



**TATIANE SILVA DE ABREU**

**PROSPECÇÃO DO POTENCIAL COSMECÊUTICO DA  
CASCA DE ATEMOIA**

**LAVRAS - MG  
2020**

**TATIANE SILVA DE ABREU**

**PROSPECÇÃO DO POTENCIAL COSMECÊUTICO DA CASCA DE  
ATEMOIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Mesquita Freire  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Abreu, Tatiane Silva de.

Prospecção do Potencial Cosmecêutico da Casca de Atemoia / Tatiane Silva de Abreu. - 2020.

82 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Juliana Mesquita Freire.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cosmecêutico. 2. Resíduo de Fruto. 3. Fotoproteção Anti-inflamatório Antimicrobiano. I. Marcussi, Silvana. II. Freire, Juliana Mesquita. III. Título.

**TATIANE SILVA DE ABREU**

**PROSPECÇÃO DO POTENCIAL COSMECÊUTICO DA CASCA DE  
ATEMOIA**

*PROSPECTING THE COSMECEUTICAL POTENTIAL OF THE ATEMOIA BARK*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de julho de 2020:

Dra. Silvana Marcussi – UFLA

Dra. Juliana Mesquita Freire – UFLA

Dr. Clayton Oliveira Zambeli – UFPB

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA

Dr. Sérgio Scherrer Tomasi – UFLA

Profa. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Mesquita Freire  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2020**

A Deus, por me dar força para ser tão determinada.

Ao meu pai Murilo pelo incentivo, desde minha infância, para seguir os estudos até o Doutorado. Missão cumprida!

À minha mãezinha Maria Eunice por me ensinar a confiar nos projetos do Senhor Deus. Pelo amor e apoio incondicional em minhas decisões, nas diferentes etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Carol e Fabrício pela forma com que me impulsionam a buscar o sucesso profissional e por compartilharem dos sonhos, loucuras e lutas.

Aos meus tios e primos por terem orgulho do meu trabalho em uma das melhores universidades do país.

Às minhas amigas Rívia Dornelas e Mariana Braga por me darem força mesmo distantes.

Aos colegas e alunos do IF Sul de Minas do Campus de Inconfidentes como sou grata por fazer parte desta equipe e ter a oportunidade de me aperfeiçoar.

À Giovanna e Heitor, por darem serenidade e amor a esta fase.

Ao Luiz Paulo Fernandes de Barros pela participação tão ativa e ímpar nesta caminhada. Sou grata por sua torcida singular nas conquistas pela aprovação nos concursos.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Química, pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ou Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

À professora Silvana Marcussi, um ser humano tão inspirador. O seu senso de solidariedade e justiça são admiráveis.

À professora Juliana Mesquita, meu primeiro contato na UFLA. É muito simbólico sua participação no encerramento deste trabalho. Obrigada pela generosidade em compartilhar suas experiências e conselhos.

Aos professores Luciana Lopes e Paulo Preté pela alegria e amor à bioquímica. Ao professor Sérgio Thomasi pelo exemplo da dedicação e capricho.

À professora Roberta Piccoli por abrir as portas do laboratório de Microbiologia com tanto carinho. Ao Jorge Pamplona e Michele por serem tão solícitos no decorrer dos experimentos.

Ao professor Clayton Zambeli pelas contribuições com as correções dos *papers*.

Aos colegas do laboratório de bioquímica do DQI e de nossa Confraria que dividiram a bancada, a redação de artigos, os cafés e boas risadas.

Muito obrigada!

“- Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais que a própria guerra.”

*Ernest Hemingway*

## RESUMO GERAL

Produtores rurais, cooperativas agrícolas e até as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas têm buscado soluções para reutilizar resíduos de frutos de forma a aproveitar os compostos bioativos. Na família Annonaceae a comercialização da atemoia destaca-se por representar 54% das vendas. A atemoia é um fruto híbrido (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* Mill) que apresenta propriedades organolépticas, fitoquímicas e farmacológicas relevantes. Geralmente o fruto é descartado quando não atende os padrões de uniformidade da cor, tamanho e formato exigidos na comercialização alimentícia. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é caracterizar extratos da casca de atemoia e em seguida desenvolver uma emulsão tendo a casca da atemoia como uma das matérias primas. Na cosmetologia, quando o produto possui propriedade subterapêutica este é classificado como cosmecêutico. É crescente o interesse mundial no uso de matérias-primas naturais em cosmecêuticos, por isso, concomitante ao desenvolvimento de formulações, as concentrações de todos os componentes devem ser avaliadas em testes de estabilidade física, química e microbiológica. Resultados: Os compostos fenólicos totais nos extratos foram 144mg EAG 100g<sup>-1</sup> e 153,6 mg EAG 100g<sup>-1</sup> para os extratos a 50:50 e 70:30 respectivamente. Os minerais foram K e Fe. No antibiograma de disco e concentração mínima bactericida (CMB) por microdiluição e por microgota os extratos tiveram CMB de 25mg.mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O fator de proteção solar (FPS) foi melhor nas maiores concentrações. A atividade anti-inflamatória avaliada pela inibição de fosfolipases, foi mais efetiva nas maiores concentrações de extrato, enquanto que na hemólise térmica as menores concentrações exerceram maior efeito protetor sobre a membrana dos eritrócitos. Quando incorporados nas emulsões, os extratos, nas concentrações de 2%, 5% e 10% apresentaram estabilidade físico-química e microbiológica com pH 5,8 e densidade 1,2g mL<sup>-1</sup>. O FPS reduziu quando comparado ao extrato bruto. O potencial antimicrobiano não se manteve sobre *S. aureus* mas persistiu sobre *P. aeruginosa*. As emulsões também apresentaram permeação transmembrana significativa com 10% de extrato. E por fim, tiveram bons resultados na análise sensorial, obtendo uma intenção de compra em 80% dos entrevistados. Considerações Finais: As atividades avaliadas no presente trabalho sugerem possíveis aplicações destes compostos na indústria cosmecêutica e/ou farmacêutica, assim como de outros extratos vegetais que apresentem composição química semelhante. Desta forma, o desenvolvimento de uma emulsão cosmecêutica poderá contribuir economicamente com o ciclo de produção agrícola, além de resultar em benefícios ao consumidor do produto em relação aos cuidados com a pele e saúde.

Palavras-chave: Fotoproteção. Compostos fenólicos. Resíduos de frutos. Annona. Cosmecêuticos



## ABSTRACT

Rural producers, agricultural cooperatives and even the food, pharmaceutical and cosmetic industries have been looking for solutions to reuse fruit residues in order to take advantage of bioactive compounds. In the Annonaceae family, the commercialization of atemoia stands out for representing 54% of sales. Atemoia is a hybrid fruit (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* Mill) that has relevant organoleptic, phytochemical and pharmacological properties. Generally, the fruit is discarded when it does not meet the standards of uniformity of color, size and shape required in food marketing. In this context, the objective of this work is to characterize extracts from the atemoia bark and then develop an emulsion with the atemoia bark as one of the raw materials. In cosmetology, when the product has subtherapeutic properties, it is classified as cosmeceutical. The worldwide interest in the use of natural raw materials in cosmeceuticals is growing, therefore, concomitant with the development of formulations, the concentrations of all components must be evaluated in tests of physical, chemical and microbiological stability. Results: The total phenolic compounds in the extracts were 144mg EAG 100g<sup>-1</sup> and 153.6 mg EAG 100g<sup>-1</sup> for the extracts at 50:50 and 70:30 respectively. The minerals were K and Fe. In the disk antibiogram and minimum bactericidal concentration (CMB) by microdilution and by micro drop, the extracts had CMB of 25mg.mL<sup>-1</sup> for *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The sun protection factor (SPF) was better at higher concentrations. The anti-inflammatory activity evaluated by the inhibition of phospholipases, was more effective in the highest concentrations of extract, while in thermal hemolysis the lowest concentrations exerted a greater protective effect on the erythrocyte membrane. When incorporated into the emulsions, the extracts, at concentrations of 2%, 5% and 10%, showed physical-chemical and microbiological stability with pH 5.8 and density 1.2g mL<sup>-1</sup>. The SPF decreased when compared to the crude extract. The antimicrobial potential was not maintained on *S. aureus* but persisted on *P. aeruginosa*. The emulsions also showed significant transmembrane permeation with 10% extract. And finally, they had good results in the sensorial analysis, obtaining a purchase intention in 80% of the interviewees. Final Considerations: The activities evaluated in the present work suggest possible applications of these compounds in the cosmeceutical and / or pharmaceutical industry, as well as other plant extracts with similar chemical composition. In this way, the development of a cosmeceutical emulsion can contribute economically to the agricultural production cycle, in addition to resulting in benefits to the consumer of the product in relation to skin care and health.

Keywords: Photoprotection. Phenolic compounds. Fruit residues. Annona. Cosmeceuticals

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 Efeitos biológicos e terapêuticos de alguns minerais .....	20
Figura 1. Atemoias ( <i>Annona squamosa</i> L x <i>Annona cherimola</i> Mill) que seriam descartadas.....	3
Figura 2. Distribuição geográfica das espécies da família Annonaceae.....	4
Figura 3. Ancoramento dos compostos fenólicos na PLA <sub>2</sub> isolada da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> . .....	6
Figura 4. Compostos bioativos presentes nas porções da fruta <i>Annona chemirola</i> Mill x <i>Annona squamosa</i> L (Atemoia) .....	9
Figura 5. Compostos utilizados nas principais associações de fotoprotetores químicos comercializados no Brasil.....	13
Figura 6. Fenômeno de Ressonância de elétrons na estrutura da oxibenzona (a) e antranilatos (b).....	15
Figura 7. Moléculas representativas de diferentes classes de metabólitos secundários com atividade antioxidante e/ou fotoprotetora .....	16
Figura 8. Estrutura de Ressonância da Luteína .....	17
Figura 9. Avaliação da dose mínima de eritema <i>in vivo</i> .....	18
Figura 10 Emulsões com extrato de casca de atemoia .....	21
Figura 11. Organograma das metodologias .....	22

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL	8
ABSTRACT	9
APRESENTAÇÃO	14
CAPÍTULO I	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REFERENCIAL TEÓRICO	3
3.1 Propriedades Farmacológicas atribuídas a atemoia	5
3.2 Fitoquímica das espécies <i>Annona squamosa</i> , <i>A. cherimola</i> e do híbrido atemoia	7
3.3 Formulações fitocosméticas	10
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS	23
Artigo 01	28
ANTI-INFLAMMATORY, ANTIMICROBIAL AND PHOTOPROTECTIVE PROPERTIES OF ATEMOYA EXTRACTS	28
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Coleta e Identificação do material	31
2.2 Obtenção dos Extratos de casca de atemoia	31
2.3 Análises químicas	31
2.3.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)	31
2.3.2 Determinação da composição mineral	32
2.4 Análises Microbiológicas	32
2.4.1 Atividade antibacteriana por disco-difusão dos extratos etanólicos sobre bactérias	32
2.4.2 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)	33
2.5 Determinação do FPS espectrofotométrico dos extratos da casca de atemoia	34
2.6 Prospecção da atividade anti-inflamatória	34
2.6.1 Atividade fosfolipásica	34
2.6.2 Atividade anti-inflamatória complementar <i>in vitro</i> : Hemólise térmica	35
2.7 Análise estatística	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36

3.1	Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais	36
3.2	Determinação da composição mineral	37
3.3	Atividade Antimicrobiana	39
3.3.1	Atividade antimicrobiana por disco-difusão dos extratos etanólicos	39
3.4	Determinação do FPS espectrofotométrico dos extratos da casca de atemoia	43
3.5	Atividade anti-inflamatória	46
3.5.1	Atividade Fosfolipásica	46
3.5.2	Atividade anti-inflamatória complementar: Hemólise térmica	48
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52
	ARTIGO 2	56
	COSMECÊUTICO A BASE DE EXTRATO DE CASCA DE ATEMOIA: AÇÃO FOTOPROTETORA E ANTIMICROBIANA	56
	RESUMO	57
1	INTRODUÇÃO	58
2	MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1	Coleta do material e obtenção do extrato	59
2.2.	Formulação de Emulsão não-iônica	60
2.3	Parâmetros de estabilidade preliminar da emulsão	61
	Controle de qualidade microbiológico	62
2.4	Avaliação da permeação transmembrana <i>in vitro</i>	62
2.5	Fator de Proteção Solar Espectrofotométrico da emulsão	63
2.6	Atividade antimicrobiana	63
2.7	Análise Sensorial e Intenção de compra	64
2.8	Análise estatística	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1	Parâmetros de estabilidade preliminar da emulsão	65
3.2	Avaliação da permeação transmembrana <i>in vitro</i>	67
3.3	FSP Espectrofotométrico da emulsão	69
3.4	Atividade antimicrobiana	71
3.5	Análise sensorial e intenção de compra	73
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS	75



## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese está dividida em capítulos: No primeiro capítulo constam a Introdução, Objetivos, Referencial teórico e as Considerações finais. No segundo capítulo constam os resultados desta tese que estão apresentados sob a forma de artigos. Cada artigo está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão dos mesmos. O primeiro aborda as propriedades dos extratos etanólicos da casca de atemoia e o segundo as propriedades de emulsões contendo 2%, 5% e 10% destes extratos.

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas têm buscado soluções para reutilizar resíduos de frutos de forma a aproveitar os compostos bioativos. Para tanto, é necessário o estudo da composição das frações menos aproveitadas como a casca, semente e polpa de frutos que não atendem os padrões de uniformidade da cor, tamanho e formato exigidos na comercialização. Quando estes resíduos apresentam um valor agregado passam a ser denominados coprodutos.

Sob o ponto de vista do ciclo de produção agrícola, os grandes centros comerciais são abastecidos por cooperativas sustentadas pela agricultura familiar. Desta forma, complementar o faturamento com uma fonte de renda obtida a partir de uma matéria-prima que seria resíduo representa uma alternativa econômica interessante.

Dentre os frutos, a atemoia, um fruto híbrido (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* Mill) que pertence à família Annonaceae, pode apresentar interesse comercial devido a suas propriedades organolépticas, fitoquímicas e farmacológicas. A expansão de seu cultivo ocorreu em São Paulo, Minas Gerais, Paraná atingindo também zonas semiáridas da Bahia, Pernambuco e Alagoas. Seu consumo é *in natura*, em sucos, sorvetes ou geleias, portanto a aparência é importante na comercialização. Os resíduos são gerados a partir da seleção feita pelos produtores, e do processamento para a obtenção de polpas e produção de sorvetes e geleias, no entanto, poderiam ser fonte de compostos bioativos utilizados na indústria.

Apesar de não ter dados sobre a porcentagem de perdas na produção e comercialização deste fruto, sabe-se que defeitos na casca, danos mecânicos pela compressão durante armazenamento ou transporte, rompimento da casca desencadeiam desvalorização e descarte do fruto. Uma forma de compensar estas perdas seria através do reaproveitamento destes frutos. A casca da atemoia representa 28% de seu volume

(DA CRUZ et al., 2013), logo, o estudo de seus extratos ou moléculas isoladas poderia contribuir para o desenvolvimento de matérias-primas para novos produtos.

Seus metabólitos secundários apresentam fitoconstituintes com propriedades que permitem a exploração em um dos setores que tem crescimento exponencial: a cosmetologia.

Desta forma, a justificativa para uso de coprodutos de frutos obtidos a partir da casca da atemoia é atribuída aos benefícios cosmeceúticos relacionados aos seus constituintes e às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora e antimicrobiana com vistas ao desenvolvimento de uma nova alternativa econômica para os produtores que descartam os frutos além de promover uma redução no impacto ambiental.

## **2 OBJETIVOS**

Objetivo geral:

Resgatar os frutos impróprios para a comercialização e propor uma nova alternativa econômica para estes produtos que seriam descartados através do desenvolvimento de uma formulação cosmeceútica que pode contribuir com a saúde da pele.

Objetivos específicos:

- ✓ Reduzir o impacto ambiental com o destino consciente e produtivo economicamente dos resíduos obtidos a partir dos coprodutos de atemoia e de frutos reprovados para comercialização.
- ✓ Realizar extração rápida de compostos bioativos, eficiente e de baixo custo com a maceração e ultrassom usando solventes de baixa toxicidade.
- ✓ Determinar os compostos fenólicos totais.
- ✓ Avaliar o potencial antimicrobiano.
- ✓ Determinar a composição mineral.
- ✓ Avaliar o potencial anti-inflamatório *in vitro* (efeito do extrato sobre a Atividade Fosfolipásica).



- ✓ Avaliar a estabilidade da membrana celular através da hemólise térmica para prospecção da atividade anti-inflamatória.
- ✓ Desenvolver uma pré-formulação que será uma emulsão com o extrato de casca de atemoia
- ✓ Realizar análises de estabilidade preliminar
- ✓ Avaliar o FPS espectrofotométrico, nos comprimentos de onda de UVB, dos extratos e emulsão.
- ✓ Avaliar a permeação transmembrana
- ✓ Realizar a análise sensorial e intenção de compra da formulação.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

A atemoia é derivada do cruzamento interespecífico de um fruto tropical, frutado-conde ou pinha (*Annona squamosa* L) e um subtropical, cherimoia (*Annona cherimola* Mill) (Figura 1).

Figura 1. Atemoias (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* Mill) que seriam descartadas

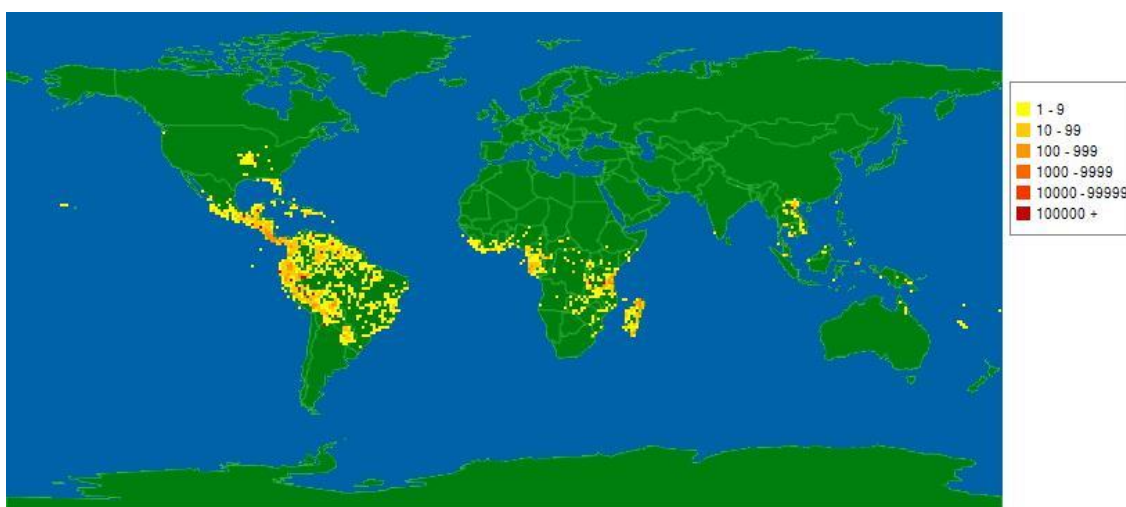


Fonte: Do autor (2018)

A polinização natural é feita por insetos nitidulídeos mas, em regiões onde este inseto é escasso, a polinização artificial com bombinhas ou pincéis garante a melhora da produção da atemoia. A colheita ocorre entre 6 e 7 meses após a poda e estende-se de 30 a 40 dias com a polinização artificial. Existem os cultivares: Gefner, African pride, Bradley, PR3, QAS e Thompson que diferenciam-se quanto à produtividade.

As anonáceas da espécie *Annona cherimola* são cultivadas na Austrália, Chile, Espanha, Estados Unidos, Nova Zelândia e Israel; a espécie *Annona squamosa* é cultivada na Tailândia, Filipinas, Brasil, Cuba e Índia (SÃO JOSÉ et al., 2014). No Brasil a produção de atemoia destaca-se nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Paraná (Figura 2).

Figura 2. Distribuição geográfica das espécies da família Annonaceae



Fonte: <http://www.tropicos.org/NamePrint.aspx?nameid=42000007&tab=maps> <Acesso em jun/2020>.

A comercialização das Annonaceae concentra-se na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) com 61% e CEASA (Central Estadual de Abastecimento) no Rio de Janeiro com 29%. A principal anonácea comercializada é a atemoia (54%), seguida pela pinha (41%) e graviola (5%). Em 2017 a produção nacional de atemoia atingiu 4840 toneladas sendo 2279 toneladas em SP, 2205 toneladas em MG e 186 toneladas na BA. Em Minas gerais destacam-se os municípios de Paraisópolis, Turvolândia e Jaíba com 25%, 22,6% e 18,7% da produção, respectivamente. O valor estimado da produção nacional foi de 21 milhões de reais (IBGE, 2017).

Os compostos fitoquímicos da atemoia que se destacam são compostos fenólicos, alcaloides, taninos,  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol e ácidos graxos insaturados

como o oleico e linoleico (MORAES, 2016). Estes compostos são responsáveis pelas diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, por isso, é relevante explorar seus potenciais para fins cosmeceuticos.

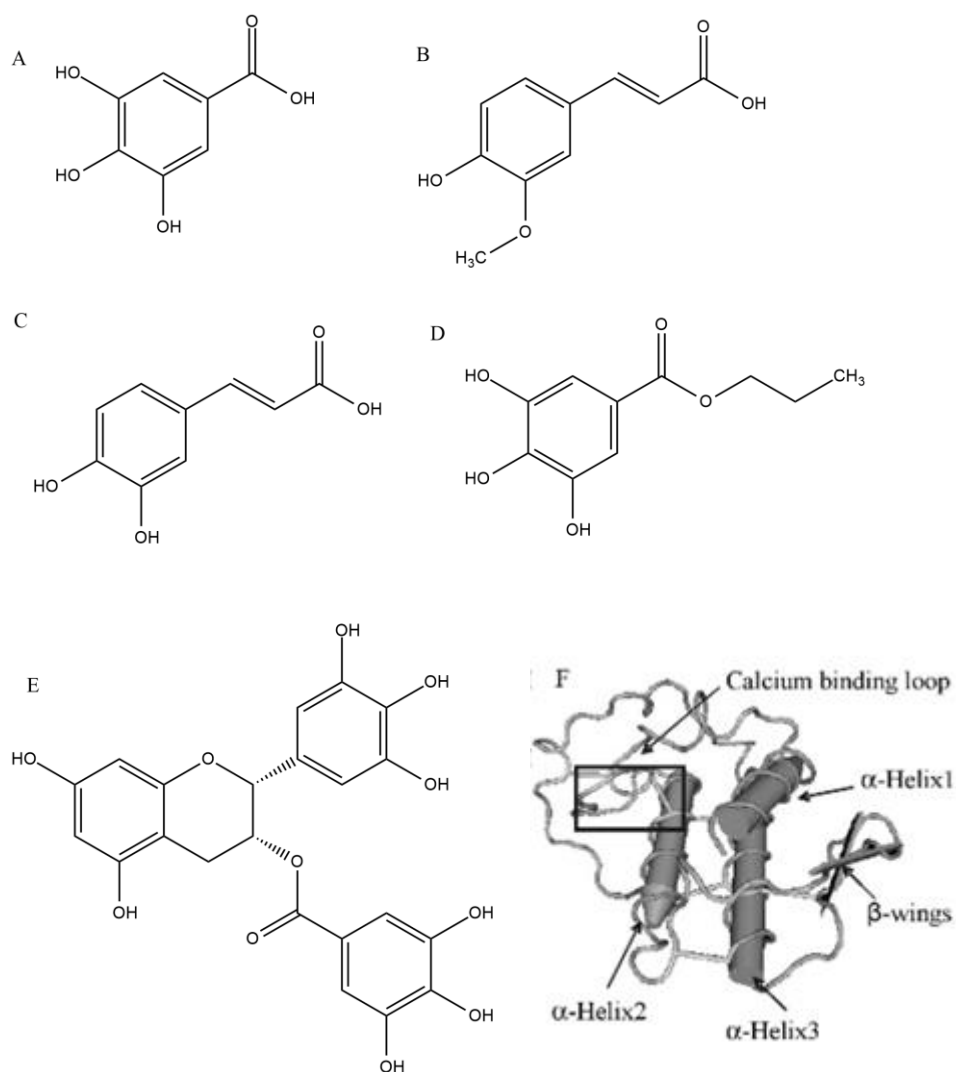
### 3.1 Propriedades Farmacológicas atribuídas a atemoia

No âmbito terapêutico, devido as diversas propriedades da atemoia, foi avaliado o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em camundongos usando extrato etanólico de atemoia (SILVA, 2016). Foram identificadas propriedades antimicrobianas dos extratos etanólico dos talos e metanólico das folhas contra cepas de *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (RABELO et al., 2014). Outro estudo com o extrato da casca da atemoia mostrou a inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* (MORAES, 2016). A ação antiangiogênica foi atribuída ao extrato etanólico das sementes de atemoia correspondendo assim a um importante adjuvante na terapia anticâncer (YI et al., 2014).

Em uma revisão da espécie *Annona squamosa*, o extrato das folhas da atemoieira regulou o hipertireoidismo induzido em ratos (PANDA et al., 2007), o extrato da raiz apresentou atividade antidiabética (MOHD et al., 2009); foi também relatada atividade relaxante vascular desencadeada pelo ciclosquamosin B isolado da semente da *Annona squamosa* (MORITA et al., 2006) e atividade antiúlcera (YADAV et al., 2011) sendo todas estas características supracitadas atribuídas a alguns de seus fitoconstituintes.

Pereanez e colaboradores (2011) mostraram o ancoramento de alguns metabólitos secundários vegetais (ácido cafeico, gálico, felúrico, propilgalato e epigalocatequina galato) na estrutura de uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Figura 3). Esta interação pode estar relacionada aos efeitos anti-inflamatórios dos frutos que contém estes ácidos fenólicos e seus derivados.

Figura 3. Ancoramento dos compostos fenólicos na PLA<sub>2</sub> isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.



Legenda: A. Ácido gálico. B. Ácido ferúlico. C. Ácido Cafeico. D. Propilgalato. E. Epigalocatequina galato. F. Ligação de cálcio entre estes compostos com a PLA<sub>2</sub> do complexo de crotocina (CB isolado do *Crotalus durissus cumananensis*) (PDB code 2QOG) Os componentes estruturais foram construídos no ChemSketch 12.0, um software da ACD/Labs, disponível em <<http://acdlabs.com/download/chemsketch/download.html>>

Fonte: Pereanez et al. (2011)

### 3.2 Fitoquímica das espécies *Annona squamosa*, *A. cherimola* e do híbrido atemoia

Estudos fitoquímicos mostram que os frutos do gênero *Annona* contêm considerável quantidade de compostos fenólicos totais (CFT) (BARRECA et al., 2011; GARCIA-SALAS et al., 2015; VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008). Estudos científicos tem apresentado o isolamento de um grande número de acetogeninas (ACGs), uma classe de policetídeos naturais específicos à família anonácea que pode apresentar inúmeras atividades biológicas como citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana.

Das sementes de atemoia foram isoladas as acetogeninas artemoína-A + B + C + D, 12,15-cis-squamostatina-D e 12,15-cis-squamostatina-A (CHANG et al., 1999), annotemoína-1, annotemoína-2, annonisina (ZAFRA-POLO et al., 1998), atemotetrolina, buladecina (DURET; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1998), atemoiacina B (CHEN; YAO; WU et al., 1995), atemoiacina-E (WU et al., 2001), e da raiz a acetogenina atemoiacina-C (WU et al., 1999). Numa revisão sobre os componentes fitoquímicos da *Annona squamosa* foram encontrados nas sementes a anonastina, asimicina, squamocina, óleos essenciais contendo  $\beta$ -farneseno,  $\beta$ -pireno,  $\alpha$ -pireno, limoneno e no fruto diterpenos tipo caurano, ácido (-)-ent-caur-16-en-19-oico e ácido 16 $\alpha$ , 17-dihidroxi-ent-cauran-19-oico (VYAS et al., 2012), compostos estes com diversas atividades biológicas.

Estudos de Verma e colaboradores (2011) mostraram que os constituintes fitoquímicos da *Annona cherimola* foram alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, taninos, carboidratos, proteínas, compostos fenólicos, fitoesteróis e aminoácidos. Do caule e sementes da *Annona cherimola* foram isolados quatro ligninas e seis cauranos: (+)-*epi*-siringaresinol, annocherino-A (16 $\beta$ -hidroxi-17,19-diacetoxi-*ent*-caurano), (+)-siringaresinol, (+)-*dia*-siringaresinol, liri dendrino[(+)-siringaresinol-di-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo], Ácido 16 $\alpha$ -hidro-17-acetoxi-*ent*-caurano-19-oico, 16 $\beta$ -hidro-17-hidroxi-*ent*-cauran-19-al, 16 $\alpha$ -hidro-17-hidroxi-*ent*-cauran-19-al, Ácido 16 $\beta$ -hidro-

17-hidroxi-*ent*-cauran-19-oico e Ácido 16 $\alpha$ -hidro-17-hidroxi-*ent*-cauran-19-oico (CHEN et al, 1998) também do caule foram isolados 4 alcaloides annocherine A, annocherine B, cherianoine e romucosine H (CHEN et al., 2001). Enquanto que no óleo essencial dos frutos, os monoterpenos representam os constituintes principais (55,98%) e os sesquiterpenos estão presentes na proporção de 16%, sendo este óleo essencial ativo contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas mirabilis* (RÍOS et al., 2003).

Nas folhas de atemoeira foram identificados através de uma série de métodos espectrofotométricos (MS e RMN) sete alcaloides: incluindo duas aporfinas (anonaína e asimilobina), três oxoaporfinas (lanuginosina, liriodenina e lisicamina) e duas propanofinas (prontidífera e estefarina) (RABELO et al., 2014).

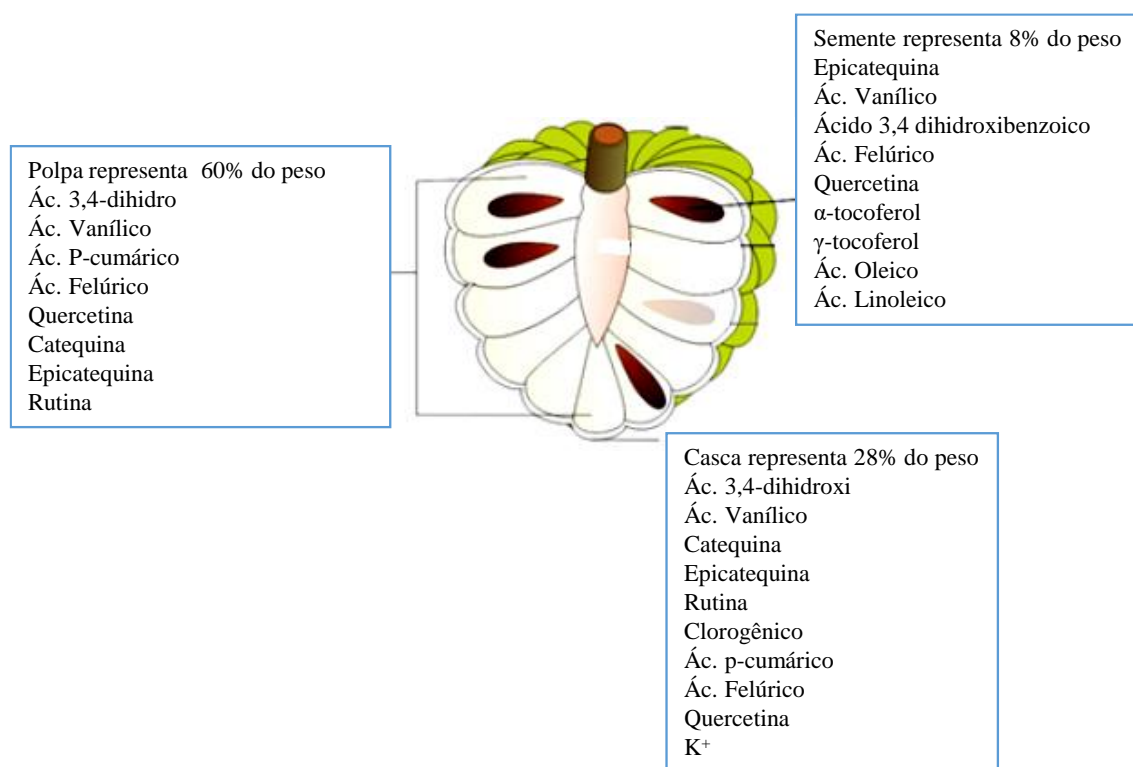
Além disso, do extrato etanólico obtido das cascas do caule da *Annona foetida* foram isolados alcaloides que apresentaram atividade antipromastigota em *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. donovani* e atividade anti-tripanososoma (QUEIROZ et al., 1996; COSTA et al., 2006, 2011).

Há poucos estudos sobre análise fitoquímica da casca do fruto. Moraes (2016) mostrou que o extrato etanólico (50:50 m/m) da casca de atemoia apresentou teor de CFT variando de 73 a 111 mg GAE<sup>1</sup>/100g peso seco (p.s), elevada capacidade antioxidante, além de apresentar um eficiente controle do *Bacillus cereus* e inibir o crescimento da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esses resultados destacam o potencial bioativo dos frutos das anonáceas, inclusive da atemoia e incentivam o aproveitamento dos coprodutos do fruto na aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (Figura 4). O conteúdo de compostos fenólicos da casca apresenta-se maior quando comparado às outras porções do fruto.

---

<sup>1</sup> GAE: Ácido Gálico Equivalente

Figura 4. Compostos bioativos presentes nas porções da fruta *Annona chemirola* Mill x *Annona squamosa* L (Atemoia)



Fonte: Cruz et al. (2013); Moraes (2016)

A extensão qualitativa e quantitativa das biomoléculas e micronutrientes do fruto agregam às características organolépticas e nutricionais, caracterizando um estímulo ao consumo e uso como cosmético. Por isso, é importante explorar os potenciais antioxidante, fotoprotetor, antibacteriano e anti-inflamatório da casca da atemoia através do desenvolvimento de uma pré-formulação cosmeceútica.

### 3.3 Formulações fitocosméticas

Produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais, protegê-los e/ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2004). Entretanto, no que tange os cosmeceuticos, o termo não é aplicado aos mesmos produtos universalmente (por exemplo, o protetor solar é considerado um medicamento de venda livre na América do Norte, mas um cosmeceutico na Europa), e o termo “cosmeceutico” não é reconhecido pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA. A categorização e a regulamentação dependerão de como as declarações de produtos são apresentadas ao público. Trata-se de um cosmético com propriedades subterapêuticas (RIVERS et al., 2008).

Os cosméticos são apresentados em formulações sólidas, semissólidas ou líquidas cujo princípio ativo é incorporado a um veículo classificado como emulsões água/óleo (A/O) ou (O/A) óleo/água, loções e géis (Farmacopeia Brasileira, 2019; FLOR; DAVOLOS; CORREA et al., 2007). Os principais constituintes são a base emulsionante, autoemulsionante, conservantes, antioxidantes e componentes que contribuam com uma textura e odor agradável quando aplicado à pele e seus anexos. O agente emulsificante pode perder suas características quando sofre reações de oxirredução ou decomposição, liberando ácidos graxos de cadeia curta que podem, por exemplo reduzir o pH do meio. Quando as emulsão são expostas ao sol, a radiação UV catalisa reações de descarboxilação produzindo CO<sub>2</sub> que em contato com a água produzirá HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduzindo o pH e conseqüentemente levando à protonação do carboxilato dos agentes emulsificante, desestabilizando a emulsão (CALVO et al., 2020).

A pele é um habitat para diferentes bactérias hospedeiras que a protegem. Variações em fatores hormonais, nutricionais, pH, temperatura, umidade, suor e conteúdo de sebo, podem promover um desequilíbrio neste ecossistema e desencadear infecções. A flora microbiana que parece levar à patogênese da acne inclui: *Pseudomonas acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, etc., (KUMAR et al., 2016).



Alguns fatores estão implicados na patogênese da acne, todos profundamente inter-relacionados sendo estes a produção de sebo pelas glândulas sebáceas; hiperqueratinização folicular; colonização bacteriana do folículo e por fim, a liberação de mediadores da inflamação no folículo e derme adjacente (WALTON; WYATT; CUNLIFFE, 1988) desta forma, cosmecêuticos que apresentarem atividade antibacteriana às cepas que colonizam o folículo podem contribuir para o tratamento da acne.

É crescente o interesse mundial no uso de ingredientes naturais em cosméticos (LEUNG; FOSTER, 2003), por isso, concomitante ao desenvolvimento de formulações, as concentrações de todos os constituintes e dos compostos fitoquímicos devem ser avaliadas em testes de estabilidade física, química e microbiológica. A análise sensorial é uma medida complementar que mensura em uma escala hedônica a aceitabilidade do consumidor pelo produto e sua intenção de compra (CHORILLI et al., 2009).

No contexto dos cosméticos, os protetores solares são definidos como preparações cosméticas que protegem a pele contra a radiação ultravioleta B (UVB - 290-320 nm) e A (UVA - 320-400 nm). A fotoproteção envolve fatores primários e secundários. Os fatores primários são protetores solares; isso inclui barreiras físicas que refletem e dispersam a luz e barreiras químicas que absorvem a luz. Os fatores secundários incluem antioxidantes, osmólitos (pequenas moléculas que estabilizam a célula em condições estressantes, regulando a hidratação como a taurina) e enzimas de reparo do DNA, que ajudam a limitar os danos à pele, perturbando a cascata fotoquímica que ocorre com a luz solar UV (CAMPOS et al., 2019; RAI; SHANMUGA; SRINIVA, 2012).

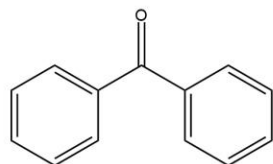
Quando uma ligação química é formada, se forma um orbital ligante e anti-ligante. Quando uma molécula recebe energia UV os elétrons de orbitais ligantes passam para os orbitais anti-ligantes. Quando este fornecimento de energia termina os elétrons saem do orbital anti-ligante e retornam para o orbital ligante. O estado excitado é quando os elétrons estão no orbital anti-ligante. Desta forma, a absorção de energia UV pelos filtros solares químicos a transforma em uma energia menos danosa (PAVIA et al., 2015).

Os fotoprotetores são constituídos por princípios ativos classificados como filtros físicos ou químicos. Os filtros físicos, são moléculas inorgânicas como o óxido

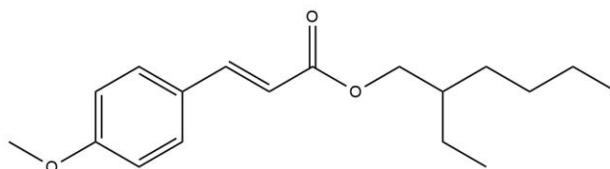
de zinco e dióxido de titânio. O mecanismo destes filtros consiste basicamente na reflexão e a dispersão da luz UVA e UVB. As propriedades refletivas determinam a eficácia dos filtros solares. Essas propriedades incluem o índice refletivo, o tamanho das partículas, a espessura do filme e a dispersão da base. Quanto maior o índice refletivo, melhor o filtro UV (CAMPOS et al., 2019; HEURUNG; RAJU; WARSHAW, 2014).

Por outro lado, os filtros químicos são compostos orgânicos que absorvem principalmente a radiação UVB e dissipam a energia como calor ou luz. Estes compostos incluem: inoxato, dioxibenzona, ensulizol, homosalato, meradima, octinoxato, octilato, octocrileno, padimate, sulisobenzona, oxibenzona e avobenzona, geralmente formulados em várias combinações (CAMPOS et al., 2019; SAUCEDO; VALLEJO; GIMÉNEZ, 2020) (Figura 5).

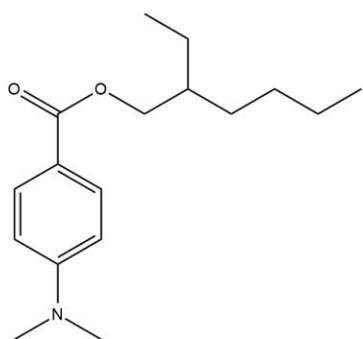
Figura 5. Compostos utilizados nas principais associações de fotoprotetores químicos comercializados no Brasil.



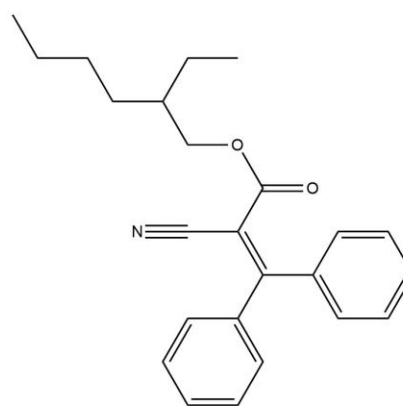
OXIBENZONA



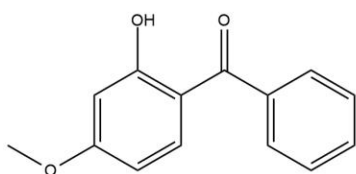
METOXICINAMATO DE OCTILA



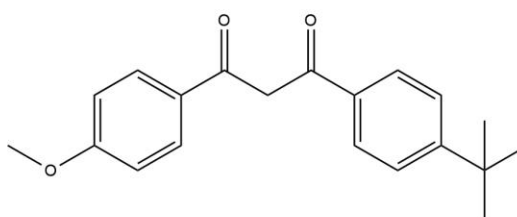
PADIMATO 0



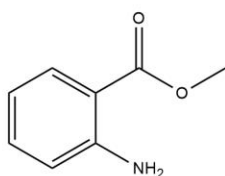
OCTACRILENO



OXIBENZONA



AVOBENZONA



METILANTRANILATO

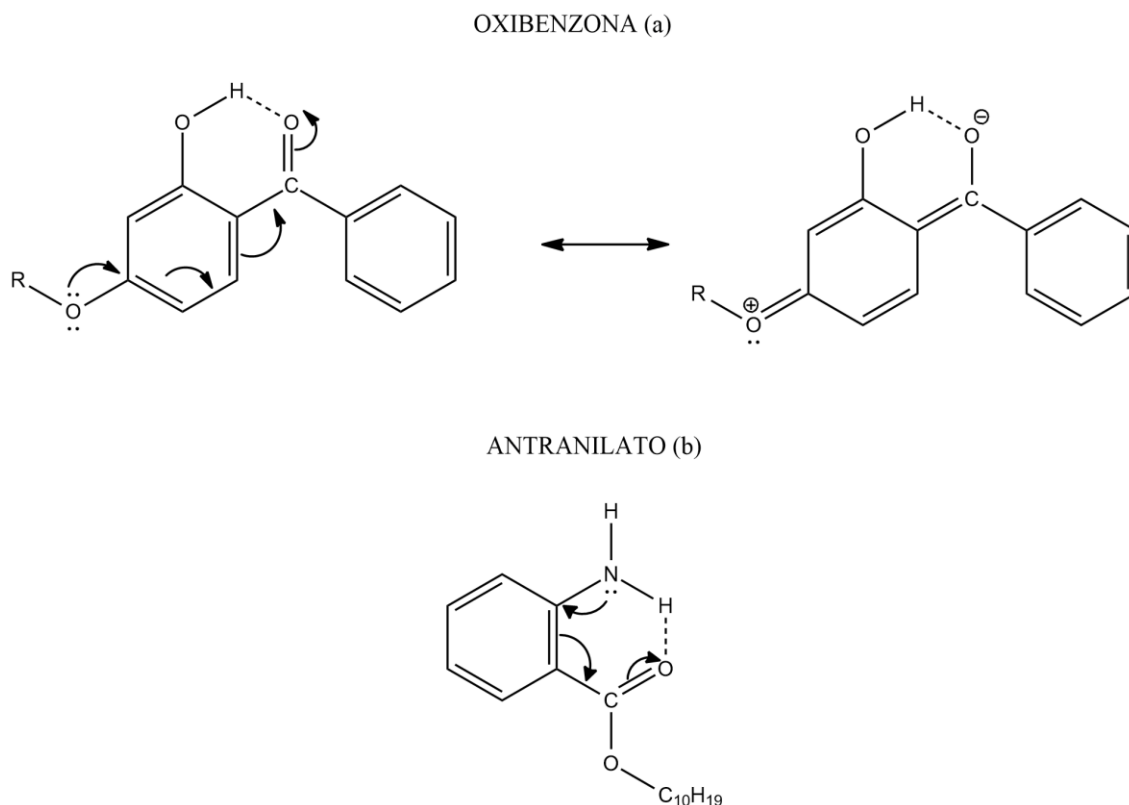
Fonte: Guaratini et al (2009) apud Pharmaceutical Market Brazil (PMB)

O mecanismo de ação dos filtros químicos é baseado em sua estrutura química, envolvendo um composto aromático conjugado com a carbonila (C=O) permitindo que os raios UV de alta energia sejam absorvidos, fazendo com que a molécula esteja em um estado excitado. À medida que a molécula retorna ao estado fundamental, ela libera a energia mais baixa de comprimentos de onda mais longos (CAMPOS et al., 2019; HEURUNG; RAJU; WARSHAW, 2014).

O 2-etil-hexil-p-metoxicinamato de octila (MOC) é um filtro solar químico com concentração máxima de 10% nas formulações. Absorve efetivamente a radiação UVB. É um líquido amarelo claro, inodoro, solúvel em etanol e álcool isopropílico, óleo mineral, insolúvel em água, glicerina e propilenoglicol. Apresenta  $Abs_{m\acute{a}x}$  na faixa 289 a 311nm em etanol ou óleo mineral com absorvidade molar de  $\epsilon_{320nm}$  23300 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Fig 5). Apresenta estabilidade se armazenado em recipiente metálico revestido ou de fibra e protegido da luz (CAMPOS et al., 2019; FLOR et al., 2007; LOPES; DA CRUZ; DE ALELUIA BATISTA, 2015).

A 2-hidroxi-4-metóxi-benzofenona ou oxibenzona é outro filtro solar químico com concentração máxima de 6% nas formulações. É um pó de cor creme, possui leve odor característico, solúvel em acetato de etila, etanol, álcool isopropílico, acetona e insolúvel em água e propilenoglicol. Apresenta pico de Absorção máxima na faixa de 288-289nm em etanol e absorvidade molar de  $\epsilon_{288-329nm}$  14000 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Figura 6a). Apresenta estabilidade se armazenado em recipiente fechado em área seca e fria, protegido de fontes de calor (CAMPOS et al., 2019; FLOR et al., 2007; LOPES; DA CRUZ; DE ALELUIA BATISTA, 2015).

Figura 6. Fenômeno de Ressonância de elétrons na estrutura da oxibenzona (a) e antranilatos (b)

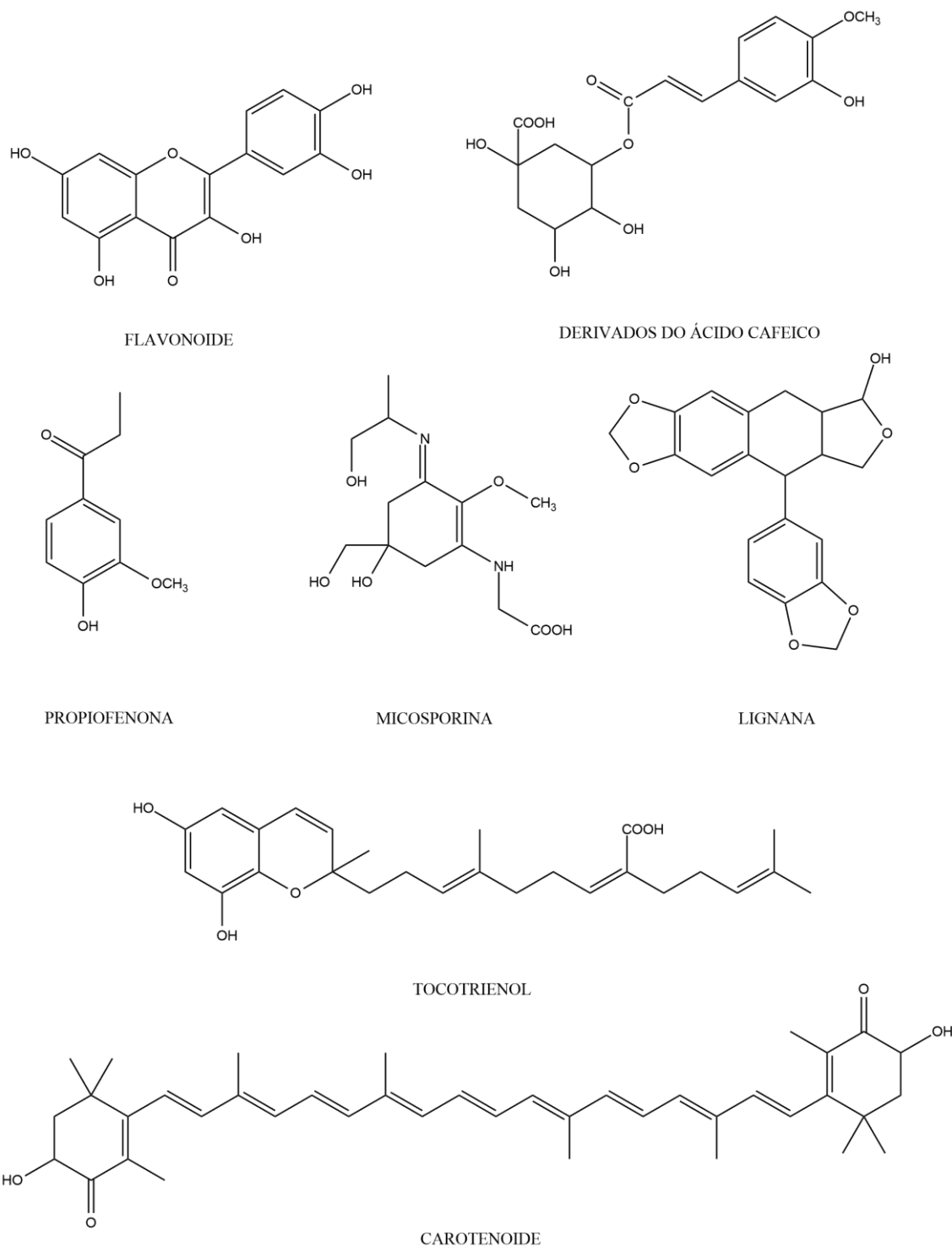


Fonte: Lopes; da Cruz; de Aleluia Batista (2015)

O metilantranilato ou 2-aminobenzoato de metila (IUPAC) pertence à classe dos Antranilatos, com fórmula molecular  $C_8H_9O_2$ . Apresenta-se líquido a temperatura ambiente. Possui massa molar de  $151,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figura 6b). É um filtro UVA, lipofílico, sendo usado nas formulações com concentração entre 3,5 e 5% (CAMPOS et al., 2019; FLOR et al., 2007; LOPES; DA CRUZ; DE ALELUIA BATISTA, 2015).

A análise do espectro de absorção de uma solução contendo Benzofenona, Metoxicinamato de octila, Metilantranilato e compostos fenólicos pode indicar o quanto estes compostos contribuem com a fotoproteção de fitocosméticos (Figura 7).

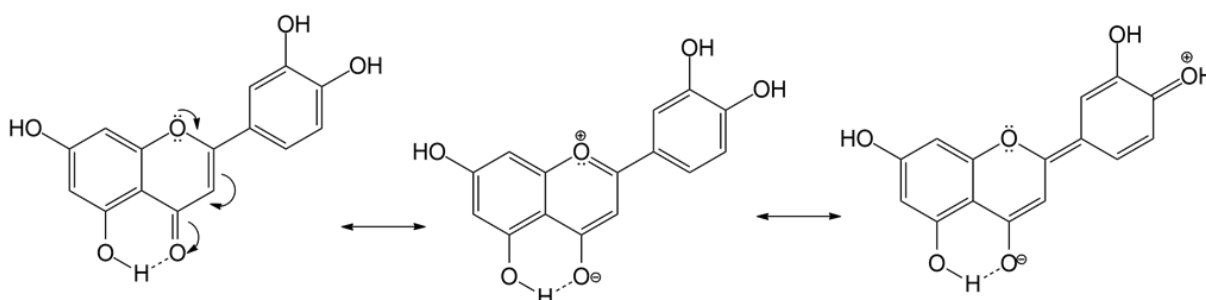
Figura 7. Moléculas representativas de diferentes classes de metabólitos secundários com atividade antioxidante e/ou fotoprotetora



Fonte: Guaratini et al (2009)

Os compostos fenólicos possuem semelhança estrutural aos filtros químicos, apresentando um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano ligado ao anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (MUNHOZ et al., 2012) (Figura 8). Os flavonoides, quando dispersos em etanol, apresentam dois picos de absorção sendo um entre 240-280nm e o outro entre 300-550nm, mostrando uma possível absorção da radiação UV, cujo comprimento de onda está compreendido entre 290-320 (UVB) e 320-400 (UVA) (BOBIN; RAYMOND; MARTINI, 1994). Este mecanismo sugere um potencial fotoprotetor para a casca de atemoia por ser rica em compostos fenólicos.

Figura 8. Estrutura de Ressonância da Luteína



Fonte: Kontogianni et al (2013)

A ligação de hidrogênio interna (Fig 6 e 8) cria uma carga positiva no oxigênio da carbonila e faz a conjugação aumentar pois os pares de elétrons, com nível energético mais alto devido a esta ligação saem do orbital ligante para o anti-ligante mais facilmente. Desta forma, pelo fato do estado fundamental tanto dos filtros químicos quanto dos metabólitos secundários estar mais alto, os elétrons já estão dispostos a se movimentarem com mais facilidade do ligante para o anti-ligante. Assim, o *GAP* de energia do estado fundamental e do estado excitado diminui, envolvendo a liberação de uma energia menos danosa (PAVIA et al., 2015).

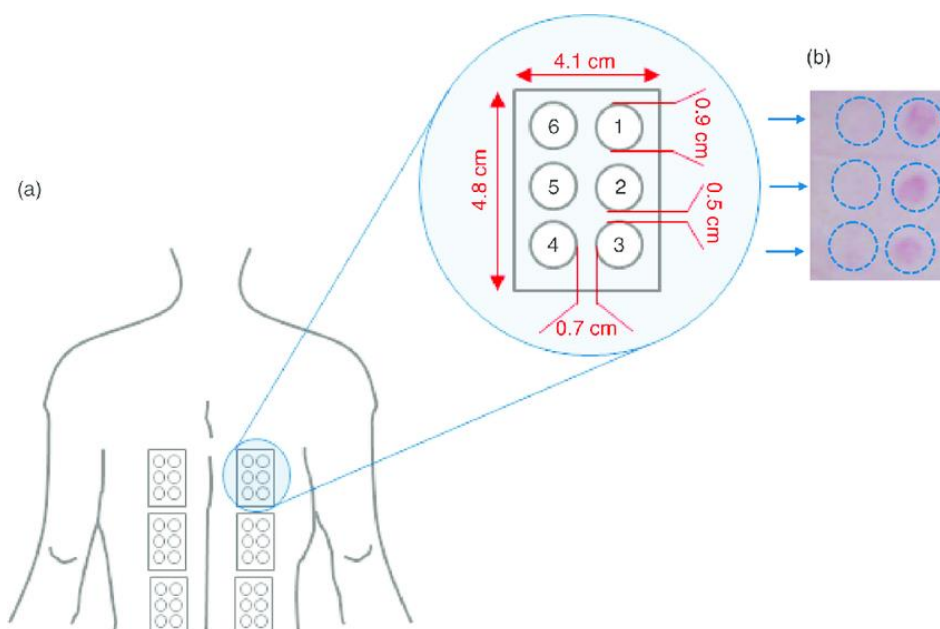
Para a determinação do FPS (Fator de proteção solar), é preconizado, no Brasil, de acordo com a resolução RDC nº 237/02 de 22 de agosto de 2002 (Brasil, 2002) a utilização de metodologia *in vivo*, empregando voluntários sadios com diferentes tipos de pele (Figura 9). A determinação do FPS avalia a capacidade dos filtros solares para a

porção UVB do espectro eletromagnético. Como o UVB é o responsável por causar eritema na pele, um filtro bastante eficaz é aquele que é capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar (NOBILE et al, 2016).

$$FPS = \frac{DME \text{ pele protegida}}{DME \text{ pele desprotegida}}$$

DME: Dose mínima da radiação capaz de formar o eritema mínimo

Figura 9. Avaliação da dose mínima de eritema *in vivo*



Legenda: O valor de FPS consiste na razão entre o tempo de exposição à radiação ultravioleta necessário para produzir eritema na pele protegida pelo protetor solar e o tempo, para o mesmo efeito, com a pele desprotegida com um fotoprotetor físico e/ou químico em diferentes concentrações. (a) Esquematização dos gabaritos para aplicação das amostras com e sem filtro solar. (b) Fotografia da epiderme com eritema após determinado período de tempo e a reação eritematosa.

Fonte: Nobile et al (2016)

Mansur e colaboradores (1986) correlacionaram a determinação do FPS em seres vivos e por espectrofotometria. Para a obtenção do FPS espectrofotometricamente é utilizada a seguinte equação:



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

Onde:

FPS= Fator de Proteção Espectrofotométrico

FC = Fator de correção = 10 referente a um FPS 4

$\sum_{290}^{320}$  = Somatório

EE ( $\lambda$ )= Efeito eritemogênico da radiação de  $\lambda$  em nm de acordo com a tabela de Mansur

I( $\lambda$ )= Intensidade da radiação solar no  $\lambda$  em nm

Abs( $\lambda$ )= Leitura espectrofotométrica da Absorbância dos extratos e controles no  $\lambda$  em nm.

A proposta do método *in vitro* é ser uma ferramenta útil, pois pode ser utilizado como um pré-teste para a determinação do FPS, no processo de desenvolvimento de pré-formulações fotoprotetoras, sendo uma metodologia simples, de rápida execução, de baixo custo e com pequeno desvio padrão nos resultados.

Um aspecto importante nos cosmecêuticos é seu potencial antioxidante para prevenção do envelhecimento e de doenças além do potencial anti-inflamatório.

Os anti-inflamatórios tópicos podem ser esteroides (AIE) como hidrocortisona, dexametasona e betametasona ou não-esteroidais (AINE) como o diclofenaco e piroxicam. Os AIES e AINEs tópicos, ao agirem diretamente no local da aplicação, mantêm níveis séricos baixos e são seguros com relação aos efeitos adversos sistêmicos (RANG et al, 2016). Já o caráter antibacteriano de extratos incorporados aos cosmecêuticos podem apresentar propriedades antissépticas para a epiderme, no controle da acne ou ainda contribuir para a estabilidade microbiológica da formulação.

Outra classe importante de componentes presentes nos cosméticos e que apresenta um sinergismo com as características hidratantes, anti-inflamatória e antioxidante dos cosmecêuticos são os minerais (Tabela 1). Estudos experimentais demonstraram que esses oligoelementos estimulam a migração dos queratinócitos, podendo colaborar na renovação celular e regeneração de tecidos (CHEBASSIER et al, 2004).

Tabela 1 Efeitos biológicos e terapêuticos de alguns minerais

Mineral	Efeitos biológicos / Usos terapêuticos
Alumínio	Dermatite aguda
Boro	Renovação celular, cicatrização de feridas
Cálcio	Regulação do crescimento de células epidérmicas e ação anti-inflamatória
Cobre	Ação antioxidante, recuperação de barreira cutânea
Enxofre	Anti-inflamatório, antimicrobiano e antifúngico
Magnésio	Dermatite aguda e renovação celular
Manganês	Renovação celular, cicatrização de feridas, recuperação de barreira cutânea
Selênio	Dermatite seborreia, tinea versicolor, ação antioxidante, proteção contra UVB
Sódio	Renovação celular
Zinco	Ação antioxidante, renovação celular, modulação da inflamação

Fonte: Nunes, Miyuki Tamura (2012).

Por fim, com o propósito de organizar as metodologias para o estudo dos extratos e no desenvolvimento da emulsão com estes extratos, elas foram distribuídas em análises químicas, microbiológicas e biológicas dos extratos. Em seguida, foi desenvolvido uma pré-formulação em uma emulsão não-iônica cuja estabilidade preliminar foi avaliada em diferentes parâmetros (Fig 10). Uma vez estável, os ensaios prosseguiram para determinar se nas concentrações utilizadas as atividades antimicrobiana e de fotoproteção se mantinham. Somado a isso, foi feito um levantamento da permeação transmembrana da formulação para validar sua liberação *in vitro*. Por fim, foi realizada a análise sensorial e intenção de compra do cosmecêutico desenvolvido com o extrato da casca da atemoia (Fig 11).

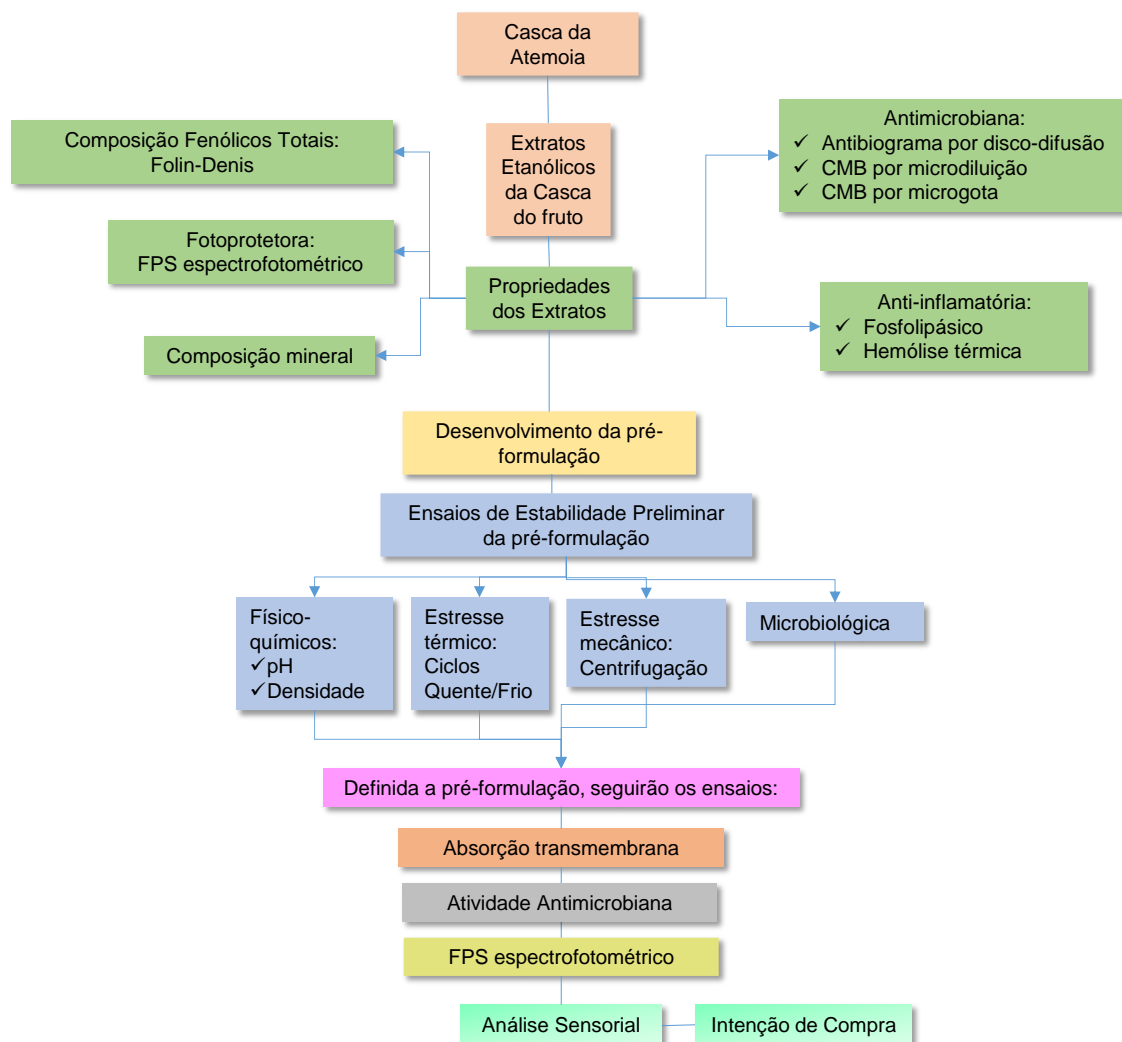
Figura 10 Emulsões com extrato de casca de atemoia



Amostras das emulsões não-iônicas contendo extrato de casca de atemoia a 2%, 5% e 10% respectivamente

Fonte: Do autor

Figura 11. Organograma das metodologias



Fonte: Do autor

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cosmetologia é um mercado promissor e quando associado a fins subterapêuticos pode contribuir para a melhora da saúde da pele e seus anexos. Agregar valor aos fitoconstituintes derivados de uma matéria-prima que seria descartada pode ser uma alternativa de renda para os pequenos e grandes produtores de frutos tornando o ciclo de produção sustentável.

Ao comparar com outras partes do fruto, a casca da atemoia concentra a maior parte de compostos fenólicos sendo fonte de compostos bioativos que apresentam respostas anti-inflamatórias, antimicrobianas e de fotoproteção que merecem atenção. Diferente da casca do caule, sementes e folhas, há poucas publicações sobre a casca deste fruto (MORAES, 2016), logo este estudo pode contribuir para o entendimento de mecanismos de metabólitos secundários no contexto cosmeceútico.

## REFERÊNCIAS

Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos [Internet]. Brasília: ANVISA; 2004 [citado 2010 ago 18]. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/cosméticos/guia\\_series.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosméticos/guia_series.htm).

BARRECA, D. et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill.(Annonaceae). **Food research international**, v. 44, n. 7, p. 2302-2310, 2011.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics and toiletries**, v. 109, n. 11, p. 63-70, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 237, de 22 de agosto de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de julho de 2002.

CALVO, F. et al. Integrated design of emulsified cosmetic products: A review. **Chemical Engineering Research and Design**, 2020.

CHANG, F. R. et al. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 883-889, 1999.

CHEBASSIER, N. et al. Stimulatory effect of boron and manganese salts on keratinocyte migration. **Acta dermato-venereologica**, v. 84, n. 3, 2004.

CHEN, W.; YAO, Z.; WU, Y. Study on the Chemical Constituents of *Annona Atemoya Hort* and the Isolation and Structure of Atemoyacin B. In: **Chinese Science Abstracts Series B**. n.53. p. 516-520,1995.

CHEN, C. Y. et al. Lignans and kauranes from the stems of *Annona cherimola*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, n. 5, p. 629-634, 1998.

CHEN, C. Y. et al. Four alkaloids from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 753-757, 2001.

CHORILLI, M. et al. Avaliação sensorial de formulações fotoprotetoras contendo filtro solar de amplo espectro. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n.3, p. 383-392, 2009.

COSTA, E. V. et al. A Pyrimidine- $\beta$ -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. **Journal of natural products**, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2006.

COSTA, E. V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- $\beta$ -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart.(Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011.

CRUZ, L. S. et al. Caracterização física e química das frações do fruto atemoia Gefner. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2280-2284, 2013.

DURET, P.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ. Bulladecin and atemotetrolin, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 499-506, 1998.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, p. 153-158, 2007.

GARCÍA-SALAS, P. et al. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, v. 78, p. 246-257, 2015.

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

HEURUNG, A. R.; RAJU, S. I.; WARSHAW, E. M. Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management. **Dermatitis**, v. 25, n. 6, p. 289-326, 2014.

IBGE Censo Agro 2017 disponível em [https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=35&tema=76231](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=35&tema=76231)

KONTOGIANNI, V. G. et al. Hydrogen bonding probes of phenol-OH groups. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 1013-1025, 2013.

KUMAR, B. et al. New insights into acne pathogenesis: exploring the role of acne-associated microbial populations. **Dermatologica sinica**, v. 34, n. 2, p. 67-73, 2016.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics** (2nd Edition): Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA, 649, p. 2003.

LOPES, F. M.; DA CRUZ, R. O.; DE ALELUIA BATISTA, K. Radiação ultravioleta e ativos utilizados nas formulações de protetores solares. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 4, 2015.

MANSUR, J. S. et al. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Anais brasileiros de dermatologia**, p. 167-72, 1986.

MOHD, M. et al. Antidiabetic activity of the aqueous extract of *Annona squamosa* in Streptozotocin induced hyperglycemic rats. **The Pharma Research**, v. 2, p. 59-63, 2009.

MORAES, I. V. M. **Extração de compostos bioativos da folha da gravioleira (*Annona muricata L.*) e concentração dos extratos por ultra e nanofiltração**. 2016. 165p. Tese. (Doutorado em Tecnologia de alimentos) - Unicamp, Campinas, 2016. Disponível em <  
[http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/321387/1/Moraes\\_IngridVieiraMachadode\\_D.pdf](http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/321387/1/Moraes_IngridVieiraMachadode_D.pdf) >

MORITA, H. et al. Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 17, p. 4609-4611, 2006

MUNHOZ, V. M. et al., Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.2, p. 225-232, 2012.

NOBILE, V. et al. Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) polyphenols. **Food & nutrition research**, v. 60, n. 1, p. 31871, 2016.

NUNES, S.; MIYUKI TAMURA, B. Revisão histórica das águas termais. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 3, 2012.

- PAVIA, D. L. **Introdução à Espectroscopia**. 2ed. SP: Cengage Learning, 2015.
- PANDA, S.; KAR, A. *Annona squamosa* seed extract in the regulation of hyperthyroidism and lipid-peroxidation in mice: possible involvement of quercetin. **Phytomedicine**, v. 14, n. 12, p. 799-805, 2007.
- PEREANEZ, J. A. et al. Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A2. **Vitae**, v. 18, n. 3, p. 295-304, 2011.
- QUEIROZ, E. F. et al. Pesseo and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. **Journal of natural products**, v. 59, n. 4, p. 438-440, 1996.
- RABELO, S. V. **Revisão de alcaloides do gênero Annona, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica da atemoia (*Annona cherimola* X *Annona squamosa*)**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em recursos naturais do semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.
- RAI, R.; SHANMUGA, S. C.; SRINIVAS, C. R. Update on photoprotection. **Indian journal of dermatology**, v. 57, n. 5, p. 335, 2012
- RANG, H. P.; DALE, M. M. **Rang & Dale farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016
- RÍOS, M. Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). **Revista de la sociedad Química de Mexico**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.
- RIVERS, J. K. et al. The role of cosmeceuticals in antiaging therapy. **Skin Therapy Lett**, v. 13, n. 8, p. 5-9, 2008.
- SÃO JOSÉ, A. R. et al. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal-SP**, v. 36, p. 86-93, 2014.
- SILVA, H. D. N. **Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto das folhas de atemoia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) EM ROEDORES**. 2016. 122p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, p.122, 2016.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.



VERMA, A. M. et al. Anti denaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in-vitro. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2011.

VIGILÂNCIA, S. A. N. DE. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira**, 6a edição, 2019.

VYAS, K. et al. Uma revisão atualizada sobre *Annona Squamosa*. **International Journal of Pharmacy & Therapeutics** , v. 3, n. 2, p. 107-118, 2012.

WALTON, S.; WYATT, E. H.; CUNLIFFE, W. J. Genetic control of sebum excretion and acne - a twin study. **British Journal of Dermatology**, v. 118, n. 3, p. 393-396, 1988

WU, P. et al. Annonaceous acetogenins from roots of *Annona atemoya* Hort. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 46-52, 1999.

WU, P. et al. Atemoyacin E, a bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from *Annona atemoya* seeds. **Journal of Asian natural products research**, v. 3, n. 3, p. 177-182, 2001.

YADAV, D. K. et al. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 666-675, 2011.

YI, J. M. et al. Anti-angiogenic potential of an ethanol extract of *Annona atemoya* seeds *in vitro* and *in vivo*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 353, 2014.

ZAFRA-POLO, M. C. et al. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1087-1117, 1998.

## CAPÍTULO II

**Artigo 01****ANTI-INFLAMMATORY, ANTIMICROBIAL AND PHOTOPROTECTIVE  
PROPERTIES OF ATEMOYA EXTRACTS**

Tatiane Silva de Abreu<sup>1</sup>; Mariana Aparecida Braga<sup>1</sup>; Mateus Santos Carapiá<sup>1</sup>, Jorge Pamplona Pagnossa<sup>2</sup>; Juliana Mesquita Freire<sup>1</sup>; Silvana Marcussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica – Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras – Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos– Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras - Brasil

[tatianeabreu@yahoo.com.br](mailto:tatianeabreu@yahoo.com.br); [marybraga07@yahoo.com.br](mailto:marybraga07@yahoo.com.br); [mscarapia@gmail.com](mailto:mscarapia@gmail.com);  
[jorgepampa@gmail.com](mailto:jorgepampa@gmail.com); [juliana.freire@ufla.br](mailto:juliana.freire@ufla.br); [marcussi@ufla.br](mailto:marcussi@ufla.br).

Artigo Formato de acordo com *Dematologic Therapy*

## RESUMO

Indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas têm buscado soluções para reutilizar resíduos de frutos de forma a aproveitar os compostos bioativos. Na família Annonaceae a comercialização da atemoia destaca-se por representar 54% das vendas. A atemoia é um fruto híbrido (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* Mill) que apresenta propriedades organolépticas, fitoquímicas e farmacológicas relevantes. Geralmente o fruto é descartado quando não atende os padrões de uniformidade da cor, tamanho e formato exigidos na comercialização alimentícia. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é caracterizar extratos da casca de atemoia e em seguida desenvolver uma emulsão tendo a casca da atemoia como uma das matérias primas. Na cosmetologia, quando o produto possui propriedade subterapêutica este é classificado como cosmecêutico. É crescente o interesse mundial no uso de matérias-primas naturais em cosmecêuticos, por isso, concomitante ao desenvolvimento de formulações, as concentrações de todos os componentes devem ser avaliadas em testes de estabilidade física, química e microbiológica. Resultados: Os compostos fenólicos totais nos extratos foram 144mg EAG 100g<sup>-1</sup> e 153,6 mg EAG 100g<sup>-1</sup> para os extratos a 50:50 e 70:30, respectivamente. Os minerais foram K e Fe. Na atividade antimicrobiana por disco-difusão foi proporcional ao aumento da concentração e concentração mínima bactericida (CMB) por microdiluição e por microgota os extratos tiveram CMB de 25mg.mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O fator de proteção solar (FPS) foi melhor nas maiores concentrações. A atividade anti-inflamatória avaliada pela inibição de fosfolipases, foi mais efetiva nas maiores concentrações de extrato, enquanto que na hemólise térmica as menores concentrações exerceram maior efeito protetor sobre a membrana dos eritrócitos. Desta forma, este estudo aponta para perspectivas futuras sobre o entendimento dos mecanismos de ação de alguns compostos naturais, e o desenvolvimento de formas de aplicação tópica destas moléculas na manutenção da saúde da pele através da pesquisa dos compostos bioativos presentes na casca de atemoia.

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura familiar organizada em cooperativas pode adquirir representatividade no mercado pela comercialização centralizada. Além disso, a obtenção de subsídios técnico-científicos com o objetivo de tornar o ciclo de produção sustentável através do reaproveitamento de coprodutos de frutos que seriam descartados, configura ferramenta importante para diversificar a renda. Estudos anteriores destacam que os coprodutos, como bagaço, sementes e cascas de frutos, que foram reprovados na comercialização, poderiam servir de matéria-prima para o desenvolvimento de cosméticos. Para tanto, é necessário fazer levantamentos dos potenciais antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e até fotoprotetor. Dentre os frutos, produzidos no Brasil e associados a grandes perdas, destaca-se a atemoia.

A atemoia é derivada do cruzamento interespecífico de um fruto tropical, frutido-conde ou pinha (*Annona squamosa L*) e um subtropical, cherimoia (*Annona cherimola Mill*), pertence à família Annonaceae e apresenta propriedades organolépticas, fitoquímicas e farmacológicas de grande interesse comercial. A casca deste fruto chega a representar 30% de seu peso e possui compostos fenólicos e minerais com propriedades fisiológicas importantes. Neste contexto, o objetivo no presente trabalho foi obter extratos de casca de atemoia utilizando metodologia de baixo custo e eficiente na extração de moléculas bioativas, além de avaliar algumas propriedades cosmeceúticas, toxicidade e viabilidade de incorporação dos extratos em formulação cosmética.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos conduzidos estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COEP da Universidade Federal de Lavras, Brasil) registrado com CAAE número 13100719.0.0000.5148. Os reagentes utilizados foram de qualidade analítica e pertencentes às marcas Merck, Synth, Sigma Aldrich e Vetec. Os frutos foram doados pela CASM (Cooperativa Agrícola do Sul de Minas).

## 2.1 Coleta e Identificação do material

A coleta ocorreu no município de Turvolândia, MG (Latitude: 21° 52' 32" S e Longitude: 45° 47' 13" W) em 18 de junho de 2018 cujos lotes de frutos de Atemoia eram destinados ao descarte. O material botânico foi identificado no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, local onde se encontra depositada uma exsicata da Atemoia Thompson sob registro ESAL 30248.

Aproximadamente 20kg do fruto foram higienizados com água corrente e tríplice lavagem com etanol 70%, despulpados e as cascas foram secas a temperatura de 50°C/60h para atingir 25% de umidade. Posteriormente, o resíduo foi triturado no moinho TE-631 (Tecnal), congelado a -18°C e liofilizado, protegido da luz. O material seco foi então, acondicionado à 4°C em frasco hermeticamente fechado, protegido da luz até o momento da extração.

## 2.2 Obtenção dos Extratos de casca de atemoia

A extração foi realizada com o solvente etanol, conforme metodologia descrita por Kähkönen et al. (1999), com algumas adaptações de Moraes (2016).

Em um tubo Falcon de 15mL, foi pesado 1g do material liofilizado e adicionado uma alíquota de 10 mL de solvente (solução etanólica 50:50 ou 70:30, etanol:água v/v). Em seguida, os tubos foram sonicados em ultrassom por 30 min, macerados *overnight* e centrifugados a 1500 x G por 15 min. O sobrenadante foi coletado e o precipitado extraído mais duas vezes com 5 mL de solvente nas condições previamente descritas. Os sobrenadantes coletados foram filtrados em papel tipo Watman nº1, submetidos a evaporação rotativa para retirada do etanol, congelados e posteriormente liofilizados.

## 2.3 Análises químicas

### 2.3.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O método de Folin-Denis foi utilizado para quantificação de compostos fenólicos totais em vegetais. Este método descrito por Swain e Hillis (1959) baseia-se na transferência de elétrons, em meio alcalino, de compostos fenólicos para complexos de ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ )/ fosfotungstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) formando

complexos azuis que são lidos espectrofotometricamente no comprimento de onda de 760nm. A reação ocorre em meio alcalino, em solução saturada de carbonato de sódio. Para a curva analítica os padrões de comparação utilizados foram o ácido gálico, a catequina e a epicatequina (componentes majoritários nos extratos) (MORAES, 2016), com seis pontos equidistantes, todos avaliados em triplicata e com concentração variando entre 0,04 e 0,24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### **2.3.2 Determinação da composição mineral**

As amostras foram submetidas a uma digestão nitroperclórica em blocos digestores com controle de temperatura para quantificação dos minerais (Fe, Zn, Mn, Cu, Ca, Mg, P, K e S). Colorimetria foi usada para quantificar P e S, fotometria de chama foi usada para K e espectrofotometria de absorção atômica foi usada para determinar as quantidades de Ca, Mg, Cu, Mn, Zn e Fe. Os procedimentos utilizados para analisar a composição mineral foram descritos por Malavolta et al. (1997).

### **2.4 Análises Microbiológicas**

Para a avaliação bactericida *in vitro* dos extratos etanólicos da casca de atemoia foram utilizados *Staphylococcus aureus* (GL 5674), *S. epidermidis* (ATCC12228), *S. pyogenes* (ATCC 8668) e *Pseudomonas aeruginosa* (INCQS 0025). Foi realizado o antibiograma por disco-difusão. A determinação da concentração mínima bactericida (CMB) ocorreu através da microdiluição em caldo e para confirmação do resultado, aplicou-se a técnica de microgota (CLSI, 2015).

#### **2.4.1 Atividade antibacteriana por disco-difusão dos extratos etanólicos sobre bactérias**

As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol, 15 mL; peptona bacteriológica 0,5 g; extrato de levedura 0,3 g; NaCl 0,5 g; água destilada 100 mL). As culturas estoque foram reativadas inoculando-se alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  em tubos contendo 10 mL de caldo triptona de soja (TSB), com posterior incubação a 37°C por 24 horas. As suspensões das culturas foram padronizadas em  $1,5\cdot 10^8$  UFC

(Unidades formadoras de colônias) $\text{mL}^{-1}$ . Em seguida, cada cepa bacteriana foi replicada em placa contendo TSA (Ágar de triptona de soja), e estas permaneceram em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após esse período, as colônias foram transferidas, com auxílio de alça bacteriológica, para tubos de vidro contendo caldo TSB até se obter uma diluição padrão utilizando como comparação a escala McFarland de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (CLSI, 2015).

A atividade antibacteriana por disco-difusão ocorreu com o espalhamento com alça bacteriológica, de  $200\mu\text{L}$  do caldo contendo as colônias em placas contendo TSA. Em seguida, discos de papel-filtro embebidos de  $10\mu\text{L}$  de cada extrato etanólico (50:50 e 70:30, etanol:água, v/v) em diferentes concentrações (10; 25; 50; 75; 100 e  $200\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ ) e  $10\mu\text{L}$  do controle negativo (Cloranfenicol 0,1%) foram colocados sobre os meios. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h e posteriormente foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição.

#### **2.4.2 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)**

Para determinar a CMB (Concentração Mínima Bactericida) dos extratos, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, conforme descrita pelo CLSI (2015) com adaptações.

As soluções dos extratos adicionadas nas microplacas foram preparadas dissolvendo-se 1 g dos extratos em pó (50:50 e 70:30, etanol:água, v/v) em  $0,5\text{mL}$  de etanol e  $4,5\text{mL}$  de caldo TSB, sendo a mistura homogeneizada em vortex. Tais soluções foram diluídas nas placas sequencialmente nas seguintes concentrações, 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$ . Alíquotas de  $100\mu\text{L}$  das soluções foram distribuídas nos poços das microplacas e inoculadas com  $10\mu\text{L}$  das culturas padronizadas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. As microplacas foram vedadas e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Os poços sem turvação corresponderam aos tratamentos com atividade inibitória. O ensaio foi realizado em triplicata e os controles corresponderam ao TSB+etanol; TSB+etanol+extrato 50:50; TSB+etanol+extrato 70:30 (negativos); TSB+etanol+inóculos das bactérias (positivos).

Após a verificação do crescimento/inibição nos poços das placas, foi realizado o plaqueamento (10  $\mu\text{L}$  do conteúdo de cada poço) em TSA, para determinação da CMB pela técnica de microgotas, com incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. A CMB foi determinada como aquela que, após incubação, não resultou em crescimento bacteriano na microgota depositada na placa. O experimento foi realizado em triplicata após o crescimento bacteriano no ensaio anterior.

## 2.5 Determinação do FPS espectrofotométrico dos extratos da casca de atemoia

Para determinação do comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e da absorbância máxima ( $\text{Abs}_{\text{max}}$ ), os extratos etanólicos 50:50 e 70:30 nas concentrações de 50 a  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  foram submetidos a uma varredura entre os comprimentos de onda de 290 e 400 nm verificando a absorção nas regiões ultravioleta A e B (UVA e UVB). O álcool etílico absoluto foi utilizado como branco. A benzofenona, metilantranilato e metoxicinamato de octila, todos em etanol absoluto, na concentração de  $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram utilizados como padrões e o experimento realizado em triplicata (BOBIN; RAYMOND; MARTINI, 1994). Os controles foram dispersos em etanol absoluto na concentração de  $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$  de Benzofenona, Metilantranilato e Metoxinamato de octila que possuem absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  288 e 328; 336; 311 nm, respectivamente. As absorbâncias obtidas foram aplicadas na equação determinada e descrita por Mansur e colaboradores (1986), para as conversões aos respectivos valores de FPS-UVB.

## 2.6 Prospecção da atividade anti-inflamatória

### 2.6.1 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi avaliada em gel de ágar conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988) com adaptações. O gel foi preparado em ágar bacteriológico 1%,  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ , gema de ovo (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) 1:3 v/v, PBS (pH 7,4) e azida de sódio 0,005%, sendo o meio vertido à temperatura de  $45\text{-}50^\circ\text{C}$  em placas de petri. Após a polimerização do gel, os tratamentos foram aplicados, em volume final de  $30 \mu\text{L}$ , em orifícios de 0,5 cm de diâmetro. Os géis contendo os tratamentos permaneceram na estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 12 horas. Como fonte de fosfolipases  $A_2$  foi utilizada peçonha de *Bothrops moojeni*, obtida



comercialmente. A peçonha foi incubada previamente com os extratos etanólicos da casca de atemoia, por 30 minutos a 37°C, nas proporções 1:0,01; 1:0,05; 1:0,1; 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:2,5 e 1:5 (peçonha:extrato; m:m). Os controles foram valerato de betametasona em etanol, nas concentrações de 0,1; 1 e 10  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  com o objetivo de inibir as PLA<sub>2</sub>s. A determinação da inibição da enzima foi realizada pela medida do halo translúcido formada no gel ao redor da aplicação das amostras, com o software livre ImageJ. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata, e em dois ensaios independentes.

### **2.6.2 Atividade anti-inflamatória complementar *in vitro*: Hemólise térmica**

O ensaio de estabilização da membrana das hemácias, através da inibição da hemólise induzida pelo calor, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Nkeh-Chungag e colaboradores (2015).

O sangue heparinizado foi centrifugado a 1500 x G por 5 min para separar o plasma das hemácias. Depois, foi preparada uma suspensão de hemácias 2% (v/v, mL:mL) em PBS, pH 7,4. Os tratamentos foram preparados em volume final de 200 $\mu\text{L}$ , contendo diferentes concentrações dos extratos etanólicos da casca de atemoia com 1300 $\mu\text{L}$  da suspensão de hemácias, e permaneceram incubados em microtubos, em banho por 30 min à 37°C. Em seguida, foram incubados por mais 20 minutos à 54°C em banho de aquecimento. Os incubados foram então centrifugados a 12000 x G por 5 minutos e avaliados em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 420 e 540nm. Os controles foram submetidos às mesmas condições de incubação e centrifugação. O controle positivo consistiu em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada para induzir a hemólise. Os controles negativos foram realizados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS a 37°C e 37°+54°C.

Foi utilizado 200  $\mu\text{L}$  de AINE (Ácido acetil salicílico) e AIE (Acetato de Hidrocortisona) 50 $\mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$  para comparar o desempenho do efeito anti-inflamatório (inibição da hemólise térmica) com as amostras.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da hemólise foi aplicada a equação:

$$\text{Atividade anti-inflamatória} = 1 - \frac{\text{Abs da Amostra} - \text{Abs do Controle com PBS}}{\text{Abs Controle 100\% hemólise} - \text{Abs do Controle com PBS}} \times 100$$

A subtração da Absorbância do Controle com PBS teve o objetivo de excluir os danos mecânicos sofridos durante a manipulação das amostras.

## **2.7 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância, e as médias comparadas usando o teste Scott Knott ( $p < 0,05$ ) com auxílio do programa estatístico (R Core Team, 2012).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais**

Determinados parâmetros, previamente descritos para a casca da atemoia como os CFT 111,45 mg<sub>GAE</sub> 100 g<sup>-1</sup>, capacidade antioxidante 314,98 mmol Trolox/g p.s pelo método ABTS e 3021,33 mmol Trolox/g p.s pelo método ORAC (MORAES, 2016), corroboram os dados obtidos no presente trabalho, mesmo se tratando de frutos de safras, anos e localizações geográficas diferentes (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos Fenólicos Totais (CFT) determinados na casca e extratos etanólicos da casca de atemoia

Amostras	CFT (mg EAG.100g <sup>-1</sup> )*	CFT (mg EC 100g <sup>-1</sup> )**	CFT (mg EEpic 100g <sup>-1</sup> ***)
Extrato Bruto da Casca de atemoia	186,8	40,28	30,32
ETOH: H <sub>2</sub> O, 50:50	144,0	68,00	54,16
ETOH: H <sub>2</sub> O, 70:30	153,6	73,76	58,76

Análise quantitativa dos CFT dos extratos da casca de atemoia com a curva padrão de Ácido Gálico, Catequina e Epicatequina. Os resultados são apresentados como média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão. \* p <0,05

\*EAG: Equivalente Ácido Gálico

\*\*EC: Equivalente Catequina

\*\*\*EEpic: Equivalente Epicatequina

Propriedades antioxidantes de compostos naturais que possuem diversas atividades biológicas e moleculares podem colaborar para proteger a pele, reduzindo processos inflamatórios, e a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), promovendo assim, homogeneidade na pigmentação da pele, suavização e prevenção de rugas além de proporcionar o aumento das propriedades de barreira da pele, especialmente contra microorganismos patogênicos (VOLLMER; WEST; LEPHART, 2018). Desta forma, a presença de fenólicos nos extratos de atemoia são fundamentais na promoção de efeitos desejáveis prospectados para formulações cosméticas ou cosmeceúticas.

### 3.2 Determinação da composição mineral

Observando os dados da tabela 2, a alta concentração de ferro poderia interferir no estado de oxidação da formulação porém, a rica composição fenólica presente nos extratos da casca de atemoia, confere a eles elevada ação antioxidantes (MORAES, 2016), promovendo equilíbrio à formulação.

Tabela 2: Composição mineral dos extratos etanólicos da casca de atemoia

Analito	Concentração
<b>Macronutrientes</b>	<b>g Kg<sup>-1</sup></b>
N	12,27
P	1,78
K	21,65
Ca	3,31
Mg	1,49
<b>Micronutrientes</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup></b>
B	18,07
Cu	7,64
Mn	13,21
Zn	21,98
Fe	78,10
Na	0

Perfil mineral do extrato etanólico da casca de atemoia 50:50 e 70:30. Não houve diferença entre as concentrações de macro e micronutrientes entre os extratos. Não foi detectado sódio na amostra analisada (0 mg/Kg). Os resultados são apresentados como média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$

O zinco desempenha um papel importante em três funções da pele, como a morfogênese, o reparo e a manutenção, que fornecem proteção e defesa por meio das proteínas e enzimas envolvidas nesses processos (MICHAELSSON; LJUNGHALL; DANIELSON, 1980; VOLLMER; WEST; LEPHART, 2018). Além disso é um cofator para atividade e defesa celular; proliferação de células da pele; cicatrização de feridas e propriedades anti-inflamatórias (SOUYOUL; SAUSSY; LUPO, 2018) por isso, sua presença nos extratos de atemoia pode contribuir com as propriedades benéficas à pele, quando este for usado no desenvolvimento de uma pré-formulação cosmética.

O cobre promove a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, levando ao rejuvenescimento da pele e reparo de feridas através de suas propriedades de reticulação de colágeno. Por fim, o cobre tem sido utilizado em tratamentos tópicos para cicatrização de feridas com o objetivo de reparar a pele danificada devido aos

seus efeitos anti-inflamatórios e antibacterianos (SOUYOUL; SAUSSY; LUPO, 2018).

Numa revisão literária feita por Nunes e Miyuki Tamura (2012), os autores relatam que os minerais exercem inúmeros efeitos biológicos na epiderme. O boro, magnésio, zinco e manganês contribuem para a renovação celular. Desta forma, poderão ser coadjuvantes para o desempenho de ações desejáveis com o uso da pré-formulação desenvolvida.

### **3.3 Atividade Antimicrobiana**

#### **3.3.1 Atividade antimicrobiana por disco-difusão dos extratos etanólicos**

A microbiota normal da pele inclui *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, entre outros. Considerando que esses microrganismos são oportunistas e têm perfis de alta resistência, são uma ameaça quando ocorrem lesões cutâneas, causando graves infecções localizadas mesmo com invasão sistêmica (RUSSO et al., 2016). Assim, encontrar extratos / compostos com alta atividade antibacteriana contra essas espécies pode ser considerado benéfico no desenho de formulações cosmeceúticas.

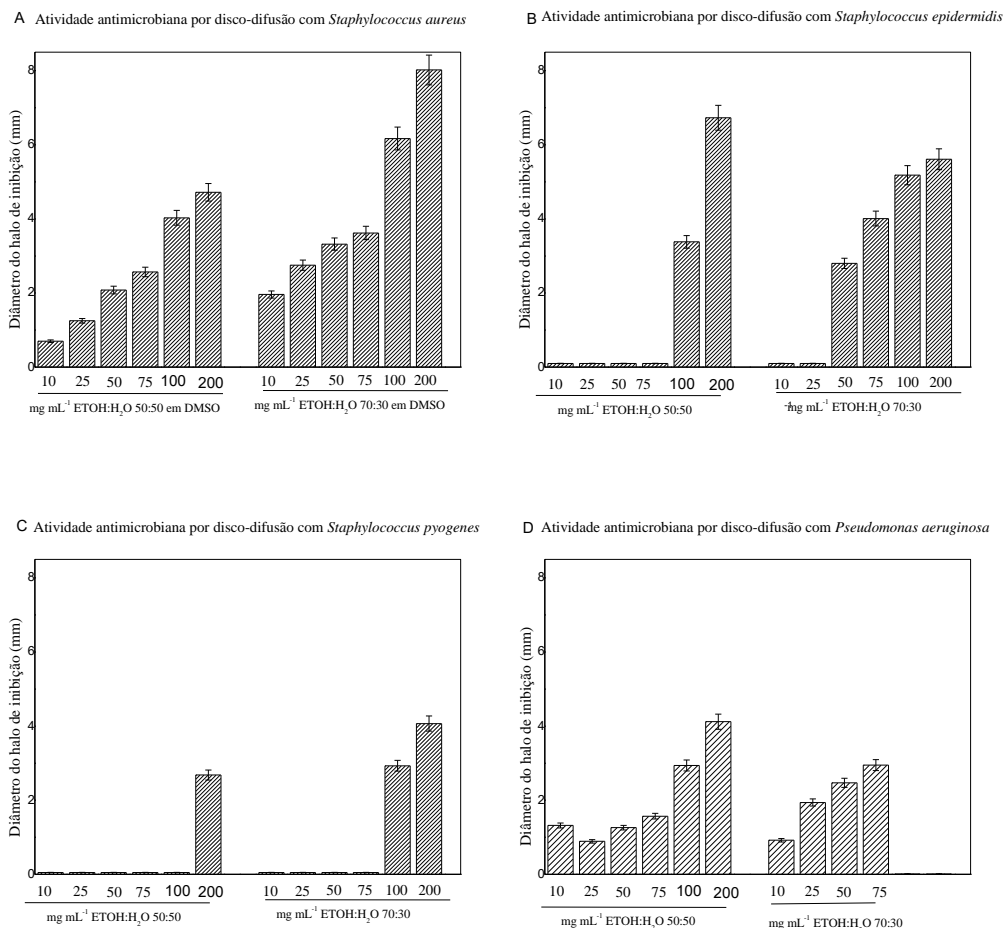
O extrato etanólico da casca de atemoia na proporção de 70:30 etanol/água apresentou uma inibição do crescimento das colônias de *S. aureus* 1,7 vezes maior que a exercida pelo extrato 50:50 (Figura 1A). Em adição, este extrato apresentou efeito bactericida apenas 2 vezes menor que o antibiótico utilizado como controle (Cloranfenicol).

Em ambos os extratos a porcentagem de inibição foi proporcional ao aumento da concentração. Esta atividade pode estar relacionada com os metabólitos secundários dos extratos da casca de atemoia.

Na composição fitoquímica da casca de frutos de *Annona reticulata* foi observada a presença de taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides, quinonas, terpenoides e fenóis. A concentração de taninos em extrato de acetona, obtidos da casca, foi de 10,496 mg TAE (Equivalente de ácido tânico), além da descrição de potencial

antioxidante e antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* (LYDIA et al., 2017). Estes dados são amparados pelo presente trabalho considerando as inibições de crescimento observadas para as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* a partir da concentração de  $50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  (Figura 1A, 1B e 1D).

Figura 1: Atividade antimicrobiana por disco-difusão com os extratos da casca de atemoia em diferentes concentrações



C+: Cloranfenicol 0,1% apresentou halo de inibição de 17mm(resultados não mostrados). C-: Etanol 50%, Etanol 70%, DMSO 5% (Resultados não mostrados). Amostras de extratos etanólicos 50:50 e 70:30 (etanol:água, v/v) dispersos em 5% de DMSO nas concentrações de 10, 25, 50, 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e algumas de 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram avaliadas através da atividade antimicrobiana por disco-difusão com os microrganismos (A) *S. aureus*, (B) *S. epidermidis*, (C) *S. pyogenes* e (D) *P. aeruginosa*  $1,5 \cdot 10^8$  UFC.

A cultura de *S. epidermidis* ao contrário da de *S. aureus*, foi mais sensível ao extrato etanólico 50:50, sendo observada inibição 1,2 vezes maior que a obtida para o extrato 70:30. Ao comparar com o controle contendo cloranfenicol, as inibições observadas foram 2,5 e 3,0 vezes menor. O extrato etanólico 70:30 apresentou maiores inibições a partir da concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  enquanto que o extrato 50:50 induziu formação de halo apenas nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 1B). Entre os

principais microrganismos que habitam a epiderme desencadeando a acne vulgaris está o *S. epidermidis* (WALTON; WYATT; CUNLIFFE, 1988), destacando assim, o potencial do extrato etanólico 70:30 (Figura 1B) como uma matéria prima promissora para o desenvolvimento de cosmeceúticos como por exemplo, sabonetes e hidratantes.

Já a cultura de *S. pyogenes* ao ser incubada com o extrato etanólico 70:30 apresentaram inibição de crescimento 1,5 vezes maior em comparação ao extrato 50:50. O controle, contendo cloranfenicol apresentou atividade inibitória 4,02 e 6,11 vezes maiores que a atividade obtida para os extratos 70:30 e 50:50, respectivamente. Na análise com *S. pyogenes*, os melhores resultados foram também observados para o extrato etanólico 70:30 nas maiores concentrações, 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto que para o extrato etanólico 50:50 houve formação do halo de inibição apenas na maior concentração (Figura 1C).

A ação dos extratos sobre a cepa Gram negativa, *P. aeruginosa*, também foi avaliada, sendo observada atividade antimicrobiana nas maiores concentrações (Figura 1D). Os melhores resultados foram obtidos com o extrato etanólico 70:30, que induziu inibição 1,88 vezes maior que o extrato 50:50.

Os extratos de casca de atemoia são ricos em compostos fenólicos. O mecanismo da atividade antibacteriana foi atribuído a estes devido sua capacidade de interferir com a membrana bacteriana, causando orifícios e subsequentes danos ao DNA (MARTINS et al., 2015).

Em relação à determinação da CMB para as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* foi de 25mg  $\text{mL}^{-1}$ . Os compostos fenólicos podem ter sido responsáveis por esta ação. Ao comparar com um estudo do ácido p-cumárico incorporado em uma emulsão cosmética óleo em água (O/A) as concentrações bactericidas mínimas em cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* foram 3,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 1,87 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 3,75 mg  $\text{mL}^{-1}$  e 3,75 mg  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (RAMOS, 2019). Desta forma, a incorporação de extrato de casca de atemoia sugere que poderá ser aplicado como agente antimicrobiano isolado ou em associação com outros antimicrobianos.

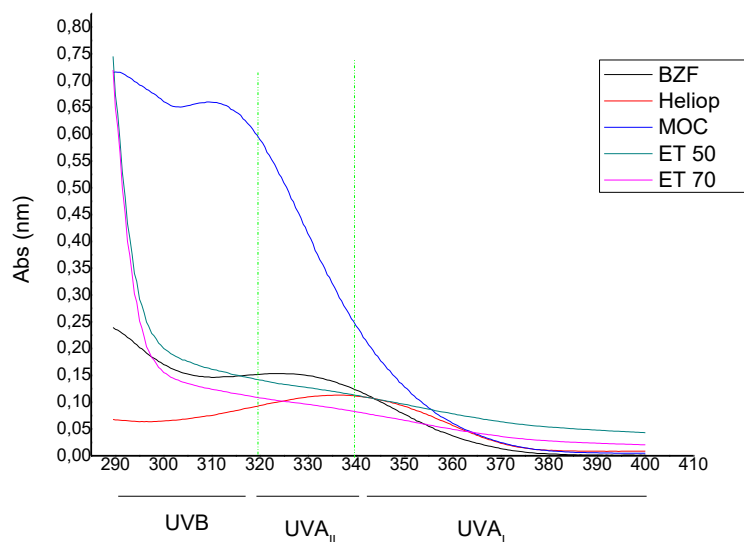


### 3.4 Determinação do FPS espectrofotométrico dos extratos da casca de atemoia

Atuando como cosmeceúticos, há um número crescente de estudos avaliando os efeitos de extratos de ervas incorporados em cremes e loções para uso tópico. Alguns compostos fenólicos, como epigalocatequina-3-galato (EGCG) do chá verde por exemplo, demonstraram proteger contra danos no DNA induzidos por UV, por sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo, permitindo que esse componente seja incorporado em formulações convencionais de filtro solar para aumentar a fotoproteção fornecida pelos filtros UV (MATSUI et al., 2009). Estes dados corroboram com os estudos dos extratos da casca de atemoia que é rico em catequina, epicatequina, rutina, ácido felúrico entre outros (MORAES, 2016; CRUZ, 2013).

Considerando a varredura do espectro de absorção no UV (entre 290 a 400 nm) dos extratos etanólicos da casca de atemoia nas proporções 50:50 e 70:30, respectivamente, nas concentrações de  $25\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $100\mu\text{g mL}^{-1}$ , a concentração responsável pela maior proteção (resultados não mostrados), foi reavaliada em comparação com os filtros químicos (Figura 2).

Figura 2: Espectro de absorção no UV dos filtros solares em comparação com os extratos da casca de atemoia



Os dados representam os perfis de varredura de Absorbância dos extratos etanólicos da casca de atemoia (ET 50, extrato etanólico 50:50; ET 70, extrato etanólico 70:30), na concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , entre 290 e 400 nm. Região que confere a proteção contra UVB, 320 a 340 contra UVAII e 340 a 400 contra UVAI. Filtros químicos utilizados como controles: Benzofenona (BZF), Metilantranilato (Heliop) e Metoxicinamato de Octila (MOC), diluídos em etanol absoluto na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados correspondem às médias de sextuplicatas de dados obtidos em cada proporção e os desvios padrão calculados, \*  $p < 0,05$ .

Os extratos etanólicos apresentaram proteção significativa nos comprimentos de onda 290-300, quando comparados aos filtros químicos UVB Metilantranilato e Benzofenona, embora em relação ao Metoxicinamato de octila a proteção tenha sido inferior (Figura 2).

Os dados obtidos para o extrato etanólico 50:50 foram coletados para os cálculos apresentados na Tabela 3, permitindo visualizar com clareza os efeitos de proteção solar. Estes resultados podem estar relacionados com a alta concentração de compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de atemoia (MORAES, 2016), logo, estes contribuiriam como componentes ativos de novos filtros solares naturais, como coadjuvantes em filtros comerciais ou aditivos em formulações cosméticas, tais como cremes corporais e maquiagens.

Tabela 3: FPS espectrofotométrico calculado de acordo com Mansur (1986)

Concentração	FPS espectrofotométrico			
	Benzofenona	Metilntranilato	Metoxinamato de Octila	Extrato 50:50(v/v)
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	21,1 $\pm$ 0,05	5,44 $\pm$ 0,01	29,09 $\pm$ 0,02	
10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	24,35 $\pm$ 0,02	7,44 $\pm$ 0,04	63,62 $\pm$ 0,02	
25 $\mu\text{g mL}^{-1}$				5,56 $\pm$ 0,01
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$				8,22 $\pm$ 0,02
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$				13,99 $\pm$ 0,04

Os resultados correspondem às médias de sextuplicatas de dados obtidos em cada concentração e os desvios padrão calculados,  $p < 0,05$ . Controles: Benzofenona, Metilntranilato e Metoxinamato de octila (diluídos em etanol absoluto na concentração de  $5\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Amostras: extrato etanólico da casca de atemoia obtido com proporções de solventes 50:50, etanol:água (v/v). A varredura foi realizada nos comprimentos de onda da Radiação UVB (290 a 320) segundo Mansur (1986), para cálculos de determinação do FPS espectrofotométrico.

Matsui e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato de chá verde contendo polifenóis como (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) apesar de apresentar um baixo FPS, protegeu contra danos ao DNA induzidos por UV e supressão imunológica, em parte por sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e inibir o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B).

Os compostos fenólicos majoritários da casca de atemoia são as catequinas e seus derivados (MORAES, 2016). Moléculas do polifenol epigallocatequina-3-galato (EGCG), foram descritas como inibidoras de eritema em humanos. Também foi demonstrado que os polifenóis do chá verde diminuem os danos ao DNA e o número de dímeros de ciclobutano pirimidina presentes na pele irradiada por UV (ELMETS et al., 2001; KATIYAR; PEREZ; MUKHTAR, 2000; KATIYAR et al., 2001). Desta forma, o uso de extratos de casca de atemoia em cosméticos com função fotoprotetora configura uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos produtos.

E por fim, de forma complementar, outro benefício dos fenólicos relacionado à fotoproteção seria sua atuação através de reações em série, da tirosina à melanina, logo, uma vez inibida, a tirosinase, pode reduzir as manchas na pele ao diminuir a síntese de melanina. O ácido cafeico, felúrico, elágico, p-cumárico mostraram atividade anti-tirosinase e contribui com os benefícios dos cosmeceúticos (TAOFIQ et al., 2016).

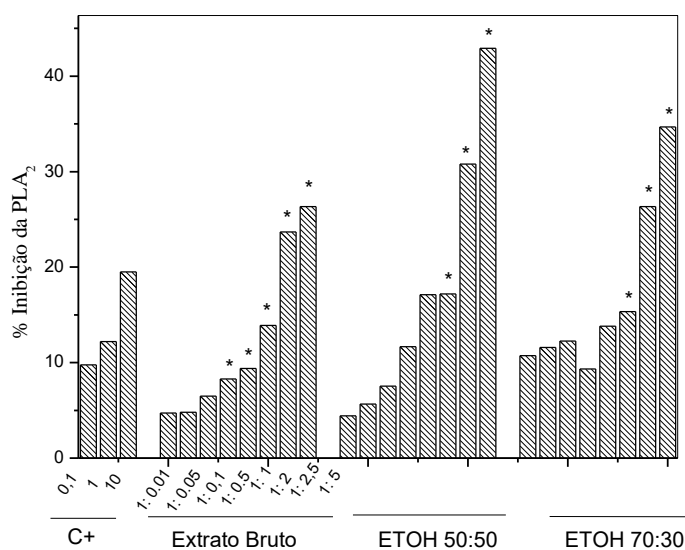
### 3.5 Atividade anti-inflamatória

#### 3.5.1 Atividade Fosfolipásica

Em um estudo realizado com fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) isolada da peçonha de *Crotalus durissus cumanensis*, compostos fenólicos exerceram atividade inibitória relevante, sendo observadas inibições de 63,15% para o ácido gálico, 16,93% para o ácido ferúlico, 41,14% para o ácido cafeico, 50,83% para o propilgalato e 91,32% para o galato de epigalocatequina (PEREANEZ et al., 2011). Estes dados apontam os benefícios esperados para a futura incorporação dos extratos da casca de atemoia (Figura 3) em formulações de aplicação tópica, considerando a ação anti-inflamatória desses extratos e consequente efeito de aceleração dos processos de regeneração de tecidos e cicatrização.

Em outro estudo, com extrato das folhas (clorofórmio: metanol, 2:1) da *Annona muricata* (graviola), foi relatado efeito inibidor sobre a atividade *in vitro* de fosfolipase A<sub>2</sub>, comparado ao controle (Prednisolona 0,4mg mL<sup>-1</sup>), sobre a prostaglandina sintase e ainda ação estabilizadora sobre a membrana de hemácias e de lisossomas (OYEKACHUKWU et al., 2017). Desta forma, os extratos da casca de atemoia poderiam ser coadjuvantes numa corticoterapia, ou substituintes agindo na prevenção e tratamentos de doenças inflamatórias (Figura 3).

Dados científicos também descrevem os efeitos protetores de extratos vegetais e de seus principais compostos polifenólicos sobre a inflamação e sobre o estresse oxidativo, em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (SILVA, 2016; VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008). Estes resultados apontam para os possíveis efeitos benéficos de extratos da casca da atemoia (Figura 3), na melhoria e/ou prevenção de doenças relacionadas à inflamação.

Figura 3: Inibição de PLA<sub>2</sub> por extratos da casca de atemoia

Amostras: peçonha de *Bothrops moojeni* ( $10\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) incubada com os extratos bruto, etanólico 50:50 e etanólico 70:30, em diferentes proporções (peçonha:extrato, m/m), por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . C+: Valerato de Betametasona em etanol nas concentrações de  $0,1\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $1\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e  $10\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  pré-incubadoas com peçonha ( $10\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ), por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . A determinação da inibição da enzima foi realizada através da área com o software livre ImageJ, e a média os dados obtidos para a peçonha pura foi considerada como 100% de atividade. Os resultados são apresentados como média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$  do Controle positivo.

O extrato ETOH 50:50 apresentou atividade inibitória similar a observada para o Valerato de Betametasona, uma vez que a proporção de 1:1 corresponde a  $10\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de extrato, equivalente a maior concentração avaliada para a droga. O extrato ETOH 70:30 exerceu inibições superiores a 40%, quando avaliado na proporção de 1:5, equivalente a concentração  $50\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  (Figura 3). A concentração de compostos fenólicos totais presente nas amostras (Tabela 1) sugere a participação destes compostos na inibição das PLA<sub>2</sub>.

As interações entre compostos fenólicos e proteínas pode ocorrer, por meio de interações de hidrogênio com determinados resíduos de aminoácidos que compõem sítios catalíticos, ligantes de cofator, ou outras regiões das estruturas proteicas, assim como são também descritos revestimentos hidrofóbicos, formados por fenólicos, ao

redor das proteínas (HAGERMAN; RICE; RITCHARD, 1998). De acordo com Ozdal, Capanoglu e Altay (2013), compostos fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio e com isso são capazes de formar ligações de hidrogênio com o grupo carboxila das proteínas, fazendo com que o sítio catalítico da enzima perca afinidade pelo substrato. De acordo com Ozdal, Capanoglu e Altay (2013), em ambientes com pH alcalino, os compostos fenólicos interagem com oxigênios presentes nas cadeias laterais dos peptídeos e se transformam em quininas, que se condensam e formam compostos de coloração marrom, com alto peso molecular.

Compostos fenólicos como flavonóides apresentam atividade inibidora de fosfolipase A<sub>2</sub> (DA SILVA et al., 2009; PEREAÑEZ et al., 2011), atuando por meio de interações transientes, tais como as de hidrogênio, corroborando os dados obtidos no presente trabalho (Figura 3).

### **3.5.2 Atividade anti-inflamatória complementar: Hemólise térmica**

Na hemólise ocorre a liberação de hemoglobina que pode ser determinada espectrofotometricamente por um pico em 540nm. Por isso, inicialmente foi realizada a varredura entre 200 e 700nm mostrando que a região de absorção dos controles e amostras é abaixo de 310nm, logo, não influenciariam nas leituras. Além disso, a solução salina, o agente solubilizante (DMSO), as amostras e os anti-inflamatórios não induziram hemólise (resultados não mostrados), desta forma, a desestabilização da membrana eritrocitária pode ser atribuída apenas ao efeito da temperatura.

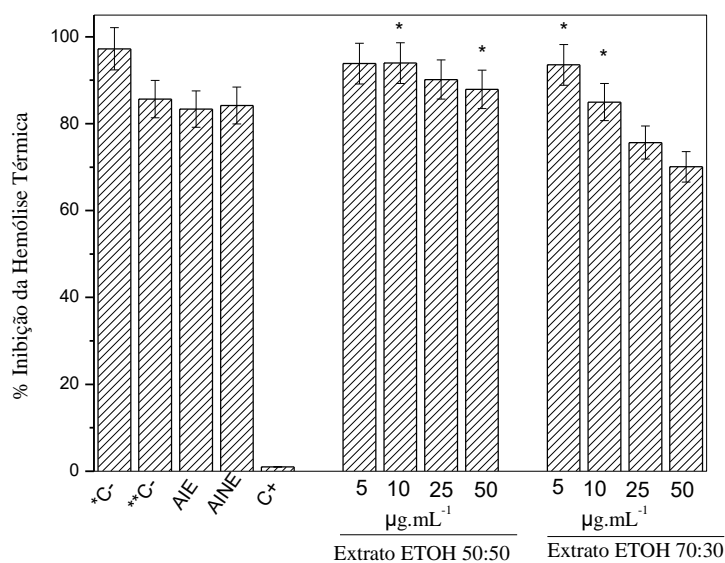
A tabela mostra que não houve diferença significativa na inibição da hemólise entre os anti-inflamatórios AIE e AINE. A inibição da hemólise foi inversamente proporcional às concentrações dos extratos. As menores concentrações do extrato etanólico 50:50 tiveram desempenho melhor que os anti-inflamatórios comerciais. Em relação ao extrato etanólico 70:30, apenas as concentrações 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram proteção semelhante aos controles (anti-inflamatórios comerciais), sendo também observado um resultado mais significativo para a menor concentração (Figura 4).

O extrato da casca de atemoia 50:50 e 70:30 atingiu respectivamente, 93,83% e 93,53% de inibição nas menores concentrações. Estes valores superam o trabalho anterior realizado com extrato de clorofórmio da folha de *Annona muricata* na

concentração de  $0,4\text{g mL}^{-1}$  cuja inibição da hemólise alcançou 53% (OYEKACHUKWU et al., 2017).

Em altas concentrações, os extratos podem conter moléculas que induzem a hemólise como saponinas que interagem com a membrana lipoproteica degradando-a (SOUSA, 2017) ou ainda taninos que desencadeiam a precipitação de proteínas ricas em prolina (galato de epigalocatequina e os dímeros de procianidina B2 e B2 3' *O*- galato) através de ligação não covalente (CANON et al., 2015). Moraes (2016) e Da Cruz et al (2013) quantificaram os compostos fenólicos livres na casca da atemoia liofilizada e identificaram como majoritários a epicatequina, catequina e rutina (730,9; 324,3 e  $65,1\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ). Na avaliação de extratos hidrolisados da casca da atemoia, foram detectados ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido felúrico, ácido p-cumarico e quercetina (MORAES, 2016). Outro estudo mostra em extrato hidroalcoólico 70% das folhas de *Annona mucosa* em uma concentração média (++) saponinas, flavonoides e terpenos (SOUSA, 2017). Estes dados corroboram os resultados do presente trabalho, no qual esses componentes não são majoritários e em baixas concentrações não causariam lise eritrocitária.

Figura 4: Avaliação de potencial anti-inflamatório por inibição de hemólise térmica



\*C-: PBS (Tampão fosfato isotônico, pH 7,4) incubado a 37°C, \*\*C-: PBS (Tampão fosfato isotônico, pH 7,4) incubado a 37°C e a 54°C; C+: Solução aquosa de hemácias a 2%, considerada hemólise 100%; AIE: Anti-inflamatório Esteroidal- Acetato de Hidrocortisona 50µg mL<sup>-1</sup>; AINE: Anti-inflamatório Não-Esteroidal – Ácido Acetil salicílico 50µg mL<sup>-1</sup>; Amostras: extrato etanólico de casca de atemoia 50:50 (extrato de atemoia: etanol, m/m) e 70:30 (extrato de atemoia: etanol, m/m) nas concentrações 5; 10; 25 e 50µg mL<sup>-1</sup>. Os anti-inflamatórios e amostras foram pré-incubados com a solução de eritrócitos a 37°C por 30 min e posteriormente incubados a 54°C por 20 min para induzir hemólise térmica. Após centrifugação, a 1200G por 10min, todos os incubados tiveram suas absorvâncias aferidas em espectrofotômetro à 540nm de acordo com NKEH-CHUNGAG et al. (2015). Os testes foram avaliados em solução de hematócrito a 2% (v/v). Os resultados representam médias de triplicatas. A média dos controles contendo apenas água foi considerada como 100% de hemólise. \*Difere estatisticamente do Controle \*\*C- p < 0,05.

O rompimento da membrana plasmática dos lisossomos libera componentes que participam da inflamação. Desta forma, a semelhança entre estas membranas plasmáticas com a membrana eritrocitária permite avaliar a ação dos extratos da casca de atemoia em estabilizar a estrutura destas membranas, prospectando seu potencial anti-inflamatório. Um estudo com extrato clorofórmico e metanólico (2:1) das folhas de *Annona muricata* (graviola) mostrou seu efeito sobre as atividades *in vitro* de fosfolipases A<sub>2</sub>, quando comparada ao controle (prednisolona 0,4 mg mL<sup>-1</sup>), sobre a prostaglandina sintase além de agir estabilizando a membrana de hemácias e, portanto, com possível ação sobre a membrana de lisossomos (OYEKACHUKWU et al., 2017).



Desta forma, os extratos da casca de atemoia poderiam ser coadjuvantes numa corticoterapia.

Um dos mecanismos anti-inflamatórios pode consistir na interação dos AINE, AIE ou ainda dos metabólitos secundários dos extratos da casca de atemoia com as estruturas de membranas, resultando em desvio compatível das cargas superficiais das células. Possivelmente, este fenômeno obstrui a interação física com agentes de agregação ou promove difração por expulsão mútua das cargas (FERRALI et al., 1992). Por outro lado, alguns pesquisadores sugerem que flavonoides (SANDHYA et al., 2010) são capazes de se ligar a cátions e outras biomoléculas estabilizando a membrana eritrocitária.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os compostos fenólicos e minerais presentes na casca de atemoia de forma representativa são fundamentais em diversas funções fisiológicas relacionadas à saúde da pele. O extratos de casca de atemoia avaliados mostraram-se promissoras fontes de matéria prima para incorporação em cosmecêuticos, com função fotoprotetora, antimicrobiana e anti-inflamatória. A obtenção de matéria-prima para diversas indústrias a partir de resíduos do ciclo de produção agrícola, permite diversificar a renda dos produtores e cooperativas, assim como, contribui com a sustentabilidade do meio ambiente. Em adição, este estudo aponta para perspectivas futuras sobre o entendimento dos mecanismos de ação de alguns compostos naturais, e o desenvolvimento de formas de aplicação tópica destas moléculas na manutenção da saúde da pele.

## REFERÊNCIAS

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics and toiletries**, v. 109, n. 11, p. 63-70, 1994.

CAMPOS, W. R. et al. MECHANOCHEMICAL SYNTHESIS OF SYMMETRIC ACYCLIC AZINES AND DETERMINATION OF THE UVB SOLAR PROTECTION FACTOR in vitro. **Química Nova**, v. 42, n. 3, p. 305-312, 2019.

CANON, F. et al. Binding site of different tannins on a human salivary proline-rich protein evidenced by dissociative photoionization tandem mass spectrometry. **Tetrahedron**, v. 71, n. 20, p. 3039-3044, 2015.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document MO7-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin<sup>16</sup> (4→ 8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2590-2595, 1998.

DA CRUZ, L. S. da et al. Caracterização física e química das frações do fruto atemoia Gefner. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2280-2284, 2013.

DA SILVA, S. L. et al. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 312-321, 2009.

ELMETS, C. et al. Prevention of cutaneous photodamage by polyphenols from green tea. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, p. 425-432, 2001.

FERRALI, M. et al. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. **Biochemical Journal**, v. 285, n. 1, p. 295-301, 1992

GUTIÉRREZ, J. et al. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, 26:411–413, 1988.

KATIYAR, S. K.; PEREZ, A.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 10, p. 3864-3869, 2000.

KATIYAR, S. K. et al. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 2, p. 287-294, 2001.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 10, p. 3954– 3962, 1999.

LYDIA, D. E. et al. Investigation on the Antimicrobial and Antioxidant Activity of Custard Apple (*Annona reticulata*) Peel Extracts. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 4, p. 241-247, 2017.

MALAVOLTA, E. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira.—2. ed., ver. e atual. Piracicaba: Potafos, 1997.

MANSUR, J. S. et al. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Anais brasileiros de dermatologia**, p. 167-72, 1986.

MARTINS, N. et al. In vivo anti-candida activity of phenolic extracts and compounds: Future perspectives focusing on effective clinical interventions. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

MATSUI, M. S. et al. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Elsevier, 2009. p. 56-59.

MICHAELSSON, G.; LJUNGHALL, K.; DANIELSON, B. G. Zinc in epidermis and dermis in healthy subjects. **Acta dermato-venereologica**. v. 60, n.4, p. 295-299, 1980.

MORAES, I. V. M. **Extração de compostos bioativos da folha da gravioleira (*Annona muricata L.*) e concentração dos extratos por ultra e nanofiltração**. 2016. 165p. Tese. (Doutorado em Tecnologia de alimentos) - Unicamp, Campinas, 2016. Disponível em <

[http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/321387/1/Moraes\\_IngridVieiraMachadode\\_D.pdf](http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/321387/1/Moraes_IngridVieiraMachadode_D.pdf) >

NKEH-CHUNGAG, B. N. et al. Anti-Inflammatory and Membrane-Stabilizing Properties of Two Semisynthetic Derivatives of Oleanolic Acid. **Inflammation**, Vol. 38, No. 1, February 2015.

NUNES, S.; MIYUKI; TAMURA, B. Revisão histórica das águas termais. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 3, 2012.

OYEKACHUKWU, A. R. et al. Anti-Inflammatory Effects of The Chloroform Extract of *Annona muricata* Leaves on Phospholipase A2 and Prostaglandin Synthase Activities. **Translational Biomedicine Journal**, v. 8, n. 4, p. 137, 2017.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954-970, 2013.

PEREANEZ, J. A. et al. Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A2. **Vitae**, v. 18, n. 3, p. 295-304, 2011.

RAMOS, W. S. **Estudo de segurança e eficácia in vitro do ácido p-Cumárico e sua incorporação em emulsão cosmética óleo em água (O/A)**. 2019. 92p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo. DISPONÍVEL EM [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181706/ramos\\_ws\\_me\\_arafcf\\_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181706/ramos_ws_me_arafcf_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

RUSSO, A. et al. Tendências atuais e futuras da antibioticoterapia de infecções bacterianas agudas da pele e da estrutura da pele. **Microbiologia Clínica e Infecção**, v. 22, p. S27-S36, 2016.

SANDHYA, S. et al. Membrane stabilizing potency of two Tephrosia species. **Journal of Phytology**, 2010.

SAUCEDO, G. M.; VALLEJO, R. S.; GIMÉNEZ, J. C. M. Efectos de la radiación solar y actualización en fotoprotección. In: **Anales de Pediatría**. Elsevier Doyma, 2020.

SILVA, H. D. N. **Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto das folhas de atemoia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)** EM ROEDORES. 2016. 122p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, p.122, 2016.

SOUSA, M. H. O. **Prospecção fitoquímica, identificação e avaliação da atividade microbiológica de metabólitos secundários de *Annona mucosa* Jacq.** 2017. 85p. Monografia – Química. Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2017.

SOUYOUL, S. A.; SAUSSY, K. P.; LUPO, M. P. Nutraceuticals: a review. **Dermatology and therapy**, v. 8, n. 1, p. 5-16, 2018.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TAOFIQ, O. et al. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 38-48, 2016.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VOLLMER, D.; WEST, V.; LEPHART, E. Enhancing Skin Health: By Oral Administration of Natural Compounds and Minerals with Implications to the Dermal Microbiome. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3059, 2018.

WALTON, S.; WYATT, E. H.; CUNLIFFE, W. J. Genetic control of sebum excretion and acne - a twin study. **British Journal of Dermatology**, v. 118, n. 3, p. 393-396, 1988.

**ARTIGO 2****COSMECÊUTICO A BASE DE EXTRATO DE CASCA DE ATEMOIA: AÇÃO FOTOPROTETORA E ANTIMICROBIANA**

Tatiane Silva de Abreu<sup>1</sup>; Pedro Henrique Souza César<sup>1</sup>, Michelle Carlota Gonçalves<sup>2</sup>; Roberta Hilsdorf Piccoli<sup>2</sup>; Silvana Marcussi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica – Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras – Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras – Brasil

[tatianeabreu@yahoo.com.br](mailto:tatianeabreu@yahoo.com.br);

[pedrocesar.biologia@gmail.com](mailto:pedrocesar.biologia@gmail.com);

[michellemicroagricola@gmail.com](mailto:michellemicroagricola@gmail.com); [rrhpiccoli@dca.ufla.br](mailto:rrhpiccoli@dca.ufla.br); [marcussi@dqi.ufla.br](mailto:marcussi@dqi.ufla.br)\*.

Artigo formato de acordo com a revista *International Journal of Cosmetic Science*

## RESUMO

Formulações cosméticas com ação terapêutica tem sido foco de pesquisas que visam principalmente determinar novas aplicações e agregar valor aos produtos naturais. Nesse contexto, matérias primas vegetais se destacam pela rica composição em metabólitos secundários, muitos deles com ações terapêuticas, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. Nesse contexto, destaca-se o aproveitamento de frutos, considerados impróprios para comercialização, por não atenderem os padrões de aparência que definem a compra e consumo *in natura*. Desta forma, foi desenvolvido o presente trabalho, emulsões cosmeceúticas incorporadas com extrato de casca de atemoia, contendo alto teor de compostos fenólicos e seus derivados, com ação fotoprotetora, antioxidante e bactericida. Resultados: As emulsões preparadas com 2%, 5% e 10% de extrato demonstraram-se dentro dos padrões sugeridos nos parâmetros de estabilidade preliminar da formulação cosmética. Todos os extratos e a emulsão contendo casca de atemoia a 10% apresentaram FPS maior que 6, e atividade antibacteriana sobre *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a emulsão considerada adequada como um novo produto cosmeceútico. Por fim, atenderam aos padrões físicos e sensoriais ideais apresentando boa textura, brilho, baixa aderência (pegajosidade), adequada percepção residual, fácil espalhabilidade e sensação de refrescância equilibrada. Considerações Finais: A demanda dos consumidores por cosmeceúticos com efeitos principalmente na prevenção de envelhecimento precoce, cânceres causados pela ação de radicais livres e doenças inflamatórias, justifica a pesquisa e o desenvolvimento de produtos multifuncionais, tais como o apresentado neste trabalho.

## 1 INTRODUÇÃO

A fitocosmética têm trazido benefícios para a manutenção da saúde da pele de seres humanos e animais. O uso de matérias-primas naturais, aliado à preocupação com os cuidados com a saúde da pele, tem motivado a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações cosméticas que apresentem segurança, eficácia e estabilidade confiável (SURINI; MUBARAK; RAMADON, 2018). Estes parâmetros podem estar agregados à reutilização de resíduos de frutos. Para tanto, a estabilidade físico-química e microbiológica de uma emulsão são pré-requisitos para sua produção (KUMAR et al., 2016). Somado a isto, atividades subterapêuticas classificam o produto como um cosmeceutico (RIVERS et al., 2008).

Neste contexto, a atemoia, um híbrido da *Annona squamosa L* e *Annona cherimola Mill* pertencente à família das anonáceas tem uma produção relevante no Brasil representando 54% do mercado das anonáceas (IBGE, 2017). Entre as porções da atemoia a casca do fruto representa quase 30% do peso do fruto e concentra a maior quantidade de compostos fenólicos, potássio e ferro que o resto do fruto porém, é a porção menos estudada (CRUZ et al., 2013; MORAES, 2016). Apesar da inexistência de registros estatísticos do volume de perda desde a colheita até a comercialização dos frutos de atemoia (IBGE, 2017), a pouca homogeneidade nas características morfológicas dos frutos e o fato de serem altamente perecíveis, sugerem grandes perdas em relação a produção total.

Além da possibilidade de uso da polpa congelada, na forma de iogurtes, sorvetes ou doces, a casca dos frutos que seria rejeitada na comercialização pode ser alvo da diversificação da renda de pequenos produtores e produtores da agricultura familiar.

Pensando nisso, objetivamos neste trabalho desenvolver formulações simples, estáveis em parâmetros físico-químicos e microbiológicos, contendo extratos etanólicos obtidos de cascas de atemoia, com o adjuvante de baixa toxicidade atribuída ao solvente utilizado e ausência de parabenos. Em adição, as propriedades antimicrobianas e fotoprotetoras das emulsões e seu potencial de absorção, foram investigados.



Com isso, a padronização para o desenvolvimento de processos úteis a um nicho importante da sociedade, o aproveitamento de resíduos, preservando o ambiente e seus recursos somados à valorização de resíduos da produção de alimentos, fazem parte das metas associadas ao desenvolvimento do cosmeceútico proposto.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material e obtenção do extrato**

O lote de 20 kg frutos de Atemoia, destinado ao descarte, foi coletado no município de Turvolândia, MG (Latitude: 21° 52' 32" S e Longitude: 45° 47' 13" W) em 18 de junho de 2018. O material botânico foi identificado no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, local onde se encontra depositada uma exsicata da Atemoia Thompson sob registro ESAL 30248.

Os frutos foram higienizados com água corrente e tríplice lavagem com etanol 70%, despolidos e as cascas foram secas a temperatura de 50°C/60h para atingir 25% de umidade. O material seco foi triturado em moinho TE-631, Tecnal, e o pó obtido foi congelado a -18°C e liofilizado e armazenado protegido da luz. O extrato continha a concentração de 50:50 (etanol: água, v/v)

A extração alcóolica foi realizada de acordo com o método descrito por Kähkönen et al. (1999), com adaptações sugeridas por Moraes (2016). Para cada 1g do material liofilizado foram adicionados 10 mL de solvente (solução etanol:água v/v). Em seguida, as soluções foram sonicadas em ultrassom por 30 min, maceradas *overnight* e centrifugadas a 1500 x G por 15 min. O sobrenadante foi coletado, e o precipitado extraído mais duas vezes com 5 mL de solvente nas mesmas condições descritas. Os sobrenadantes coletados foram filtrados em papel tipo Watman nº1, levados ao rota evaporador para eliminar o etanol, congelados e posteriormente liofilizados.

## 2.2. Formulação de Emulsão não-iônica

A formulação cosmética utilizada para a incorporação dos extratos de atemoia foi uma emulsão não-iônica. Esta é compatível com eletrólitos minerais e ácidos fenólicos presentes nos extratos, apresenta baixa irritabilidade cutânea, baixa toxicidade, mostra-se isenta de parabenos, simples e de baixo custo (Tabela 1).

Tabela 1: Composição p/p (%) da Emulsão não-iônica de baixo custo e livre de parabenos

Componentes (INCI)	Fase	Quantidade p/ 100g
Lanete N	1	11g
Miristado de Isopropila	1	3mL
Polawax cera	1	3g
Vaselina líquida	1	2mL
Metabissulfito de sódio	2	0,3g
Propilenoglicol	2	10mL
Água destilada	2	Qsp 100mL
Imidazolidinil de ureia	3	0,1g
pH		6,0

INCI: Nomenclatura Internacional de Ingredientes de Cosméticos

As fases 1 e 2 foram aquecidas separadamente a 75 – 80°C. Posteriormente a fase 2 foi vertida sobre a fase 1 e a mistura foi agitada vigorosamente com um Mixer por 8 a 10 minutos, até a formação da emulsão. O conservante imidazolidinil de ureia, previamente solubilizado em água, foi adicionado à emulsão após essa alcançar a temperatura ambiente pela diminuição da velocidade de agitação.

### 2.3 Parâmetros de estabilidade preliminar da emulsão

Os ensaios para avaliação da estabilidade da emulsão foram aplicados nos estágios iniciais do desenvolvimento da formulação semissólida, segundo parâmetros estabelecidos pela ANVISA (2012) e pela Farmacopeia Brasileira (2019) e USP (United States Pharmacopeia, 2018).

#### Os parâmetros avaliados foram:

- 1) **Organolépticos: Aspecto** - Análise de separação de fases, precipitação e aglomeração de partículas (amostras classificadas em normal, levemente separada, separada, precipitada ou turva);
- 2) **Cor** - Análise da cor pela comparação de um controle sem extrato com as formulações contendo o extrato nas concentrações de 2%, 5% e 10% (m/m); Compara-se a cor com a do padrão estabelecido em um frasco de mesma especificação contra uma fonte de luz de cor branca em fundo branco.
- 3) **Odor** - Análise comparativa entre o controle e as formulações contendo o extrato nas concentrações 2%, 5% e 10% (m/m), ensaiado com 30 pessoas. Comparou-se o odor da amostra com o odor do padrão estabelecido através do olfato.

**Físico-químicos:** As amostras padrão foram mantidas na geladeira (4°C), temperatura ambiente (25°C), ou estufa (40°C), ao abrigo da luz. O pH foi determinado a partir de uma solução aquosa a 10% (p/p) armazenada por 2h e a densidade pelo método proposto pela Farmacopeia Brasileira (2019). Os resultados correspondem à média de três determinações.

**Estresse Mecânico:** Para verificar a resistência à separação das fases oleosa e aquosa da emulsão, amostras de 1g foram colocadas em microtubos e submetidas ao ciclo de 1000 x G por 30 minutos à temperatura ambiente (ANVISA, 2012).

**Estresse térmico:** As amostras nas concentrações de 2%, 5% e 10% foram submetidas à ciclos de aquecimento e resfriamento. Durante 12 dias, foram realizados 6 ciclos de 24 horas a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  (em estufa), e 24 horas a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  (em refrigerador), com umidade entre 60 e 75% (ANVISA, 2012). No final de cada ciclo diário, os parâmetros

organolépticos de cor, odor, textura, separação de fases, consistência, pH (solução aquosa a 10% em 2h de repouso), foram analisados.

### **Controle de qualidade microbiológico:**

Foram avaliadas a qualidade microbiológica das emulsões contendo 2%, 5% e 10% (m/m) de extrato de atemoia.

A presença de bactérias foi avaliada dispensando alíquotas das emulsões sobre ágar tripton de soja (TSA) contidos em placas de Petri, até atingirem cerca de 3mm de diâmetro. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48h. Já a presença de fungos e leveduras foi verificada empregando-se ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol. Após transferência das alíquotas das amostras de emulsões para as placas essas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicada para cada concentração.

### **2.4 Avaliação da permeação transmembrana *in vitro***

A avaliação foi feita em dispositivo semelhante a célula de Franz. O dispositivo consistiu em dois compartimentos, um doador, onde a emulsão foi adicionada, e um receptor, onde 40 mL de solução receptora (PBS - solução salina tamponada em fosfato) foi adicionada. Os dois compartimentos foram separados por membrana seletiva com poro de 0,45 nm, semelhante à porosidade da pele humana. O tempo de duração de migração foi de 6 horas.

A migração de componentes para a solução receptora, foi avaliada periodicamente ao longo do tempo através da espectrofotometria no comprimento de onda de 280nm. Os valores de absorbância obtidos em cada intervalo, foram utilizados para o cálculo da concentração das substâncias que migraram. Os cálculos foram realizados utilizando-se curva de calibração onde o composto padrão apresentou o maior pico de absorção dos compostos fenólicos (THAKKER; CHERN, 2003). As análises foram realizadas em três experimentos independentes, para aumentar a confiabilidade dos resultados apresentados. A partir da varredura da amostra, foi

determinado o maior pico de absorção em 280nm baseado nos parâmetros de leitura dos compostos fenólicos.

## 2.5 Fator de Proteção Solar Espectrofotométrico da emulsão

O FPS (Fator de Proteção Solar) *in vitro* das emulsões contendo extrato etanólico de casca de atemoia nas concentrações de 2%, 5% e 10% (m/m) foi determinado pelo método de Mansur (MANSUR et al., 1986). As emulsões foram submetidas a uma diluição de modo a obter uma concentração final de 0,2  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  em etanol P.A. Posteriormente foi determinada a absorbância das soluções frente ao solvente.

Para determinação do comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e da absorbância máxima ( $\text{Abs}_{\text{max}}$ ), as soluções preparadas com as emulsões foram submetidas a uma varredura entre os comprimentos de onda de 290 e 400 nm, que possibilita verificar a absorção nas regiões ultravioleta A e B (UVA e UVB). O álcool etílico absoluto foi utilizado como branco. A benzofenona, metilantranilato e metoxicinamato de octila, possuem absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  288 e 328; 336; 311 nm, respectivamente, foram preparados em etanol absoluto na concentração de 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e utilizados como padrões (BOBIN; RAYMOND; MARTINI, 1994). As absorbâncias obtidas foram aplicadas na equação determinada e descrita por Mansur e colaboradores (1986), para as conversões aos respectivos valores de FPS-UVB. As análises foram realizadas em triplicata, e reproduzidas em dois ensaios independentes.

## 2.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das emulsões de atemoia foi avaliada empregando-se a técnica de disco-difusão (CLSI, 2015) com modificações.

Foram utilizados os microrganismos *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Escherichia coli* enteropatogênica (ATCC 35401), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 8593) e *Candida albicans* (INCQS 40120). As culturas estoque, armazenadas em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona

bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL), foram ativadas em caldo triptona de soja (TSB) e incubação a 37°C por 24 horas. Após cultivo, as culturas foram padronizadas em  $1,5 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, utilizando a escala McFarland, alíquotas de 200µL das suspensões das bactérias e levedura, previamente padronizadas, foram inoculadas e espalhadas sobre TSA. Em seguida, aproximadamente 0,2g de cada emulsão (2%, 5% e 10%) foram adicionados sobre o meio e incubados a 37°C por 24h para bactérias e 24°C por 3 dias para levedura. Após a incubação os halos de inibição formados foram mensurados com auxílio de paquímetro digital. Foram utilizados os controles com disco de papel adicionados de 10µL de Cloranfenicol 0,1% (m/v), Ampicilina 0,1% (m/v) para as bactérias e Nistatina 0,1% (m/v) para a levedura.

## **2.7 Análise Sensorial e Intenção de compra**

A análise sensorial das emulsões, foi realizada empregando-se uma escala hedônica de 1 a 10 que avalia parâmetros de aceitabilidade do consumidor pelo produto e sua intenção de compra, conforme metodologia descrita por CHORILLI e colaboradores (2009). Foi realizada com 50 provadores entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos. Tratavam-se de servidores ou universitários da UFLA recrutados dentro do campus. Dentre os critérios de escolha a pele destes não poderiam apresentar infecções, inflamações ou alergias na pele, estivesse sem outro cosmético na região do dorso e não apresentassem alergia às matérias-primas da formulação. As amostras das emulsões foram aplicadas no dorso da mão e em seguida, preencheram a ficha padrão de avaliação (CHORILLI et al., 2009). As análises foram realizadas após aprovação dos protocolos de pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos - COEP (CAAE 13100719.0.0000.5148).

## **2.8 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão, e médias de repetições de ensaio independentes, quando necessários. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância, e as médias comparadas usando o teste Scott Knott ( $p < 0,05$ ) com auxílio do programa estatístico (R Core Team, 2012).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Parâmetros de estabilidade preliminar da emulsão

Há vários estudos de compostos fenólicos incorporados em cosmeceuticos, como por exemplo, extratos de café com atividade antioxidante (XUAN et al., 2019). Compostos fenólicos, tais como os *p*-hidroxibenzóicos, ácido cármico, protocatecúico e ácido cinâmico foram avaliados quanto às suas atividades anti-inflamatórias e antimicrobiana (TAOFIQ et al., 2019). Extratos de alcaçuz, mostraram-se antioxidante, quelante e anti-inflamatório devido à presença de flavonoides (CIGANOVIĆ et al., 2019). Também foi documentado o potencial anti-inflamatório e antibacteriano dos derivados de ácidos hidroxinâmicos (TAOFIQ et al., 2017). Este conjunto de atividades biológicas relacionados à pele torna as emulsões, ricas em compostos fenólicos, promissoras formulações cosmeceuticas multifuncionais.

Pesquisas mostraram que no contexto “anti *aging*” o ácido ferúlico apresentou atividade fotoprotetora ao eritema cutâneo induzido por UVB (SAIJA et al., 2000). Quando aplicado topicamente entre 0,01 e 0,05mg/local/rato suprimiu significativamente a expressão de MMP-2 e MMP-9. Já o ácido *p*-cumárico a 30 µg mL<sup>-1</sup> inibiu a expressão a partir de fibroblastos dérmicos (SEOK; BOO, 2015), enquanto que, o ácido clorogênico a 500mM após 48h de exposição às células de melanoma B16, suprimiu os níveis de melanina (LI et al., 2014). Em relação à função anti-inflamatória, há relatos do ácido clorogênico a 20µM reduzindo a expressão de COX-2 (CHEN; WU, 2014) enquanto o ácido ferúlico aplicado topicamente reduziu a expressão de IL-6 (Interleucina-6) (AMBOTHI; PRASAD; BALUPILLAI, 2015).

Para o desempenho de suas propriedades biológicas a maioria dos compostos fenólicos possuem concentrações terapêuticas elevadas. Quando esses compostos são incorporados a um creme cosmético básico (1% a 5% de extrato), o uso diário possibilita a absorção e funcionalização de altas doses, havendo contudo, a necessidade de realização de estudos clínicos *in vivo* e *in vitro*, a fim de estabelecer o potencial cosmeceutico das formulações (TAOFIQ et al., 2017).

As emulsões tiveram apresentaram-se de acordo com os padrões exigidos na estabilidade preliminar (Tabela 2). A intensidade da cor e acidez foram proporcionais à concentração do extrato e mantiveram-se estáveis mesmo sob estresse mecânico.

Tabela 2: Avaliação dos parâmetros organoléticos e físicos das Emulsões, submetidas aos testes de estabilidade preliminar

Parâmetros	Emulsão			
	Controle	Extrato etanólico de casca de atemoia		
		2%	5%	10%
Aspectos	N	N	N	N
Cor	Branco	Bege Claro	Bege Médio	Bege Escuro
Odor	N	N	N	N
pH	6 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,7 ± 0,2
Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	1,2	1,2	1,2	1,1
Estresse mecânico	Estável	Estável	Estável	Estável

N= Normal. Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção.

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros organoléticos e físicos da Emulsão, contendo 2% de extrato etanólico de casca de atemoia, submetida ao estresse térmico

Parâmetros	Ciclos de resfriamento-aquecimento														
	0	1		2		3		4		5		6			
	Armazenamento (Temperatura °C)														
	25	4	40	4	40	4	40	4	40	4	40	4	40		
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM	LM
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Textura	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Consistência	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

N= Normal, LM= Levemente modificado. Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção.



As amostras apresentaram alteração na cor a partir do 5º ciclo de resfriamento-aquecimento, e alteração da consistência a partir do 3º ciclo (Tabela 3). Este padrão manteve-se para as emulsões contendo 5% e 10% de extrato etanólico de casca de atemoia (dados não mostrados).

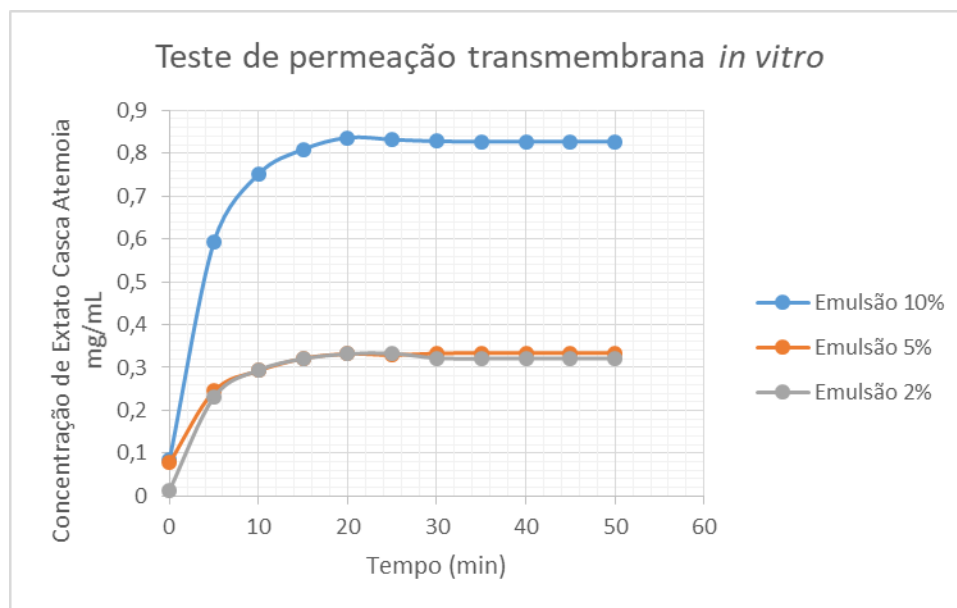
De acordo com a USP (2018), o recomendado são valores inferiores a  $10^2$  UFC/g da formulação, para microrganismos mesófilos, bolores, leveduras além da pesquisa de crescimento ou não das bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*. A emulsão contendo o extrato nas concentrações de 2%, 5% e 10% apresentaram estabilidade microbiológica tanto para bactérias quanto para leveduras.

### **3.2 Avaliação da permeação transmembrana *in vitro***

A figura 1 mostra a simulação da taxa de migração de compostos pela pele oriundos das emulsões contendo diferentes concentrações de extrato etanólico de casca de atemoia.

Os dados foram calculados de acordo com uma curva de calibração utilizando os princípios ativos do extrato etanólico de casca de atemoia

Figura 1: Efeito da concentração do extrato etanólico de casca de atemoia, no teste de absorção em membrana realizado com as emulsões.



Não houve diferença significativa na permeação através da membrana, quando comparadas as emulsões contendo 2% e 5% de extrato. Entretanto, a permeação foi significativamente maior para a emulsão contendo 10% de extrato, possivelmente devido à redução na barreira física atribuída aos constituintes da emulsão e à maior quantidade de metabólitos vegetais passíveis de penetração.

Em produtos dermatológicos, o sítio de ação está localizado na própria epiderme, por isso a determinação da quantidade de fármaco capaz de chegar à circulação não tem influência direta no efeito terapêutico exceto para fins de análise de efeitos colaterais devido a absorção sanguínea. Acredita-se que a permeação cutânea observada *in vitro* reflita os aspectos determinantes do processo *in vivo*, na maioria dos casos, tem aplicação preliminar na determinação da disponibilidade relativa de produtos dermatológicos nas camadas da pele (DIEMBECK et al., 1999).

Ácidos fenólicos do própolis (ácidos vanílico, cumárico, cafeico e ferúlico) e da vanilina são capazes de penetrar na epiderme e derme da pele. A taxa de penetração e distribuição é afetada tanto pelas características físico-químicas das substâncias ativas quanto pela estrutura física e pela composição química do veículo semi-sólido (ŽILIUS;

RAMANAUSKIENĖ; BRIEDIS, 2013). Estudos também relataram a aplicação de um sérum cosmético contendo extrato de semente de uva rico em compostos fenólicos (SURINI; MUBARAK; RAMADON, 2018).

### 3.3 FSP Espectrofotométrico da emulsão

Um produto é considerado adequado para ser utilizado em cosméticos fotoprotetores quando expressa um FPS igual ou maior que 6,0 (ANVISA, 2012). Todos os extratos apresentaram resultados satisfatórios, entretanto, ao incorporar na emulsão, apenas na concentração de 10% este parâmetro mínimo foi atingido (Tabela 4). Desta forma, com o ajuste da concentração considerando também às características antimicrobiana e anti-inflamatória da emulsão, esta poderá configurar um cosmecêutico promissor.

Tabela 4: FPS espectrofotométrico, do extrato e da emulsão contendo extrato de casca de atemoia em diferentes concentrações, de acordo com cálculos de Mansur

Concentração	FPS espectrofotométrico				
	Benzofenona	Metilntranilato	Metoxinamato de Octila	Extrato 50:50(v/v)	Emulsão
5 $\mu\text{g L}^{-1}$	21,1 $\pm$ 0,05	5,44 $\pm$ 0,01	29,09 $\pm$ 0,02		
10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	24,35 $\pm$ 0,02	7,44 $\pm$ 0,04	63,62 $\pm$ 0,02		
25 $\mu\text{g mL}^{-1}$				5,56 $\pm$ 0,01	
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$				8,22 $\pm$ 0,02	
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$				13,99 $\pm$ 0,04	
2%					3,35 $\pm$ 0,03
5%					5,32 $\pm$ 0,02
10%					8,24 $\pm$ 0,02

Controles: Filtros solares químicos (Benzofenona, Metilntranilato e Metoxinamato de octila). Amostras: extrato etanólico da casca de atemoia sozinho (50:50 v/v, etanol:água) e emulsões contendo diferentes concentrações do extrato. Os controles foram diluídos em etanol absoluto na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As emulsões foram diluídas em etanol absoluto 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$  e

encaminhadas para uma varredura nos comprimentos de onda da Radiação UVB (290 a 320nm), segundo Mansur, para os cálculos de determinação do FPS espectrofotométrico. Os resultados correspondem às médias de sextuplicatas de dados obtidos em cada proporção e os desvios padrão calculados, \*  $p < 0,05$ .

Estudos científicos mostram que os compostos fenólicos possuem um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano ligado ao anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (MUNHOZ et al, 2012). Flavonoides dispersos em etanol apresentam picos de absorção sobreposto ao da radiação UV sugerindo potencial atividade fotoprotetora (BOBIN; RAYMOND; MARTINI, 1994). Estes dados corroboram com os resultados do presente trabalho.

Os compostos fenólicos majoritários da casca de atemoia são as catequinas e seus derivados (MORAES, 2016). A aplicação tópica de EGCG (Epigallocatequina-3-galato) em murinos apresentou efeito preventivo contra a fotocarcinogênese e a fototoxicidade induzidas por radiação (KATIYAR et al., 2001). Já outros estudos, mostraram que a EGCG administrada de forma tópica, protegeu contra a depleção de enzimas antioxidantes induzida por UVB (AGARWA et al., 1993).

Artigos de revisão mostram que a EGCG apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas; e ainda reduz o eritema/ edema induzido por radiação UV. Os mecanismos descritos relatam a inibição da peroxidação lipídica, limitação do dano ao DNA induzido por radiação UV e redução da produção de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio). Além disso, possui ação na supressão de indutores pró-inflamatórios (COX-2 e MMPs) (SOUYOUL; SAUSSY; LUPO, 2018).

Matsui e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato de chá verde contendo polifenóis como (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), apesar de apresentar um baixo FPS, demonstrou características secundárias importantes. Houve proteção contra danos ao DNA induzidos por UV e supressão imunológica. Estes mecanismos ocorrem em parte por sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e inibir o NF- $\kappa$ B (fator nuclear *kappa* B) (MATSUI et al., 2009). Analisando por esta perspectiva, a emulsão desenvolvida apesar de possuir baixo FPS, vem de forma complementar,

acompanhada por propriedades importantes em um cosmecêutico como anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana.

Algumas pesquisas demonstraram que os polifenóis do chá verde, aplicado topicamente, diminuem os danos ao DNA e o número de dímeros de ciclobutano pirimidina presentes na pele irradiada por UV. Esses dímeros são importantes para iniciar mutagênese e carcinogênese induzidas por UV (ELMETS et al., 2001; KATIYAR; PEREZ; MUKHTAR, 2000; KATIYAR et al., 2001, SOUYOUL; SAUSSY; LUPO, 2018).

Quando concentrações graduadas de polifenóis do chá verde, possuindo como polifenol majoritário a EGCG, são aplicadas à pele humana *in vivo* antes da exposição de uma dose mínima dupla de eritema de radiação solar simulada, há uma redução dependente da dose no eritema (ELMETS et al., 2001). Histologicamente, foi observada uma redução na hiperproliferação de queratinócitos induzida por ultravioleta (UV), manifestada como uma diminuição notável da formação de células queimadas pelo sol e diminuição no infiltrado inflamatório de células (KATIYAR et al., 2001). Neste contexto, os extratos de casca de atemoia apresentam um potencial promissor para o desenvolvimento de cosméticos com função fotoprotetora.

### **3.4 Atividade antimicrobiana**

A tabela 5 mostra os halos de inibição formados pela ação das diferentes emulsões contendo extrato de atemoia sobre *B. cereus* e *P. aeruginosa*. Não houve formação de halo nos testes realizados com *E. coli* enteropatogênica e *S. aureus*.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana das emulsões cosméticas contendo extrato de casca de atemoia

Amostra		Diâmetro do halo (mm)	
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
*Emulsão	2%	4,54 ± 0,68	4,53 ± 0,57
	5%	4,97 ± 1,2	5,59 ± 0,62
	10%	6,96 ± 1,05	7,39 ± 0,62

\*Acrescida com extrato etanólico de casca de atemoia (50:50 v/v, etanol:água) em diferentes porcentagens.

As emulsões a 2%, 5% e 10% não inibiram o crescimento de *Escherichia coli* enterogênica, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, nas condições avaliadas. A Tabela 5, apresenta os halos de inibição do crescimento para *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O extrato etanólico de casca de atemoia 50:50 (etanol:água, v/v) foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* em concentrações entre 75 e 200mg mL<sup>-1</sup> (ABREU, 2020). A concentração de extrato nas emulsões pode não ter sido suficiente para exercer ação bactericida sobre as demais cepas avaliadas. Estudos complementares poderão contribuir com a determinação de doses que possibilitem a observação de todas as atividades benéficas atribuídas ao extrato.

Pesquisas por novos antimicrobianos podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos produtos eficazes e menos tóxicos (OSTROSKY et al., 2008).

Os dados apresentados na tabela 5 indicam que o potencial de inibição exercido pelos extratos da casca de atemoia foi proporcional à concentração da emulsão, corroborando dados da literatura. Moraes (2016) descreveu em seus estudos, que o extrato etanólico da casca de atemoia apresenta atividade antimicrobiana sobre *E.coli*, *B. cereus* e *S. aureus* e relacionou a atividade ao alto teor de fenólicos presentes na casca deste fruto. Contudo, Moraes (2016) relata a ausência de inibição do crescimento

de *P. aeruginosa* nas condições em que o extrato foi avaliado (1 a 8mg mL<sup>-1</sup> etanol:metanol, 50:50), e presença de inibição na avaliação das emulsões incorporadas com o extrato. Moraes (2016) também observou efeito inibidor do extrato, na maior concentração avaliada, sobre a linhagem de *S. aureus*.

É importante ressaltar que os extratos etanólicos da casca de atemoia apresentaram concentração mínima inibitória – CMB de 25 mg mL<sup>-1</sup> para *S. aureus* e *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, desta forma, ajustes de concentração deverão ser avaliados para obtenção de maior efetividade no uso da emulsão, embora a utilização tópica corriqueira da emulsão já corresponde um fator de aumento natural da concentração de fenólicos usada (ABREU, 2020).

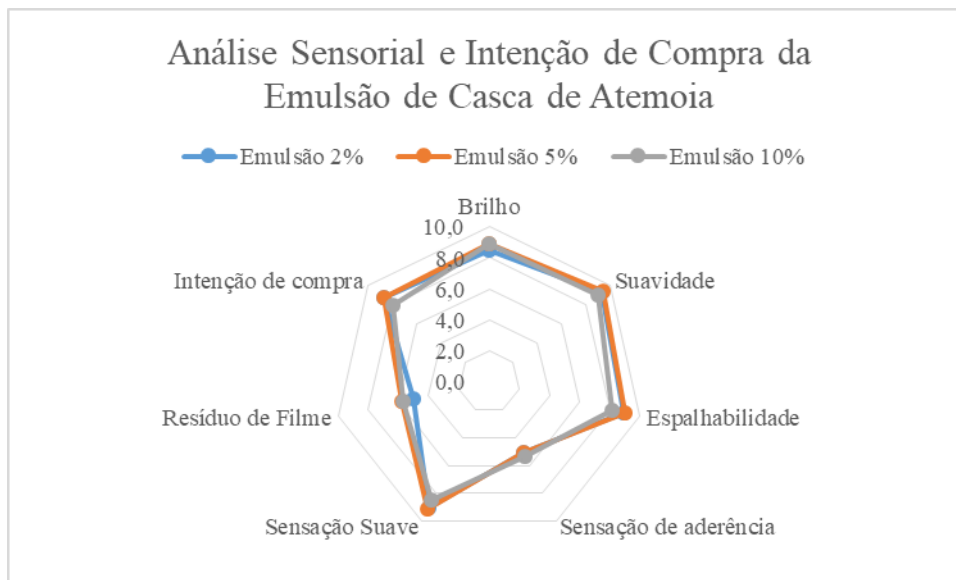
Pesquisas tem relacionado a ação bactericida exercida pelos metabólitos secundários, à ruptura da membrana celular, para os microorganismos gram positivos e da parede celular para os gram negativos. Interações entre flavonoides e peptideoglicanos da parede celular de bactérias já foram descritas (AHMAD; BEG, 2001).

A casca de atemoia possui altas concentrações de catequina e epicatequina que podem justificar a ação antimicrobiana ao agirem como inibidores eficientes da enzima diidrofolato redutase (DHFR), a enzima alvo dos medicamentos antifolatos, usados contra infecções bacterianas e, mais recentemente, como anti-inflamatórios (BORGES et al, 2017). Em adição, podemos somar a alta atividade antioxidante amplamente descrita em literatura para estes compostos (CIGANOVIĆ et al., 2019; SOUYOUL; SAUSSY; LUPO, 2018).

### **3.5 Análise sensorial e intenção de compra**

A análise sensorial é um tipo de avaliação utilizada para mensurar, avaliar e interpretar reações relacionadas às características de produtos, tais como são percebidas através dos sentidos ou seja remete aos desejos e aquilo que o consumidor espera de um produto (LIGANG et al., 2018.)

Figura 2: Teste hedônico de atributos sensoriais e de intenção de compra da Emulsão contendo extrato de casca de atemoia 2% (a), 5% (b) e 10% (c) com 50 provadores com idade entre 18 e 35 anos.



Os resultados correspondem às médias dos dados obtidos e os desvios padrão calculados,  $p < 0,05$ .

De acordo com os dados apresentados, não houve diferença significativa entre os parâmetros analisados. A emulsão a 10% teve menor aceitabilidade na intenção de compra por causa da cor bege escuro. As demais características atenderam aos padrões físicos e sensoriais ideais: boa textura, brilho, baixa aderência (pegajosidade), adequada percepção residual, fácil espalhabilidade e sensação de refrescância equilibrada. Para chegar a estes resultados foi importante a escolha equilibrada dos componentes da formulação somado à sua estabilidade físico-química, tornando-se uma ferramenta importante para a incorporação do extrato e desenvolvimento do cosmético.

Por meio da continuidade desta pesquisa, será possível aprimorar a metodologia de produção de uma emulsão com propriedades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e fotoprotetora com um toque agradável e boa aceitação pelo consumidor; além de possibilitar a adaptação da metodologia a outros resíduos agrícolas. Estudos complementares das propriedades dos coprodutos da atemoia poderão contribuir para o desenvolvimento de géis, pomadas, fotoprotetores e outros cosmeceuticos.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, de acordo com a análise dos resultados apresentados foi possível demonstrar a importância do conjunto de técnicas empregadas neste estudo para o desenvolvimento de uma formulação estável, com baixa toxicidade, livre de parabenos, com propriedades importantes, absorvível pela epiderme e com boa aceitação sensorial. Assim, o conhecimento dos mecanismos de ação benéfica dos compostos bioativos presentes na casca de atemoia sobre enzimas e membranas celulares é fundamental, pois a adesão ao tratamento e a eficácia clínica comprovada das formulações cosmeceúticas estão diretamente relacionadas ao sucesso da prescrição médica.

É importante ressaltar também que o extrato usado como matéria-prima, originou-se de frutos rejeitados, resíduo de produção da agricultura familiar, e seu uso no desenvolvimento de formulações cosméticas, pode agregar valor ao resíduo colaborando economicamente com a cadeia de produção agrícola dos frutos que seriam descartados, ecologicamente ao reduzir o impacto ambiental além de resultar em benefícios ao consumidor do produto em relação ao cuidado com a pele.

#### REFERÊNCIAS

ABREU, T. S. Prospecção do potencial cosmeceútico da casca de atemoia. 2020. 81p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – UFLA, Lavras, 2020.

AGARWAL, R. et al. Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. **Photochemistry and photobiology**, v. 58, n. 5, p. 695-700, 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2 ed. Editora Anvisa, 2012. Disponível em < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Seguran%C3%A7a+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c> > acesso em 12/06/2020

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 113-123, 2001.

AMBOTHY, K.; PRASAD, N. R.; BALUPILLAI, A. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, p. 72-78, 2015.

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Resolução n. 30, de 01 de Junho de 2012. Acesso em 18 jul. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e15afe804c58f17fb8f0f8dc39d59d3e/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+N%C2%BA+30,+de+1%C2%BA+de+Junho+de+2012.pdf?MOD=AJPERES>

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics and toiletries**, v. 109, n. 11, p. 63-70, 1994.

BORGES, I. V. et al. Identificação da fração antimicrobiana do extrato da *Mimosa tenuiflora*. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 155-164, 2017.

CHEN, W.; WU, L. Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 12, p. 8797, 2014.

CHORILLI, M. et al. Avaliação sensorial de formulações fotoprotetoras contendo filtro solar de amplo espectro. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n.3, p. 383-392, 2009.

CIGANOVIĆ, P. et al. Glycerolic Licorice Extracts as Active Cosmeceutical Ingredients: Extraction Optimization, Chemical Characterization, and Biological Activity. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 445, 2019.

CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – 11th Edition. CLSI document M7-A10 [ISBN 1-56238-836-3]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2015.

CRUZ, L. S. et al. Caracterização física e química das frações do fruto atemoia Gefner. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2280-2284, 2013.

DIEMBECK, W. et al. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 2-3, p. 191-205, 1999.

ELMETS, C. et al. Prevention of cutaneous photodamage by polyphenols from green tea. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, p. 425-432, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. ANVISA. Brasília. 6ed. P. 92-105; 340-345. 2019

IBGE Censo Agro 2017 disponível em [https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=35&tema=76231](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=35&tema=76231)

KATIYAR, S. K. et al. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 2, p. 287-294, 2001.

KATIYAR, S. K.; PEREZ, A.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 10, p. 3864-3869, 2000.

KUMAR, B. et al. New insights into acne pathogenesis: exploring the role of acne-associated microbial populations. **Dermatologica sinica**, v. 34, n. 2, p. 67-73, 2016.

LI, H. et al. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 12940-12948, 2014.

LIGANG, J. et al. Aplicação da Análise Descritiva Quantitativa na Avaliação Sensorial Cosmética. **China Detergent & Cosmetics**, n. 3, p. 24, 2018.

MANSUR, M. et al. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251-258, 2016.

MATSUI, M. S. et al. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Elsevier, 2009. p. 56-59.

MORAES, I. V. M. **Extração de compostos bioativos da gravioleira (*Annona muricata L.*) e concentração dos extratos por ultra e nanofiltração**. Tese, Unicamp, 2016. 165 p. Disponível em <

[http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/321387/1/Moraes\\_IngridVieiraMachadode\\_D.pdf](http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/321387/1/Moraes_IngridVieiraMachadode_D.pdf) >

MUNHOZ et al., Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.2, p. 225-232, 2012.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade 34 antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, n.2, Apr./June, João Pessoa, 2008.

RIVERS, J. K. et al. The role of cosmeceuticals in antiaging therapy. **Skin Therapy Lett**, v. 13, n. 8, p. 5-9, 2008.

SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International journal of pharmaceutics**, v. 199, n. 1, p. 39-47, 2000.

SEOK, J. K.; BOO, Y. C. p-Coumaric acid attenuates UVB-induced release of stratifin from keratinocytes and indirectly regulates matrix metalloproteinase 1 release from fibroblasts. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2015.

SOUYOUL, S. A.; SAUSSY, K. P.; LUPO, M. P. Nutraceuticals: a review. **Dermatology and therapy**, v. 8, n. 1, p. 5-16, 2018.

SURINI, S.; MUBARAK, H.; RAMADON, D. Cosmetic serum containing grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract phytosome: Formulation and in vitro penetration study. **Journal of Young Pharmacists**, v. 10, n. 2, p. S51, 2018.

TAOFIQ, O. et al. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 281, 2017.

TAOFIQ, O. et al. Phenolic acids, cinnamic acid, and ergosterol as cosmeceutical ingredients: Stabilization by microencapsulation to ensure sustained bioactivity. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 469-477, 2019.

THAKKER, K. D.; CHERN, W. H. Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms-case study. **Dissolution Technologies**, v. 10, n. 2, p. 10-16, 2003.

United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2018. <https://www.uspnf.com/> Accessed April 3, 2018.

XUAN, S. H. et al. Cosmeceutical activities of ethanol extract and its ethyl acetate fraction from coffee silverskin. **Biomaterials research**, v. 23, n. 1, p. 2, 2019.

ŽILIUS, M.; RAMANAUSKIENĖ, K.; BRIEDIS, V. Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.



## ANEXOS

## I – Parecer do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
LAVRAS

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PROSPECÇÃO DO POTENCIAL COSMECÊUTICO DA CASCA DE ATEMOIA.

**Pesquisador:** Silvana Marcussi

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 13100719.0.0000.5148

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Lavras

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.445.932

**Apresentação do Projeto:**

Prospecção do desenvolvimento de pré-formulações cosméticas com propriedades farmacêuticas a partir da casca da atemoia, de maneira sustentável e que agregue valor aos frutos que seriam descartados.

**Objetivo da Pesquisa:**

Resgatar os frutos impróprios para a comercialização e propor uma nova alternativa econômica para estes produtos que seriam descartados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos e benefícios descritos conforme as exigências éticas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentos obrigatórios apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências éticas conforme Resolução CNS 466/2012.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ao Final do experimento o pesquisador deverá enviar relatório final, indicando ocorrências e

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-000

**UF:** MG **Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep@nintec.ufa.br

Continuação do Parecer: 3.445.932

efeitos adversos quando houver.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1342534.pdf	27/06/2019 16:18:44		Aceito
Outros	CartaRespostaTati.doc	27/06/2019 16:17:33	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	TatianeComentarioseticossangue.docx	27/06/2019 16:16:05	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	TatianeComentarioseticosAnalisesensorial.docx	27/06/2019 16:15:48	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TatianeTermodeconsentimentosangue.doc	27/06/2019 16:15:29	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TatianeTermodeconsentimentoAnalisesensorial.doc	27/06/2019 16:15:20	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoPRGTati.docx	25/04/2019 12:04:42	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TatianeDeclaracaopesquisador.docx	25/04/2019 12:02:40	Silvana Marcussi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAtemoiaTatiCOEP.doc	25/04/2019 12:01:57	Silvana Marcussi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.docx	25/04/2019 12:00:59	Silvana Marcussi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufa.br