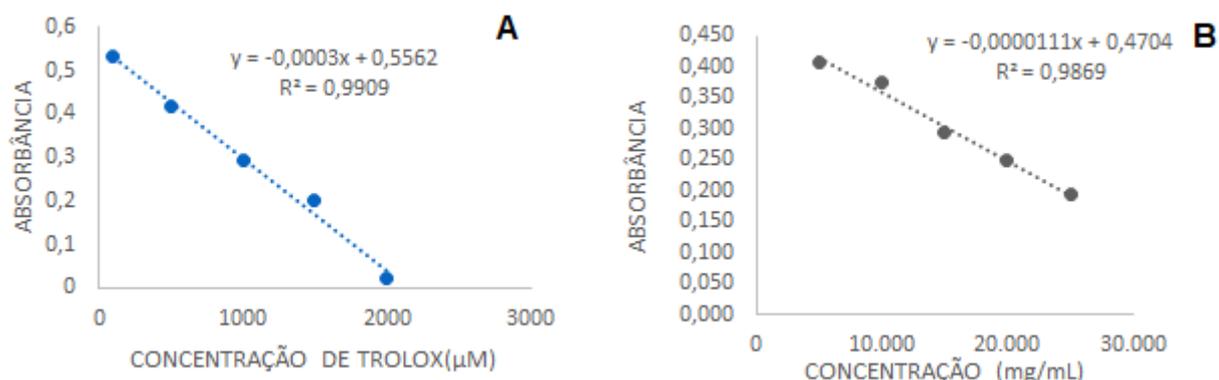
Amostra	Atividade antioxidante ( $\mu\text{M}$ de Trolox/g de amostra)
Matéria-prima vegetal	22,87
Extrato líquido padronizado	51,81
Fitocosmético sérum gel	900

Legenda:  $\mu\text{M}$ : Micromol; g: Grama.

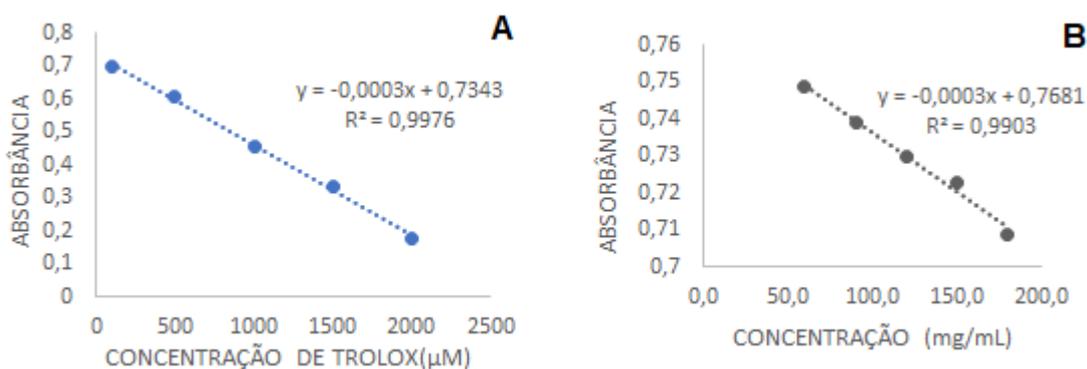
**Figura 42:** Curva analítica: (A) Padrão trolox; (B) Matéria-prima vegetal obtida a partir da *C. chinense* Jacq.



**Figura 43:** Curva analítica: (A) Padrão trolox; (B) Extrato líquido padronizado obtido a partir da *C. chinense* Jacq.



**Figura 44:** Curva analítica: (A) Padrão trolox; (B) Fitocosmético Sérum gel obtido a partir da *C. chinense* Jacq.



Dentre as amostras analisadas neste trabalho, a que apresentou melhor habilidade de captura do radical  $ABTS^{\bullet+}$  foi o fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, cujo resultado obtido foi consideravelmente maior frente ao menor valor encontrado, que foi expresso para a matéria-prima vegetal. Isso, hipoteticamente, se deve ao fato do radical  $ABTS^{\bullet+}$  ser mais sensível à presença de compostos antioxidantes e, desta forma, a porcentagem da inibição, para esta amostra, neste sistema, foi maior quando comparada com os demais ensaios de atividade antioxidante anteriormente realizados. Apesar de ser uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos redutores, e de ser aplicável a sistemas hidrofílicos e lipofílicos, este método mostra uma baixa seletividade do radical na reação com compostos doadores de hidrogênio (RE et al., 1999). Deste modo recomenda-se a utilização de mais de uma técnica para a avaliação

da atividade antioxidante, uma vez que nenhum ensaio usado pontualmente irá representar de forma precisa o potencial antioxidante total de uma amostra (PRIOR e CAO, 1999).

Ao avaliar as curvas analíticas construídas para o padrão de trolox e para as demais amostras (Figuras 42, 43 e 44), os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) entre as coordenadas x e y, apresentaram valores que comprovaram a correlação entre as concentrações pesquisadas e suas respectivas absorvâncias lidas em um comprimento de onda de 734 nm. BRASIL (2014) estabelece que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação, quando a curva analítica for elaborada com padrão o (r) deve ser maior ou igual a 0,99, e para as demais amostras deve ser maior ou igual a 0,98.

Analisando as Figuras 42, 43 e 44, verifica-se que cada amostra possui um comportamento distinto segundo a correlação entre cada uma das concentrações e suas absorvâncias. O fitocosmético sérum gel foi a amostra que apresentou melhor atividade antioxidante, uma vez que ao capturar o radical  $ABTS^{\bullet+}$  a sua absorvância sofreu um maior decréscimo se comparado com as demais amostras matéria-prima vegetal e o extrato líquido padronizado. A curva analítica obtida para o fitocosmético sérum gel, ainda, apresentou grande similaridade com a curva referente ao padrão trolox (Figura 44), demonstrando que os comportamentos antioxidantes de ambas são aparentemente semelhantes.

OLIVEIRA (2011) avaliando a atividade antioxidante *in vitro* pelo método ABTS, para o extrato alcoólico das pimentas Malagueta e de cheiro, verificou valores referentes à 2,89 e 0,35  $\mu\text{M}$  de trolox/g amostra, nesta ordem. PEREIRA (2013), estudando a propriedade antioxidante do extrato da pimenta malagueta utilizando solução hidroalcoólica 96°GL, verificou uma captura do radical  $ABTS^{\bullet+}$  em  $\mu\text{M}$  de trolox inerente à 50,0  $\mu\text{M}$  de trolox/g de amostra.

Pesquisando a atividade antioxidante, em frutos imaturos e maduros da pimenta biquinho, CARVALHO *et al.* (2014) determinaram valores relativos a 60,5 e 50,36  $\mu\text{M}$  de trolox/g de pimenta. Já SILVA (2017), explorando as potencialidades desta mesma variedade de pimenta, constatou que o farelo da pimenta biquinho apresentou uma capacidade antioxidante de 109,49  $\mu\text{M}$  de trolox/g de amostra, e que o corante e o extrato demonstraram valores referentes a 64,22 e 138,01  $\mu\text{M}$  de trolox/g do fruto.

ALVAREZ-PARRILLA *et al.* (2011), observando a capacidade antioxidante de pimentas *C. annuum* frescas, relataram que as pimentas apresentaram elevada atividade antioxidante, com valores entre 27,76 a 55,41  $\mu\text{M}$  de Trolox/ g de amostra. Esses resultados estão próximos aos observados neste trabalho para a matéria-prima vegetal e o extrato líquido padronizado, e consideravelmente bem abaixo se comparado ao resultado obtido para o fitocosmético sérum gel pimenta biquinho.

Todos estes dados sugerem que as amostras matéria-prima vegetal, extrato líquido padronizado e fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, obtidos a partir da *C. chinense* Jacq., demonstraram potencial antioxidante adequado mediante a capacidade em capturar o cátion  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  nas soluções (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

#### **4.13 Avaliação subjetiva da eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica**

Tendo em vista o grande interesse em comprovar a ação de seus produtos, as indústrias realizam testes clínicos de eficácia e segurança em humanos, com acompanhamento médico. Uma preocupação crescente da indústria de cosméticos é evitar possíveis reações adversas nos usuários de seus produtos, já que o consumidor é muito mais crítico quanto à irritação cutânea provocada por um produto cosmético do que por um medicamento de uso tópico. Os testes de uso com o produto acabado, antes da sua introdução no mercado, são importantes para avaliar a segurança e eficácia do produto em condições reais de uso. Pode-se também avaliar, através deste teste, além da alergenicidade as características sensoriais do produto, detectando queixas e comentários adicionais referentes à sua performance (BARAN & MAIBACH, 1994).

As fórmulas cosméticas avaliadas, foram um sérum com base em gel contendo o extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., que foi denominada como Sérum gel pimenta biquinho, e outra fórmula placebo constituída pela mesma base galênica, porém sem a adição do extrato líquido padronizado, sendo esta denominada Controle. A elaboração das duas formulações cosméticas, teve como propósito principal, avaliar *in vivo* a eficácia antirrugas e a apreciabilidade do cosmético desenvolvido a partir do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., mediante a um teste comparativo com o respectivo cosmético placebo.

##### *4.13.1 Eficácia clínica subjetiva antirrugas e aceitabilidade dermatológica*

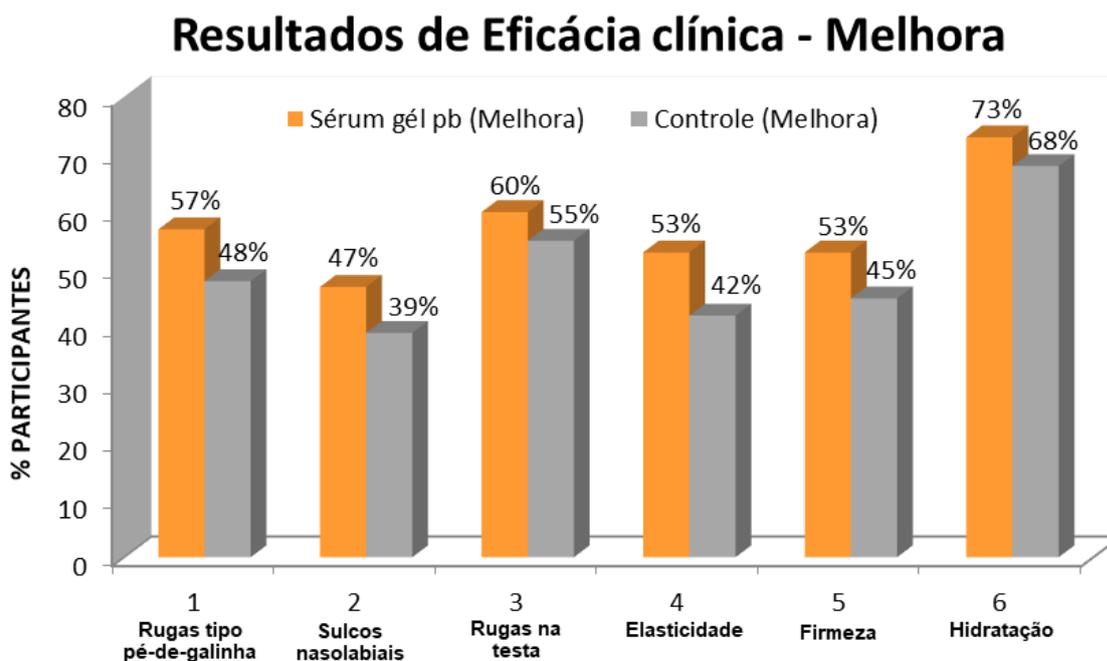
O processo de criação e desenvolvimento de um produto cosmético envolve várias etapas, que devem ser criteriosamente seguidas para que se obtenha um produto com qualidade satisfatória. Este processo vai desde a seleção cuidadosa das matérias-primas até a aplicação de métodos utilizados para se assegurar a qualidade, segurança e eficácia do produto (MAIA CAMPOS, 2002). Após o desenvolvimento da formulação cosmética e a confirmação de sua estabilidade, devem ser realizadas avaliações que atestem a segurança e os atributos de eficácia, com o objetivo de se comprovar o desempenho, os efeitos, assim como a aceitação do produto por parte dos consumidores (GASPAR et al., 2001). Esses testes são realizados por meio de métodos não invasivos, utilizando-se de voluntários e estão diretamente relacionadas as reais condições de uso de um produto cosmético, sendo de grande valia para a elucidação científica (BLANES-

MIRA *et al.*, 2002). Por isso, os ensaios clínicos para avaliação de segurança e da eficácia devem preceder a disponibilidade do cosmético ao mercado (BRASIL, 2003).

O teste de eficácia clínica subjetiva antirrugas fundamenta-se na avaliação médica subjetiva dos participantes para a comparação das condições antes e após o tratamento, baseada em escalas relatadas na literatura. Durante o estudo de eficácia antirrugas do cosmético, são observados os efeitos do produto na melhora da aparência da pele envelhecida, no aumento da firmeza cutânea, na melhora da hidratação e elasticidade, bem como na diminuição de rugas e linhas de expressão (IPCLIN, 2018).

De acordo com o Teste U e os resultados representados na Figura 45, foi possível inferir que as formulações cosméticas avaliadas Sêrum gel pimenta biquinho e Controle, apresentaram diferenças significativas entre os parâmetros avaliados com valor de  $p = 0.035$  ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a formulação cosmética elaborada com o extrato líquido padronizado da *Capsicum chinense* Jacq. possui eficácia anti-aging superior se comparado ao seu respectivo Controle (placebo).

**Figura 45:** Resultados de eficácia clínica subjetiva antirrugas em D30 para o Sêrum gel pimenta biquinho e para o cosmético Controle – melhora



Nas formulações cosméticas elaboradas para este estudo, foram adicionados em suas composições, polipeptídeos com função moduladora da tensão muscular facial, que supostamente agem evitando a liberação de neurotransmissores na junção neuromuscular, prevenindo e reduzindo as linhas e rugas de expressão causadas por movimentos repetitivos. Além disso, os polipeptídeos utilizados estimulam o aumento do número de fibroblastos e aperfeiçoa a sua formação, reforçando ainda mais o combate ao envelhecimento cutâneo (GALENA-Lipotec/Espanha). Entretanto, observa-se que os estudos realizados para a avaliação subjetiva antirugas, demonstraram a potencialização da eficácia para a formulação cosmética constituída pelo extrato líquido padronizado da *Capsicum chinense* Jacq., em comparação com o cosmético Controle (placebo) (Figura 46).

Os resultados obtidos para o uso do produto Sérum gel pimenta biquinho, em relação aos do cosmético Controle, demonstraram um aumento de 9% na melhora das rugas tipo “pé-de-galinha”, 8% na melhora dos sulcos nasolabiais, 5% na melhora das rugas da testa, 11% na melhora da elasticidade, 8% na melhora da firmeza e 5% na melhora da hidratação da pele. O incremento na eficácia do Sérum gel, com a adição do extrato líquido padronizado de pimenta biquinho (*C. chinense* Jacq.), pode estar teoricamente relacionado com a atividade antioxidante desta matriz complexa, visto que, diversos estudos têm apontado os extratos vegetais, particularmente os que são obtidos a partir das pimentas, como detentores de atividade antioxidante, sugerindo sua utilização em formulações tópicas para prevenção e tratamento dos danos causados pela ação dos radicais livres (FRIES & FRASSON, 2010).

Uma tendência de mercado na última década é a associação de antioxidantes a outros ativos com diferentes funções para um efeito combinado. Assim, além de combater o envelhecimento precoce com a inibição dos radicais livres, o produto pode proporcionar redução da tensão muscular da face, hidratação, firmeza e elasticidade à pele (FRIES & FRASSON, 2010). Esta tendência mercadológica aliada à função dos ativos na composição dos cosméticos, justifica a associação dos polipeptídeos com o extrato líquido padronizado da pimenta *Capsicum chinense* Jacq., no tratamento e combate ao envelhecimento precoce da pele.

O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo que interfere na aparência, estrutura e função da pele. A degeneração, enrugamento, ptose e flacidez representam os sinais mais aparentes de uma pele decrépita. A possibilidade de adiar ou

amenizar os sinais do envelhecimento na pele tem conduzido ao avanço de importantes pesquisas, tanto no campo da dermatologia quanto na cosmética, sendo desenvolvidos ao longo dos anos, inúmeros produtos e compostos químicos com esta finalidade (TSUJI *et al.*, 1986).

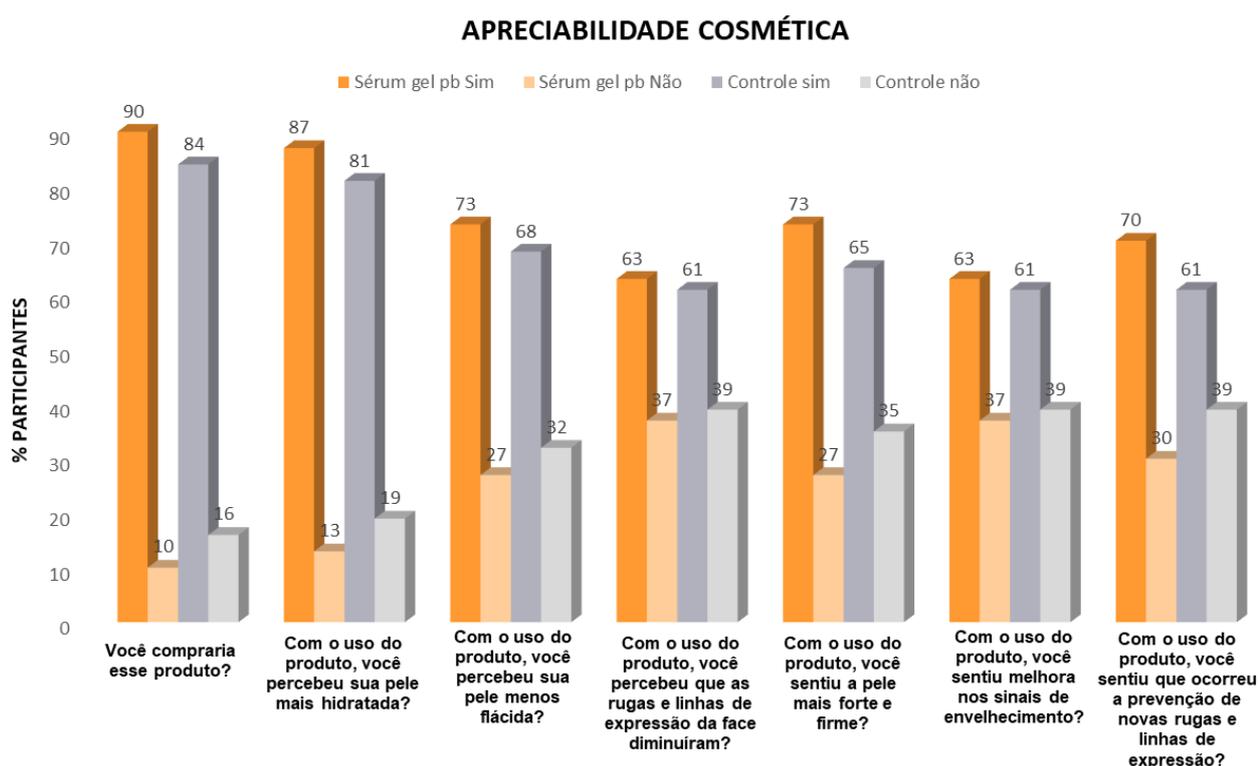
Extratos vegetais com propriedades antioxidantes têm despertado crescente interesse na área fitocosmética, uma vez que fornecem um complexo de substâncias funcionais à pele que podem neutralizar a ação dos radicais livres restabelecendo a homeostasia cutânea conferindo vantagens eudérmicas, o que somente um derivado natural é capaz de proporcionar ao indivíduo (PROSERPIO, 1976). O doseamento de metabólitos secundários (flavonoides, compostos fenólicos e carotenoides) e a quantificação da capsantina, realizados no presente trabalho, comprovaram a existência de biocompostos com potencial antioxidante no extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq. Estes biocompostos são capazes de neutralizar e inativar os radicais livres produzidos na pele, assim, reparando e atenuando os danos oxidativos proporcionados por estas espécies reativas, o que pode justificar a potencialização da eficácia antirrugas no fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho em detrimento ao cosmético Controle (Placebo).

De acordo com o teste de avaliação da aceitabilidade dermatológica, nenhum participante relatou sensações de desconforto e não foram detectados sinais clínicos após  $30 \pm 2$  dias de uso do produto, comprovando a segurança do fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, mesmo com a adição do extrato líquido padronizado de uma pimenta (*C. chinense* Jacq.). Os sinais clínicos são classificados em: eritema (E), efeito sabão (S), edema (Ed), pápulas (Pa), coloração hiperchromia (C), pústulas (Pu), bolhas (Bo), nódulos (No), ressecamento/descamação (Re), crosta (Cr), vesícula (V) (IPCLIN, 2018).

#### 4.13.2 Avaliação da Apreciabilidade Cosmética

A apreciabilidade cosmética do Sérum gel pimenta biquinho e do produto Controle fundamentou-se na opinião dos voluntários que participaram dos testes durante o período de  $30 \pm 2$  dias, e foi averiguada através da aplicação de um questionário. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Figura 46:

**Figura 46:** Respostas dos participantes ao questionário de apreciabilidade cosmética aplicado após  $30 \pm 2$  dias de uso do Sérum gel pimenta biquinho e do cosmético controle



Conforme os valores representados na Figura 46, verificou-se que a adição do extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq. em uma mesma base cosmética, potencializa a eficácia do produto refletindo diretamente na apreciação e aceitação por parte dos participantes. Deste modo, os resultados observados sugerem que o produto fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho apresentou aceitabilidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o cosmético Controle, com  $p = 0,02$ . Os resultados observados ao longo do estudo de apreciabilidade cosmética realizados neste trabalho, são de grande importância como garantia da qualidade, uma vez que foram capazes de mensurar o quanto os consumidores gostaram ou desgostaram dos produtos desenvolvidos, identificaram a presença ou ausência de diferenças sensoriais perceptíveis, definiram

características sensoriais importantes, e foram capazes de identificar particularidades que não poderiam ser detectadas por meio de metodologias analíticas (MUÑOZ *et al.*, 1993).

A escolha de um produto cosmético, pode ser influenciada de maneira importante pelo tipo da base cosmética utilizada e a aceitação do consumidor mediante às suas características sensoriais. Dependendo de maior ou menor aceitabilidade das características sensoriais encontradas no cosmético adquirido, o consumidor pode variar o modo, a frequência e a quantidade de uso do produto, reduzindo drasticamente sua eficácia. Deste modo, a avaliação da eficácia de um produto cosmético em condições reais de uso pode ser um instrumento de grande auxílio para o formulador, garantindo o sucesso e a aprovação de sua formulação. As percepções de qualidade de um produto para um formulador e um consumidor são bem diferentes, uma vez que para o formulador a qualidade do produto está baseada na manutenção de suas características durante o prazo de validade, enquanto que para o consumidor a qualidade está diretamente relacionada com sua percepção fisiológica e sua sensação de bem-estar produzida durante e após a aplicação do produto (TADINI, 2009).

De acordo com os resultados para a avaliação da segurança e eficácia anti-aging (Antienvelhecimento) do Sérum gel pimenta biquinho, realizados pelo laboratório IPCLIN (Instituto de Pesquisa Clínica Integrada), e conduzidos conforme os testes de eficácia clínica subjetiva, aceitabilidade dermatológica e a avaliação da apreciabilidade cosmética, o produto demonstrou segurança para uso em humanos, foi considerado como um cosmético anti-aging com eficácia incrementada pela adição do extrato líquido padronizado de pimenta biquinho (*C. chinense* Jacq.). Pela apreciabilidade cosmética, o produto em questão apresentou diferença estatística significativa em relação ao cosmético Controle, demonstrando maior aceitação por parte dos participantes em todos os parâmetros avaliados (IPCLIN, 2018).

O presente trabalho possibilitou a caracterização da matéria-prima vegetal da *Capsicum chinense* Jacq., a partir da análise microscópica do pó, determinação do teor de voláteis, cinzas totais, distribuição granulométrica e índice de intumescência, fornecendo informações importantes para estabelecer parâmetros de controle de qualidade.

O extrato líquido foi preparado pelo método de percolação, a partir da matéria-prima vegetal, e posteriormente foi caracterizado fornecendo informações para o controle de qualidade, bem como para a manutenção das suas condições de segurança e eficácia.

Foi determinado pelo método de doseamento, a presença dos flavonoides, fenóis e carotenoides, tanto na matéria-prima vegetal quanto no extrato líquido concentrado. Os teores de fenóis, flavonoides e carotenoides para as amostras da matéria-prima vegetal e do extrato líquido concentrado foram respectivamente: 18 mg/100g e 168 mg/100g de fenóis, 10 mg/100 g e 90,7 mg/100g de flavonoides, 9,10mg/100g e 83,70 mg/100g de carotenoides.

O método analítico validado por CLAE, utilizado para a quantificação da capsantina no extrato líquido concentrado, mostrou-se rápido, de fácil execução, seletivo, linear, preciso, exato e robusto, permitindo concluir que este método pode ser utilizado com êxito na identificação e quantificação desse marcador.

A capsantina foi detectada na matéria-prima vegetal da *C. chinense* Jacq., por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, confirmando a presença deste marcador químico na amostra.

Tanto o extrato líquido padronizado da *C. chinense* Jacq., quanto as fórmulas cosméticas Sérum gel pimenta biquinho e Controle, mostraram-se estáveis em relação aos parâmetros organolépticos e físico-químicos, ao longo do ciclo de congelamento/descongelamento e do teste de estabilidade acelerada.

Por meio do desenvolvimento do fitocosmético, comprovou-se que o extrato líquido padronizado obtido a partir da pimenta biquinho (*C. chinense* jacq.) pode ser inserido na formulação do sérum gel, não interferindo na estabilidade deste produto.

Foi possível detectar o marcador capsantina na formulação cosmética do Sérum gel pimenta biquinho, por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, utilizando o método anteriormente validado.

Os ensaios de atividade antioxidante realizados no presente estudo constataram que a matéria-prima vegetal, o extrato líquido padronizado e o fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho apresentaram atividade antioxidante. As amostras mostraram habilidade em doar elétrons e átomos de hidrogênio nos ensaios *in vitro*. Considerando as três amostras avaliadas pelos ensaios de captura do radical DPPH, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e pela captura do radical ABTS, o extrato líquido padronizado e o fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho apresentaram maior atividade antioxidante. A menor atividade antioxidante foi verificada para a matéria-prima vegetal.

Por meio dos testes de avaliação subjetiva da eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica, foi comprovada a segurança clínica e a eficácia anti-aging (antienvelhecimento) do fitocosmético Sérum gel pimenta biquinho, com atividade potencializada pela adição do extrato líquido padronizado da *Capsicum chinense* Jacq. (Variedade biquinho).

A formulação cosmética contendo o extrato líquido padronizado em capsantina obtido a partir da pimenta biquinho (*Capsicum chinense* Jacq.), objeto deste estudo, é inovadora e trata-se de um produto inédito tanto no campo científico quanto no mercado consumidor de cosméticos. Este produto atende as demandas dos consumidores mais exigentes, sendo constituída por uma formulação tecnológica e segura, sensorial suave e refrescante, toque seco, fácil espalhabilidade, com atividade antioxidante e eficácia anti-aging cientificamente comprovadas.

## 5.1 PERSPECTIVAS

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e a valorização de ativos tecnológicos obtidos a partir da pimenta biquinho (*C. chinense* Jacq.), aplicando-os em cosméticos mais inovadores. Como já foi mencionado anteriormente, seria interessante a substituição dos ativos antioxidantes sintéticos, por matérias-primas de origem vegetal agregando valor e tecnologia às formulações cosméticas.

Um produto cosmético antioxidante e anti-aging composto por uma matéria prima obtida do fruto de uma variedade de pimenta, apresentado nesta dissertação, foi apenas o primeiro passo na exploração desta especiaria tão importante para o paladar. Existem muitos estudos a serem feitos, acima de tudo na perspectiva de tornar a pimenta biquinho alvo de mais pesquisas, estimulando sua aplicação na cosmetologia e na área da estética.

ABHIPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>. Acesso em 22 de junho de 2018.

ADOM, K.K; LIU, R.H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.21, p.6182-6187, 2002.

AIRES, B.F. O IDOSO E AS AÇÕES SOCIAIS EM PROL DESSE GRUPO ETÁRIO: Um estudo sobre a qualidade de vida na “Terceira idade” e o “Projeto Saúde e Cidadania na Melhor Idade”. Dissertação (Mestrado em Administração) – Centro Social de Ciências Aplicadas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

ALCARDE, L.; MASSICANO, A.V.F.; OLIVEIRA, R.; ARAÚJO, R. Validação de método analítico para cálculo de concentração de anticorpo monoclonal conjugado. *International Nuclear Atlantic Conference – INAC*, Recife, PE, Brazil, November 24-29. ISBN: 978-85-99141-05-2, 2013.

ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALMADA FILHO, C. M. Antioxidantes e radicais livres. In: FREITAS, E. V. *et al.* Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 89, p. 744- 748, 2002.

ALMEIDA, J.; SANTOS, R.; GENOVESE, M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema B-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais. *Ciências e tecnologia dos alimentos*, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ALVAREZ-PARRILLA, E. *et al.* Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 59, n. 1, p. 163-173, 2011.

ANDRE, A.C.G.M SILVA, A.P.F; VASCONCELOS, E.M. Caracterização físicoquímica do material vegetal e dos extratos de *Cestrum laevigatum* Schltl (Solanaceae). *Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde Fits*, Maceió, V.I, p.11-19, 2013.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

APRINNOVA- Neossance™ Squalane. Literatura do fabricante. Disponível em: [www.centerchem.com/Products/DownloadFile.aspx?FileID=8049](http://www.centerchem.com/Products/DownloadFile.aspx?FileID=8049). Acessado em: 26/07/2018.

ARBOS, K.A.; FREITAS, R.J.S.; STERTZ, S.C.; DORNAS, M.F. Atividade Antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30: 501-506, 2010.

AZZINI, R.G. Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. São Paulo, 1999. 169p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BALANDRIN, M.F. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*.228 (4704):1154- 60; 1985.

BARAN, R.& MAIBACH, H.I., (ed.). *Cosmetic Dermatology*, Baltimore, Willians & Wilkins, 1994.

BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Campinas, 23(4): 629-643, jul./ago., 2010.

BAUMANN, L. *Dermatologia cosmética: princípios e práticas*. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

BAZIN, R.; DOUBLET, E. *Skin aging ATLAS*, volume 1, 2007.

BENSON, H.A.E.; WATKINSON, A.H. *Transdermal and Topical Drug delivery, Principles and Practice*. s.l. Jojn Wiley & Sons. Inc, 2012.

BERNARDO, C.O.; MARTINS, I.B.A.; PINTO, C.M.F.; PINTO, C.L.O; BITTENCOURT, F.; MARTINS, M.L.; MARTINS, E.M.F. Desenvolvimento de extrato de pimenta-biquinho como forma de conservação pós-colheita. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, v.5, n.2., p.29-37, 2015.

BIANCHI, M.L.P, ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*. 12(12):123-30,1999.

BLANES-MIRA, C.; CLEMENTE, J., JODAS, J.; GIL, A.; FERNANDEZ-BALLESTER, G.; PONSATI, B.; GUTIERREZZ, L.; PEREZ-PAYA, E.; FERRER-MONTIEL, A. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *International Journal of cosmetic science*. v. 24, p. 303-310, 2002.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BLOISE, M.I. Óleos Vegetais e Especialidades da Floresta Amazônica. São Paulo: *Cosmetics &Toiletries* 15(1): 46-49, pág. 46, 2003.

BOGDAN ALLEMANN, M.D.; L. BAUMANN, M.D. Antioxidants Used in Skin Care Formulations.2008. Disponível em <http://www.skintherapyletter.com/2008/13.7/2.html>. Acessado em: 08 de ago de 2018.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2007b.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Brasília: ANVISA, 2014.
- BRASIL- ANVISA: Manual de boas práticas em pesquisa e desenvolvimento para a Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. NOVEMBRO/2007.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 4ª. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1, 5ª Edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.
- BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), p. 107. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico On Line 126. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Fortaleza: EMBRAPA, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico On Line 127. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: EMBRAPA, 2007a.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 7, 10 DE fevereiro de 2015-Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Brasília, DF, 10 de fevereiro. 2015.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 166, de 24 de julho de 2017- Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Brasília, DF, 24 de julho. 2017.
- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds), Carotenoids: spectroscopy, vol 1B. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 13-63, 1995.
- BROWN, W.L. A contribution to the chemistry of pepper pigments. The red pigment in the perfection pimiento (*Capsicum annuum*). Journal of Biological Chemistry. 110: 91-94, 1935.
- BUBICZ, M. Occurrence of carotenoids in fruits of the genus berberis. Bulletin de l'Académie polonaise des sciences. 13:251-5; 1965.
- BURRUEZO, A. R.; MAS, M. C. G., NUEZ, F. Carotenoid composition and vitamin A value in ají (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. & P.), 2 pepper species from the Andean region. Journal of Food Science, v. 75, n. 8, 2010.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology & Medicine, Los Angeles, v.29, n.1, p.222–230, may. / sep. 2000.

CAMELO, S.R.P. Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2010.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*. 51C:15-25; 2012.

CARVALHO, A.C.B, BALBINO, E.E, MACIEL, A, PERFEITO J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 314 - 319, 2008.

CARVALHO, A.V.; MATTIETTO, R.A.; RIOS, A.O.; MORESCO, K.S. Mudanças nos compostos bioativos e atividade antioxidante de pimentas da região amazônica. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 44, n. 4, 2014.

CARVALHO, A.V.; RIOS, A.O.; MACIEL, R.A.; MORESCO, K.S.; BECKMAN, J.C. Determinação de Carotenoides e atividade antioxidante de pimentas provenientes da região Amazônica. *Magistra, Cruz das Almas – BA*, V. 26, III CBPH, set. 2013.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A. Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 27p, 2006.

CHAN, K.C., MONG, M.C., YIN, M.C. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *Journal of Food Science*. 74: H225-231, 2009.

CHOI, D.W., KIM, J.H., CHO, S.Y., HIM, D.H., CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. *Toxicology* 181-182: 581-586, 2002.

CHUAH, A.M.; LEE, Y.C.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; YIN, L.J.; MATOBA, T. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry, Barking*, v. 111, n. 1, p. 20-28, 2008.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Annals of Internal Medicine*. 111: 918-31; 1989.

COLIPA. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association. Disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/>. Acessado em: 24 de junho de 2018.

COLLERA-ZÚÑIGA, O.; JIMÉNEZ, F.G.; GORDILLO, R.M. Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry, Barking*, v. 90, n. 1, p. 109-114, 2005.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução 466/12 do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, 12/12/2012.

COSTA, L.M.; MOURA, N.F.; MARANGONI, C.; MENDES, C.E.M.; TEIXEIRA, A.O.; Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 30, supl. 1, maio. 2010.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; DE PAULA, J. R. Caracterização físicoquímica do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

- CUNHA, A. *et al. Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 2008.
- DANTAS, E.R; ARAUJO, A.D.S. Avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas de pimenta biquinho nos diferentes estádios de maturação e a sua ação antimicrobiana. Relatório (PIBIC/UFCG). Campina Grande-PB, 2015.
- DECKER, E.A. Strategies for manipulating the prooxidative/ antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science and Technology*. 9 (6): 241-8; 1998.
- DELI, J., MATUS, Z., TOTH, G. Carotenoid composition in the fruits of *Asparagus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:2793-96; 2000.
- DE MEDEIROS, J.; KANIS, L.A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata Spreng.*, Asteraceae, e *Passiflora edulis Sims*, Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(5):796-802; 2010.
- DOLAN, J.W. System Suitability. *LCGC Europe* 17(6), 328–332 (2004).
- DOW CORNING, 2015. Dow Corning® 9040 Silicone Elastomer Blend. Literatura do fabricante. Disponível em: [http://www.essence-plus.com/essence-plus689/program\\_download/good/201610111605001808.pdf](http://www.essence-plus.com/essence-plus689/program_download/good/201610111605001808.pdf). Acessado em: 26/07/2018.
- DOW- Propilenoglicol. Literatura do fabricante. Disponível em: [http://msdssearch.dow.com/publishedliterature/dowcom/dh\\_0034/0901b80380034a21.pdf?filepath](http://msdssearch.dow.com/publishedliterature/dowcom/dh_0034/0901b80380034a21.pdf?filepath). Acessado em: 26/07/2018.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82, 47-95, 2002.
- EMBACAPS-BASF. Literatura do fabricante. Disponível em: [http://www.embacaps.com.br/images/formulacoes/formulacoes\\_diversa-idade.pdf](http://www.embacaps.com.br/images/formulacoes/formulacoes_diversa-idade.pdf). Acessado em: 26/07/2018.
- EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS, 2018. Cosmetics Ingredients & Substances – CosIng. Simple or Advanced Search. Disponível em: <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>. Acesso em 24 abr. 2018.
- FARIAS, M.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Capítulo 12, Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.
- FARINATTI, P.T.V. Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.8, n.4, p.129-138, 2002.
- FECHINE, B.R.A, TROMPIERI, N. O processo de envelhecimento: as principais alterações que acontecem com o idoso com o passar dos anos. *International Scientific Journal* Edição 20, volume 1, artigo nº 7, janeiro/março 2012.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61-68, 1997.

- FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, v.1, n. 2, p. 32-39, 2007.
- FONSECA, M.J.V. *et al.* Desenvolvimento de Formulações Tópicas Antioxidantes. *Cosmetics & Toiletries*, São Paulo, v. 20, p. 64-68, 2008.
- FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.F.; PASSOS, M. Carotenoides. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 13, 40, 2000.
- FONTES, I.J.G. Antioxidantes como substâncias cosmetologicamente activas. 46 p, 2013. Dissertação (Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- FOTIA, M.C; AMORATI, R. Non-phenolic radical-trapping antioxidants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: 1435–1448, 2009.
- FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins in foods. In: Markakis P, *Anthocyanins as Food Colors*. New York, Academic Press, p. 181-207. 1982.
- FRASER, P.D., BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 43, 228, 2004.
- FREITAS DE ARAÚJO, A. *et al.* (2010). Plantas nativas do Brasil empregadas em Fitocosmética. *X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*, Recife, pp. 1-3.
- FRIES, A.T.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da Atividade Antioxidante de Cosméticos Antiidade. *Revista Contexto & Saúde*, Ijuí. v. 10. n. 19. jul./dez. 2010.
- FRITZ, M.; SOUZA, C.G. INOVAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS-CASOS DE EMPRESAS DO SETOR. Ed. Universidade, de Passo Fundo, p.6.67, 2006.
- GALENA-Lipotec/Espanha. Literatura do fabricante. Disponível em: [http://www.pharmakondf.com.br/Pharmakon/arquivos/INSUMOS\\_FARMACEUTICOS/A/6213\\_-\\_IC\\_-\\_ARGIRELINE.pdf](http://www.pharmakondf.com.br/Pharmakon/arquivos/INSUMOS_FARMACEUTICOS/A/6213_-_IC_-_ARGIRELINE.pdf). Acessado em: 26/07/2018.
- GANGOLLI, S. *The Dictionary of substances and their effects*.2 Ed. Royal Society of Chemistry, 2005.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J. *Tratado de histologia em cores*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- GASPAR, L.R.; GONÇALVES, G.M.S.; PEREIRA, L.H.T.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Aplicação e padronização de metodologias não invasivas para a avaliação de eficácia. *Cosmetics & Toiletries* (Ed. Port.), São Paulo, v. 13, n. 5, p. 68-73, 2001.
- GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- GRUHLKE, M.C.H., SLUSARENKO, A.J. The biology of reactive sulfur species (RSS) *Plant Physiology and Biochemistry*. 59:98–107; 2012.
- GUYTON, A. C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 1176p, 2011.

- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.
- HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142(2): 231-55; 2004.
- HARRIS, M.I.N.C. *Pele: Do nascimento a maturidade*. 1ª edição. São Paulo: SENAC, 302p, 2016.
- HARRIS, M.I.N.C. *Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento*. 3.ed. São Paulo: Senac, 2009.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, pp. 67 – 202, 2002.
- HEINONEN, M.I.; MEYER, A.S.; FRANKLE, E.N.: Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4107–4112, 1998.
- HEINRICH, M., BARNES, J., GIBBONS, S., AND WILLIAMSON, E.M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, Elsevier Science Ltd., UK. 2004.
- HIRASA, K.; TAKEMASA, M. *Spice science and technology*. Marcel Dekker, p 19, 1998.
- HOWARD, L.R. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum Species*) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 1713-1720, 2000.
- HUANG, L.H., WANG, B.G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:4993-7; 2004.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br>. Acessado em: 19/12/2018.
- INFINITY PHARMA, 2013. Literatura do fabricante. Disponível em: <https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/p/pca-na-ajidew-nl-50.pdf>. Acessado em: 26/07/2018.
- IOBST, S.; SANTHANAM, U.; WEINKAUF, R. *Biotechnology in Skin Care (I): Overview*. In: LAD, R. *Biotechnology in Personal Care*. New York: Taylor & Francis; Cap.5, p.117-122; 2006.
- IPCLIN (Relatório de ensaio). *Avaliação subjetiva da eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica*. 2018.
- IRION, G. *Úlceras por pressão*. In: IRION, G. *Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- JÚNIOR, B.B.P, NUNES, L.F, KUPLICH, M.M.D, MARTINS, M.G. Aplicabilidade da pimenta (capsaicina) na estética. *RIES*, ISSN 2238-832X, Caçador, v.4, nº 2, p. 109-119, 2015.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KAPPEL, V.D. Avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- KAYS, S.J. Postharvest physiology of perishable plant products. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. Dermatologia estética. São Paulo: Atheneu, 2004.
- KIM, S., YOUL HA, T., HWANG, I.K. Food Reviews International Analysis, Bioavailability, and Potential Healthy Effects of Capsanthin, Natural Red Pigment from *Capsicum spp.* Food Reviews International. Vol. 25, N<sup>o</sup>. 3, pp. 1–43, May 2009.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada. 30, 241-248; 2009.
- KOPEC, R.E., COOPERSTONE, J.L, CICHON, M.J., SCHWARTZ, S.J. Analysis Method of Carotenoids. Analysis of Antioxidant-Rich Pytochemicals. First Edition, pp. 105-148; 2012.
- KUMAR, V. *et al.* Lesão celular, morte celular e adaptações. In: KUMAR, V. *et al.* Robbins patologia básica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 1, p. 1-32, 2008.
- KUSKOSKI, E.M., ASUERO, A.G., TRONCOSO, A.M., MANCINI FILHO, J., FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology. 25(4):726-32; 2005.
- KUSKOSKI, E.M., *et al.* Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, vol 24, n 4, 691-693, 2004.
- LAMBERS, H., PIESSENS, S., BLOEM, A., PRONK, H., FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. International Journal of Cosmetic Science, 28, 359–370, 2006.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR L. R.; CAMPOS P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética crescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva, Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, 77(5):563-569, set./out. 2002.
- LICE, M., 2012. Sérum - o que é e para que serve? <https://mini-saia.blogs.sapo.pt/1338631.html>. (Acessado em: 25 de julho de 2018).
- LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, camb.). Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo; 2008.
- LIMA, M.A. Determinação de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante da pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pedulum*) comercializada na cidade de Imperatriz-MA. In: VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. 2012.

LIPOTEC, 2013. Literatura do fabricante. Disponível em: [https://www.lotioncrafter.com/reference/brochure\\_leuphasyl\\_v13g.pdf](https://www.lotioncrafter.com/reference/brochure_leuphasyl_v13g.pdf). Acessado em: 26/07/2018.

LOIZZO, M.R. *et al.* Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell *Capsicum annum L.* cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, v. 53, p. 392-401, 2013.

LÜ, J.M., LIN, P.H., YAO, Q., CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.14(4):840-60; 2010.

LUCO, D.P. Padronização de técnicas de isolamento de células de Langerhans imaturas e desenvolvimento de um modelo tridimensional de pele humana para testes de sensibilidade in vitro. 98f, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

LUIZ, K.K.I.; LORETO, M. D. S.; FERREIRA, M.A.M.; MAFRA, S.C.T. Compreensão Social do Envelhecimento e Velhice: análise semiolinguística de um dispositivo técnico. *Oikos: Família e Sociedade em Debate*, v. 29, n. 1, p. 55-77, 2018.

LUNN, J. Nutrição e envelhecimento saudável. *Nutrição em Pauta*. São Paulo ano 15, v. 85, p. 5-9, jul/ago 2007.

LUTZ, D.L.; FREITAS, S.C. Valor nutricional. In: RIBEIRO, C.S.C. *et al.* *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.31-37, 2008.

MACIEL, M.A.M, PINTO, A.C., VEIGA, J.V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quima Nova*. 25: 430-431, 2002.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Desenvolvimento de Produtos Cosméticos. *Cosmetics & Toiletries* (Ed. Port.), São Paulo, v. 14, p. 66-69, 2002.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MAJEED, M., PRAKASH, L. Novel Natural Approaches to Anti-aging Skin Care, *Cosmetic and Toiletries Manufacture Worldwide*, pp. 11-15, 2002.

MARÍN, A. *et al.* Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 52, n. 12, p. 3861-3869, 2004.

MARQUES, L.C.; VIGO, C.L.S. Preparação e Padronização de extratos vegetais. In: LEITE, J.P.V. (Ed.). *Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas*. Editora Atheneu. p.169-204. 2009.

MATSUFUJI, H., HIROMICHI, N., MAKOTO, C., MITSUHARU, T. Antioxidant Activity of Capsanthin and the Fatty Acid Esters in Paprika (*Capsicum annum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p 1-2, v. 46, n. 9, Tokyo, 1998.

- MCCORD, JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*.108:652-659; 2000.
- MENICHINI, F. *et al.* The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, v. 114, n. 2, p. 553-560, 2009.
- MESQUITA, S.S.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; SERVULO, E.F.C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. *Revista Virtual de Química*. 9 (2), 2017.
- MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.1, p.94-101, 2007.
- MIGUEL, L.M. A biodiversidade na indústria de cosméticos: contexto internacional e mercado brasileiro. 2012. 259 p. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- MIGUEL, L.M. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. *Revista Geográfica de América Central*. Costa Rica, p. 1-15, 2011.
- MILLER, D.M., BUETTNER, G.R., AUST, S.D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology & Medicine*. 8:95-108; 1990.
- MILLER, H.E. Simplified method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 48(2):91; 1971.
- MÍNGGUEZ-MOSQUERA, M.I., HORNERO-MÉNDEZ, D. Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(10): 1616-1620; 1993.
- MIRANDA, G.M.D, MENDES, A.C.G, SILVA, A.L.A. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, Rio de Janeiro,19(3):507-519; 2016.
- MOLE, S. A.; WATERMAN, P. G. A critical analysis technique for measuring tannins in ecological studies, *Oecologia*, v. 72, n.1, p.137-147, 1987.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Food Science and Technology*, Wiltshire, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- MORASTONI, A.P.; MOREIRA, G.; SANTOS, M.C. Acupuntura estética e moxaterapia no tratamento e prevenção do envelhecimento. 16 f. Monografia de Graduação de cosmetologia e estética – Universidade do Vale do Itajaí. Santa Catarina, 2004.
- MORESCO, K.S., 2013. Potencial antioxidante, efeito do processo de secagem e extração de compostos bioativos de pimentas *Capsicum*. Porto Alegre, 92 p. Msc dissertation, Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
- MOTA *et al.* Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, vol. 4, nº 1, 2004.

MOTA, N.O. Características estruturais e terceirização na indústria de produtos de higiene pessoal perfumaria e cosméticos - PHPPC. 62 p, 2014. TCC (Graduação em Ciências Econômicas), Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MUÑOZ, A.M., CIVILLE, G.V., CARR, B.T. Sensory evaluation in quality control. New York: Van Nostrand Reinhold. p. 240; 1993.

NACHTIGALL, A. Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L. Tesis (Doctor Scientiae). Viçosa Minas Gerais, Brasil Universidade Federal de Viçosa, 2007.

NASCIMENTO, P.L.A. Atividade antioxidante e antimicrobiana da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), 2012. Tese (Doutorado em Ciências Animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NAVARRO, D. F. Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* Pohl para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico. Dissertação de Doutorado. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NAVIGLIO, D.; PIZZOLONGO, F.; ROMANO, R.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, B.; SANTINI, A. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the naviglio extractor® for the production of lemon liquor. African Journal of Food Science, v.1, p.42- 50, 2007.

NEITZKE, R.S.; VASCONCELOS, C.S.; BARBIERI, R.L.; VIZZOTTO, M.; FETTER, M.R.; CORBELINI, D.D. Variabilidade genética entre compostos antioxidantes em variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*). Horticultura Brasileira, Brasília, v.33, n.4, p.415-421, 2015.

NIKI, E. Oxidative stress and aging. International medicine 39:324-6. 2000.

NOVAK, A.C. Potencial cosmético dos esporos de *Ganoderma lucidum*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. 2013.

OLIVEIRA, A.M.C. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp*. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

OLIVEIRA, A. Z. M. Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2009.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. Revista brasileira de plantas medicinais, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 36-44, Mar. 2015.

OLIVEIRA, N.M. Envelhecimento ativo: reflexões sobre programas e serviços voltados aos idosos do sesc estreito. 2013. 95 p. TCC (Bacharelado em Serviço Social.) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVER, J., PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. Journal of Chromatography A. 881, 543–555, 2000.

OMS-RELATÓRIO MUNDIAL DE ENVELHECIMENTO E SAÚDE: Genebra, 2015. Disponível em: <<http://sbgg.org.br/wpcontent/uploads/2015/10/OMS-ENVELHECIMENTO-2015-port.pdf>> Acesso em:19/12/2018.

ORIQUI, L.R; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P. Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos. Química Nova, vol.36, nº 2. São Paulo. 2013.

ORTOLAN, M.C.A.B; BIONDO-SIMÕES, M.L.P; BARONI, E.R.V; AUERSVALD, A.; AUERSVALD, L.A; NETTO, M.R.M; BIONDO-SIMÕES, R. Influência do envelhecimento na qualidade da pele de mulheres brancas: O papel do colágeno da densidade de material elástico e da vascularização. Revista Brasileira de Cirurgia Plástica. V. 28, n. 1, p. 8-41. Curitiba, 2013.

PAPAGEORGIOU, V.; GARDELI, C.; MALLOUCHOS, A. et al. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(16): 7254–7264, 2008.

PARK, K.J.; YADO, M.K.; BROD, F.P.R. Estudo de secagem de pêra bartellet (*pyrus* sp.) em fatias. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 3, p. 288-292, 2001.

PEDÓ, T.; AUMONDE, T.Z.; OLIVEIRA, L.C.; NORA, L.; MORSELLI, T.B.G.A.; MAUCH, C. R. Produtividade e caracterização físico-química de pimentas submetidas a diferentes fontes e doses de adubação orgânica. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. Vol 113 (2): 134-139, 2014.

PEREIRA, D.C. Efeito antioxidante de extrato de pimenta em óleo de soja sob diferentes condições de estocagem. Tese. [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade estadual Paulista; 2013.

PEREZ-GALVEZ, A., MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. Biochimica et Biophysica Acta. 1569:31-34; 2002.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Research International. 39:791-800; 2006.

PÉRTILE, R. Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils. Dissertação de mestrado. Programa de pós-Graduação em Farmácia. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina: PGFAR, 2007.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2009.

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

PROSERPIO, G.; Natural sunscreens: vegetable derivatives as sunscreens and tanning agents. Cosmetics & Toiletries, v. 91(3), p. 34-46, 1976.

PROSPECTOR- Cetiol® Sensoft. Literatura do fabricante. Disponível em: <https://www.ulprospector.com/pt/la/PersonalCare/Detail/1960/318071/Cetiol-Sensoft>. Acessado em: 26/07/2018.

PROSPECTOR- Dragoxat® 89. Literatura do fabricante. Disponível em:

<https://www.ulprospector.com/pt/la/PersonalCare/Detail/4743/210563/Dragoxat-89>.  
Acessado em: 26/07/2018.

QUIRÓS, A., COSTA, H.S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 97–111; 2006.

RAMALHO, V.C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*. 29(4): 755-60; 2006.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189-207, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE- EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REBELLO, T. Guia de produtos cosméticos. 9. ed. São Paulo: Senac, 2004.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri: Manole, cap.6, p.243-299. 2006.

REID, M.B., DURHAM, W.J. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 959:108-16; 2002.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. *Capsicum*: Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa hortaliças, 2000.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. Sistema de produção de pimentas (*Capsicum spp*): introdução e importância econômica. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2004.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). *Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, 3 rd ed., Nova York: CRC Press. Chap.15, p.409-434; 2008.

REIS, D.R.D.; DANTAS, C.M.B.; SILVA, F.S. da; PORTO, A.G.; SOARES, E.J.O. Caracterização biométrica e físico-química de pimenta variedade biquinho. *Enciclopédia Biosfera*, v.11, n.21, p.454, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; MELO, L. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. *Cosmetologia aplicada a Dermoestética*. 2.ed – São Paulo: Pharmabooks, 2010.

RIBEIRO, C. S. C. *et al.* *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008.

RIBEIRO, C.S.C.; AMARO, G.B; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. *Árvore do conhecimento*, BRS Moema. Embrapa Hortaliças, 2012. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000guv5xyze02wx7ha0g934vgnk4vdsr.html>. (Acessado em: 20 de junho de 2018).

RODRIGUES, F.A.; PIMENTA, V.S.C.; BRAGA, K.M.S.; ARAÚJO, E.G. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p.870, 2016.

RODRIGUES, J.B. Atividade antioxidante da espécie *Schinus terebinthifolius raddi* (aroeira vermelha) e o seu potencial uso na atenção básica. 86p, 2016b. Dissertação (Mestrado em Políticas públicas e desenvolvimento local), Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B; A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, OMNI Research: ILSI Press: Washington D. C. 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press, 2001

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; AMAYA-FARFAN, J. Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 42, p.180-191, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J.; Fontes brasileiras de Carotenoides, 1ª. ed., Ministério do Meio Ambiente: Brasília, 2008.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. Journal of AOAC International, v. 88, n. 4, p. 1015-1019, 2005.

ROMERO, C.A. *et al.* Del envejecimiento al deterioro funcional. Formación Médica Continuada, Madrid, v.12, n.7, p.434-444, jan. 2005.

RUBAN, A.V., JOHNSON, M.P.: Xanthophylls as modulators of membrane protein function. Arch Biochem Biophys.504: 78-85, 2010.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.G., Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. Comunicado técnico on line EMBRAPA Agroindústria Tropical, nº 128, 2007.

SALMON, A.B. *et al.* Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? Free Radical Biology & Medicine, San Antonio, v.48, n.1, p.642–655, nov. /dec. 2010.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Dermatologia. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

SANTOS-BOCANEGRA, E., OSPINA-OSORIO, X., OVIEDO-RONDÓ, E.O. Evaluation of xanthophylls extracted from *Tagetes erectus* (Marigold Flower) and *Capsicum Sp.* (Red Pepper Paprika) as a pigment for egg-yolks compared with synthetic pigments. International Journal Poultry Science. 3:685–689; 2004.

SARFAM. Literatura do fabricante. Disponível em: <http://dev9.coderun.com.br/produtos/hyalumae-1/>. Acessado em: 26/07/2018.

SASTRE, J., PALLARDO, F.V., VINA, J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 1–8; 2003.

SCHARFETTER-KOSHANEK, K.; WLASCHEK, M.; BRENNEISEN, P.; SCHAUEN, M.; BLAUDSCHUN, R.; WENK, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging, *Journal of Biological Chemistry*, v. 387, n.11, p.1247–1257, 1997.

SEPPIC products. SIMULGEL EG. Literatura do fabricante. Disponível em: [www.cossmma.com/fileadmin/all/cossmma/Archiv/Formulations2012/Cos1502\\_SeppicWhiteni ng.pdf](http://www.cossmma.com/fileadmin/all/cossmma/Archiv/Formulations2012/Cos1502_SeppicWhiteni ng.pdf). Acessado em: 26/07/2018.

SEVERO, D. S. Farelo de pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) aplicado na produção de Boursin. Trabalho de conclusão do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campina Grande, setembro, 2015.

SHAH, S.N.M., TIAN, S.L., GONG, Z.H., ARISHA, M.H. Studies on. Metabolism of Capsanthin and Its Regulation under Different Conditions in Pepper Fruits (*Capsicum spp.*). *Annual Review & Research in Biology*. 4, 1106-1120; 2014.

SHOTORBANI, N.Y.; JAMEI, R.; HEIDARI, R. Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and the effects of thermal treatment. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 3, n. 1, p. 25, 2013.

SIES, H.; STAHL, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annual Review of Nutrition*, 24, 173, 2004.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA, A.P. Avanços sobre a neurotoxicidade induzida pelo pesticida organofosforado malation em modelos experimentais com camundongos. 109 p, 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, E.V. Potencialidades da pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) como aditivo natural. 2017. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João pessoa.

SILVA, S.A.M., VALARINI, M.F.C., CHORILLI, M., VENTURINI, A., LEONARDI, G.R. Atividade Antioxidante do Extrato Seco de Cacau Orgânico (*Theobroma cacao*) - Estudo de Estabilidade e Teste de Aceitação de Cremes Acrescidos Deste Extrato. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(4): 493-501; 2013.

SILVA, WS. Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Ceará; 2008.

SOBRATTE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, M.C; SARTOR, C.F.P; FELIPE, D.F. Comparação da ação antioxidante de uma formulação contendo extrato de *Pereskia aculeata* com cosméticos anti-idade presentes no mercado. Revista Saúde e Pesquisa, v. 6, n. 3, p. 461-477, 2013.

SOUZA, S.L.G. *et al.* Recursos fisioterapêuticos utilizados no tratamento do envelhecimento facial. Revista Fafibe on line, Bebedouro, Sp, v. 1, n. 1, p.1-6, 3 ago. 2007. Disponível em: <www.unifafibe.com.br/>. Acesso em: 22 mar. 2018.

STEINER, D. Antioxidantes em Cosméticos. Cosmetics & Toiletries, São Paulo, v. 20, p. 36, 2008.

SUCUPIRA, N.R; DA SILVA, A.B; PEREIRA, G; DA COSTA, J.N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde. 14(4): 263-269; 2012.

TADINI, K. A. Desenvolvimento e avaliação clínica dos efeitos de formulações dermocosméticas contendo dimetilaminoetanol ou acetil hexapeptídeo-3. Tese de Doutorado [Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP]. Ribeirão Preto, 2009.

THORNFELDT, C. Cosmeceuticals Containing Herbs: Fact, Fiction and Future, Dermatologic Surgery, vol. 31, pp. 873-880; 2005.

TSUJI, T., YORIFUJI, T., HAYASHI, Y., HAMADA, T. Light and scanning electron microscopic studies on wrinkles in aged persons' skin. British Journal of Dermatology; 114(3): 329-35,1986.

TSUKAHARA, K. *et al.* A photographic scale for the assessment of human facial wrinkles. Journal of Cosmetic Science, 51: 127-139, 2000.

UITTO, J.; BERNSTEIN, E.F. Molecular Mechanism of Cutaneous Aging: Connective Tissue Alterations in the Dermis. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceeding, p. 44, 1998.

US-FDA (United States Food and Drug Administration); Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39:44-84; 2007.

VAN DE GRAAFF, K.M. Anatomia Humana. Barueri: Manole, 2003.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. Revista de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3. p. 548-54, 2009.

VIEIRA, A.C.Q.M; MEDEIRO, L.A.; PALÁCIO, S.B. Fatores de Crescimento: Uma nova abordagem cosmeceutica para o cuidado anti-envelhecimento. Revista Brasileira de Farmacognosia. 92(3): 80-89, 2011.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 1998.

WILMSEN, P.K., SPADA, D.S., SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid Hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.53, n.12, p.4754-4761, 2005.

WU, T.W.; HASHIMOTO, N.; AU, J.X. *et al.* Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology*, v.13, p.575-580, 1991.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, Oxford, v.28, n.11, p.743-745, 1990.

XIAO XIAN, S. Mechanism of Herbal Complex Study on Synthesis of Collagen. *Polish Journal of Cosmetology*, vol. 2, pp. 119-122, 1999.

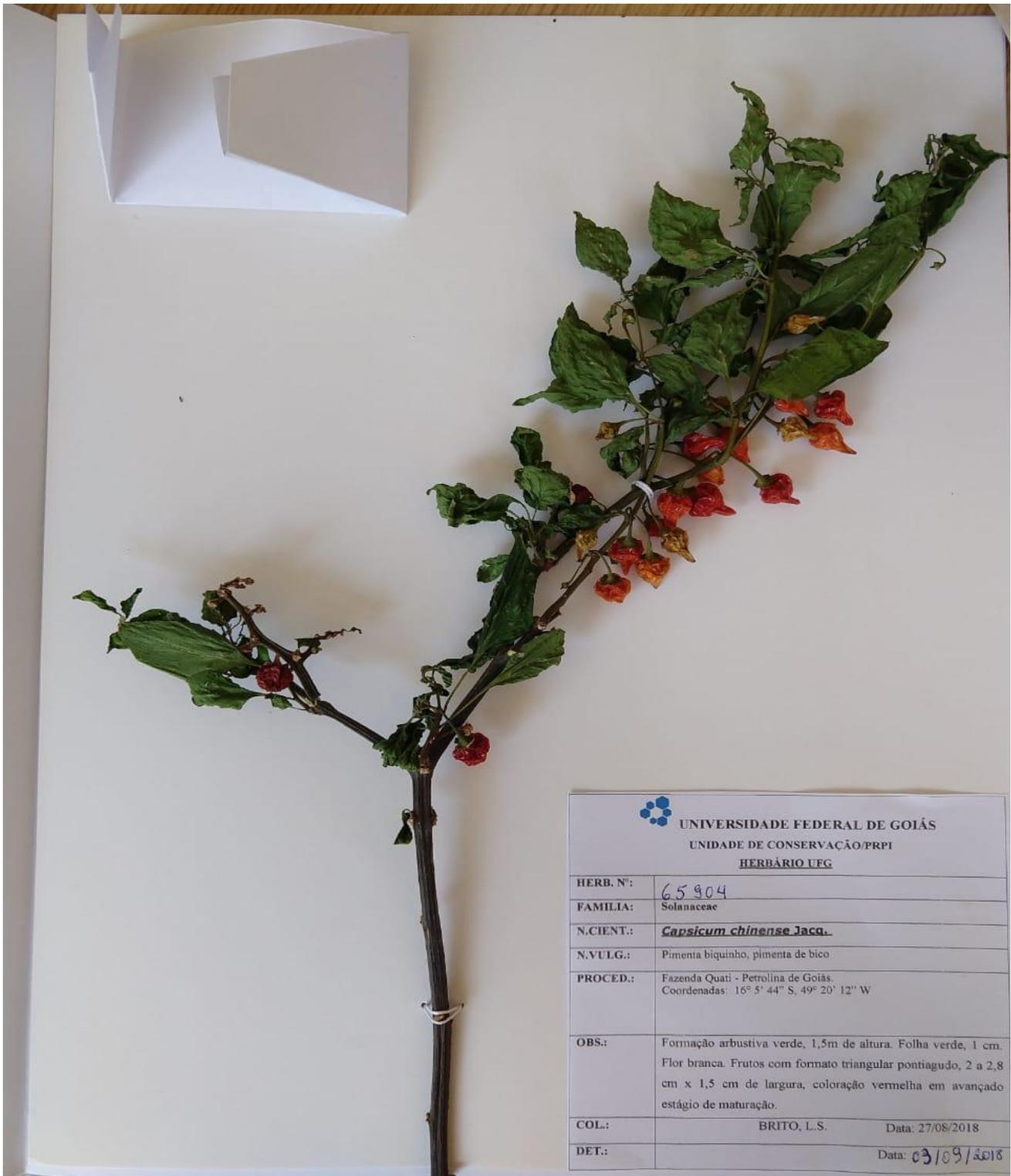
YAMAGISHI, M., KISHIMOTO, S., NAKAYAMA, M. Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of asiatic hybrid lily. *Plant Breeding*. 129:100-07; 2010.

YIDONG, T.U., TAIHAO, QUAN. Oxidative Stress and Human Skin Connective Tissue Aging. *Cosmetics*, 3(3), 28, 2016.

YOUNG, B.; LOWE, J.S.; STEVENS, A.; LOWE, J.S. *Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.5165-5170, 2001.

## APÊNDICE 1 – Exsicata depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás



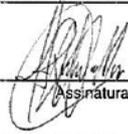
# ANEXO 1– Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos (IPCLIN)



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

## FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO SUBJETIVA DA EFICÁCIA CLÍNICA ANTIRRUGAS, COM APRECIABILIDADE COSMÉTICA E ACEITABILIDADE DERMATOLÓGICA			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 35			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>			
5. Nome: Leila David Bloch			
6. CPF: 268.310.298-41		7. Endereço (Rua, n.º): R. Iperoig, 418 Perdizes apto 21 SAO PAULO SAO PAULO 05016000	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: 11981094966	10. Outro Telefone:	11. Email: leila@ipclin.com.br
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: 21 / 08 / 2018		 _____ Assinatura	
<b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>			
12. Nome: IPCLIN - INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA INTEGRADA LTDA		13. CNPJ: 17.579.439/0001-13	14. Unidade/Orgão:
15. Telefone: (11) 4087-0093		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: Cassiano Carlos Escudeiro		CPF: 186.542.355 - 02	
Cargo/Função: Sócio/ Diretor			
Data: 21 / 08 / 2018		 _____ Assinatura	
<b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>			

17. Nome: 47908 ALTA COSMETICA INDUSTRIA, COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO EIRELI	18. Telefone: (62) 3593-7665	19. Outro Telefone:
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 468/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condição científica do projeto acima.		
Nome: <u>William Silva Miranda</u>	CPF: <u>057.564.586-07</u>	
Cargo/Função: <u>PROCURADOR</u>	Email: <u>William.Miranda@HKGRAV.COM.BR</u>	
Data: <u>23 10 13</u>	 Assinatura	

## ANEXO 2 – Parecer consubstanciado do CEP (IPCLIN)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO SUBJETIVA DA EFICÁCIA CLÍNICA ANTIRRUGAS, COM APRECIABILIDADE COSMÉTICA E ACEITABILIDADE DERMATOLÓGICA

**Pesquisador:** Leila David Bloch

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 96610918.0.0000.8021

**Instituição Proponente:** IPCLIN - INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA INTEGRADA LTDA

**Patrocinador Principal:** ALTA COSMETICA INDUSTRIA, COMERCIO, IMPORTACAO E EXPORTACAO EIRELI

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.841.563

#### Apresentação do Projeto:

Espera-se a inclusão de 35 participantes, com idades de 35 a 65 anos, fototipos de I a VI (segundo classificação de Fitzpatrick). Os participantes passarão por uma avaliação clínica antes e após o uso do produto. Espera-se comprovar, em condições normais de uso, a eficácia do produto investigacional, pela avaliação da eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia clínica antirrugas, com apreciabilidade cosmética e aceitabilidade dermatológica após aplicação do produto teste ao longo do tempo.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Benefícios esperados:** Comprovar se o produto é capaz de promover e/ou manter a firmeza e elasticidade da pele, e na melhora da aparência da mesma, garantindo à comunidade um produto seguro e eficaz.

**Riscos:** O grau dos riscos associados ao estudo pode variar de pessoa para pessoa, levando em consideração as diferentes características fisiológicas e pessoais dos participantes. Todas as matérias primas utilizadas no produto são aprovadas para uso tópico e não são tóxicas. Existem desconfortos e riscos mínimos para o participante do estudo, entretanto, como qualquer produto, poderá causar reações inesperadas como “vermelhidão”, “inchaço”, “coceira” e “ardor” nos locais

**Endereço:** Rua Leonardo Cavalcante, 314

**Bairro:** Centro

**UF:** SP

**Telefone:** (11)4497-1315

**Município:** JUNDIAI

**CEP:** 13.201-013

**E-mail:** cep@ipclin.com.br

Continuação do Parecer: 2.841.563

de aplicação deste.

Efeitos Adversos: Não há relatos conhecidos de reação adversa com os produtos investigacionais.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está devidamente desenhado e estruturado, e há riscos mínimos aos participantes da pesquisa. Haverá acompanhamento por médico dermatologista durante todo o período da pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos foram devidamente apresentados e estão adequados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:****Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1188763.pdf	23/08/2018 17:40:30		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	23/08/2018 17:40:15	Leila David Bloch	Aceito
Declaração do Patrocinador	RUGA.pdf	23/08/2018 17:36:47	Leila David Bloch	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	22/08/2018 09:48:54	Leila David Bloch	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_RUGAS.doc	22/08/2018 09:48:48	Leila David Bloch	Aceito
Orçamento	RUGA_ORCAMENTO.pdf	22/08/2018 09:48:30	Leila David Bloch	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RUGA_RESPONSABILIDADES_DO_PESQUISADOR.pdf	22/08/2018 09:48:23	Leila David Bloch	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	RUGA_DECLARACAO_INSTITUICAO_RESPONSABILIDADE.pdf	22/08/2018 09:48:15	Leila David Bloch	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	RUGA_DECLARACAO_INSTITUICAO_INFRAESTRUTURA.pdf	22/08/2018 09:48:08	Leila David Bloch	Aceito

**Endereço:** Rua Leonardo Cavalcante, 314**Bairro:** Centro**CEP:** 13.201-013**UF:** SP**Município:** JUNDIAÍ**Telefone:** (11)4497-1315**E-mail:** cep@ipclin.com.br

Continuação do Parecer: 2.841.563

Cronograma	RUGA_CRONOGRAMA.pdf	22/08/2018 09:48:00	Leila David Bloch	Aceito
------------	---------------------	------------------------	-------------------	--------

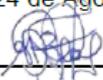
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JUNDIAI, 24 de Agosto de 2018



---

**Assinado por:**  
**Andre David Bloch**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Leonardo Cavalcante, 314

**Bairro:** Centro

**UF:** SP

**Município:** JUNDIAI

**Telefone:** (11)4497-1315

**CEP:** 13.201-013

**E-mail:** cep@ipclin.com.br