



*UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ*  
*PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA*  
*BIOTECNOLOGIA EM RECURSOS NATURAIS*

*VÍVIAN ROMERO SANTIAGO*

*AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO BIOADITIVOS*  
*ANTIOXIDANTES DERIVADOS DO LCC*

*FORTALEZA*

*2016*

VÍVIAN ROMERO SANTIAGO

AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO BIOADITIVOS  
ANTIOXIDANTES DERIVADOS DO LCC

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Selma Elaine Mazzetto

Coorientador: Prof. Dr Pierre Basílio Almeida Fechine

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S226a Santiago, Vívian Romero.  
Avaliação de formulações cosméticas contendo bioativos antioxidantes derivados do LCC / Vívian Romero Santiago. – 2016.  
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto.  
Coorientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.
1. Cardol. 2. Repelente. 3. antioxidante natural. 4. protetor biológico. 5. Cardanol. I. Título.  
CDD 660.6
-

VÍVIAN ROMERO SANTIAGO

AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO BIOADITIVOS  
ANTIOXIDANTES DERIVADOS DO LCC

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Recursos naturais

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Selma Elaine Mazzetto (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Tamara Gonçalves Araújo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Maria Izabel Gallão  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Antônio César Honorato Barreto  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico esta tese especialmente a Leão e Lília, que sempre se dedicaram para realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, que me ensinaram a fazer as melhores escolhas, que me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente feliz e tenho muito orgulho em chamá-los de pai e mãe.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pois ele me permitiu realizar essa conquista, dando-me força e iluminando o meu caminho.

A minha mãe Lília, em especial, que se dedicou a me ajudar a conquistar todos os meus projetos. Ela é a grande responsável por todas as minhas conquistas e principalmente pelos aprendizados que tive quando tudo não aconteceu como eu havia planejado. Ela me fez perceber a importância da minha independência e me mostrou que eu poderia chegar muito longe com os meus estudos, assim como ela fez. Toda minha força e determinação foi ela que me ensinou com sua história de vida.

Ao meu pai Leão que sempre ajudou a entender a importância de estudar e de alcançar meus objetivos. Em quem sempre devo me espelhar por seu esforço no trabalho e por sua honestidade. Devo agradecer por sempre estar presente na minha vida e me apoiando em todas as horas.

Ao meu irmão Luquinhas por sua alegria sempre me contagiar e por compreender todas as vezes em que eu não pude estar presente.

Ao meu noivo Bruno, que compartilhou comigo todos os momentos vividos por mim desde o início da faculdade. Agradeço pelo apoio, pela compreensão, pelo companheirismo e, acima de tudo, por me ensinar a simplificar o que eu julgava ser mais complicado. Obrigada por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário.

Aos meus avôs Anazira e Sebastião (*in memorium*), que, sempre estiveram presentes vibrando com minhas conquistas. Quero agradecer-los especialmente pela dedicação que tiveram com todos os netos. Obrigada por vocês estarem presentes com suas orações em todos os momentos decisivos da minha vida profissional. A eles dedico toda a minha admiração.

À minha avó Stael, uma verdadeira vitoriosa, que nunca mediu esforços para facilitar minha vida e ao meu avô Leão (*in memorium*) de quem eu herdei toda minha admiração pela pesquisa e docência.

Aos meus padrinhos Lia, Eneas, Ricardo, Solange, Antônio José, Janaína, A.....  
(*in memorium*) e Madeline, que se fizeram pais e mães, sempre que foi necessário.

Agradeço a minha família, todos os tios e primos, em especial minhas tias  
(Mônica, Val e Ritinha) por todo apoio a mim concedido.

À minha sogra Zeldinha que se tornou uma segunda mãe, por quem tenho todo  
respeito e admiração.

Às minhas amigas Auriana, Isabela, Raquell, Natália, Milena e Priscila que foram  
muito mais do que companheiras de estudo, e continuam paticipando de todas as fases da  
minha história, apoiando-me nas decisões e ajudando-me a alcançar os meus objetivos. No  
princípio nos aproximamos por uma única afinidade: sermos farmacêuticas, mas, com o passar  
do tempo, surgiu uma verdadeira amizade solidificada no respeito e no companheirismo. Só  
tenho a agradecer tudo que fizeram e fazem por mim.

Às minhas primas, amigas e irmãs, Camila, Dani, Thiane, Renata, Rafa, Manu,  
Liane, Lívia, Raquel e Laís que estão comigo desde a infância. Agradeço por entenderem as  
inúmeras vezes que precisei me fazer ausente. Obrigada por estarem presentes em toda minha  
existência.

Às minhas queridas amigas Manu, Fernanda, Bruna, Lyara, Aline, Amanda e  
Melissa que se tornaram verdadeiras irmãs para mim dentro da pefoce. Agradeço por cada  
momento que passamos, pelos aprendizados e por tudo que fizeram e fazem por mim. Vocês  
são a verdadeira definição que quem tem amigos tem anjos, que nos ajudam a voar quando  
não conseguimos abrir as asas.

Aos meus colegas de trabalho que deixam minhas tardes muito mais divertidas,  
obrigada por toda a ajuda durante essa fase da minha vida. Gostaria de agradecer em especial  
ao Marcone, Andrea Barbosa, Ântonia, Adriana e Eli.

Aos gestores da PEFOCE que me ajudaram durante esse período e  
compreenderam a importância dessa conquista, em especial Dr. Morais e Dr. Ricardo Macedo.

Agradeço a todos meus colegas de trabalho da Faculdade Maurício de Nassau que  
me ajudaram muito nessa fase e em especial ao coordenador Flávio Maia por entender esse  
momento.

À Professora Selma, pela confiança depositada em mim, pela colaboração e paciência e por seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do nosso trabalho.

Ao professor doutor Pierre Fachine, coorientador, a minha admiração vai além de assuntos acadêmicos, pois o admiro também como pessoa. A minha formação tornou-se muita mais rica com a sua ajuda. Obrigada por ter acreditado em mim.

À professora doutora Tamara Araújo, que, foi minha orientadora muitas vezes. Agradeço também por ter composto minha banca de avaliação e por ter contribuído para uma melhor apresentação deste trabalho.

Aos professores Prof. Dra. Maria Izabel Gallão e Prof. Dr. Antônio César Honorato Barreto por disponibilizar seu tempo como banca examinadora da minha tese.

Aos meus colegas de laboratório, LPT, em especial ao Jonas e Milena que comigo compartilharam toda essa pesquisa.

Agradeço também a todos meus alunos, que me fazem acordar com a certeza que nasci para repassar tudo que um dia alguém me ensinou. Obrigada pelo carinho e por acreditar em mim.



*“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista”*

*Aldo Novak*

## RESUMO

As empresas Brasileiras juntas produzem anualmente 70 mil toneladas de amêndoas de castanha de caju, gerando cerca de 45 mil toneladas de Líquido da Casca de Castanha do caju (LCC) por ano. O LCC muitas vezes é descartado no processo de beneficiamento da castanha, porém esse líquido e seus constituintes majoritários (Cardanol e Cardol) são uma fonte natural de compostos fenólicos de cadeia longa e insaturada. Essa característica confere algumas propriedades importantes para sua utilização como a atividade antioxidante. Avaliando as principais características desse composto, o trabalho teve como objetivo estudar a atividade dos constituintes do LCC como potencial ativo antioxidante para produtos cosméticos, para eficácia antioxidante na pele e ação repelente. Foram preparadas formulações utilizando cardanol, cardol saturado e insaturado, nas concentrações de 0,03 a 20% para atividade bactericida e, mais especificamente, de 0,03 a 0,1% para atividade antioxidante. Formulações com o BHT foram preparadas e usadas como referência. Através do método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi possível verificar que todas as formulações apresentaram atividade antioxidante superior ou semelhante às formulações que continha o butil-hidroxi-tolueno (BHT) em todas as concentrações estudadas. Além disso, essas formulações foram submetidas a testes antimicrobianos e foram ativas contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, indicando que, além de antioxidante, estes podem ser empregados como ativos antimicrobianos em formulações. Foi produzido também um hidratante repelente com o LCC Natural, Técnico, Cardol e Cardanol comparando sua atividade a um repelente comercial N,N-dimetil-meta-toluamida (DEET). Nos ensaios utilizando ratos brancos, os produtos apresentaram a percentagem de repelência de 98 a 100% em comparação com o hidratante puro. Além disso, em ensaios com seres humanos, verificou-se que o LCC Natural teve repelência de 93,8%, seguido do cardol de 92,4%. Estes valores demonstraram ser equivalentes à percentagem de repelente comercial DEET (93,6%). Além das demais atividades, o cardanol foi testado como protetor biológico em pele de porco, esse ativo foi utilizado para diminuição de radicais livres na pele com a submissão a radiação Ultravioleta. Esse foi veiculado na pele com um sistema de liberação patenteado que favoreceu a sua solubilidade em veículos aquosos e a sua permeação na pele. Foi evidenciado a redução da formação dos radicais livres na presença desse antioxidante. Dessa forma, os resultados aqui apresentados irão contribuir para o desenvolvimento sustentável e origem de matérias primas naturais e eficazes. Porém, muitos estudos ainda

devem ser realizados afim de agregar valor a um substrato que tem muito potencial, mas que é muito pouco explorado.

*Palavras Chaves:* Repelente. Antioxidante natural. Protetor biológico. Cardanol. Cardol

## *ABSTRACT*

The Brazilian companies together are responsible to produce annually 70,000 tons of almonds cashew, generating about 45 thousand tons of liquid cashew nut shell (CNSL) in the year. The CNSL is often discarded in Chestnut beneficiation process, but this fluid and its the main constituents (Cardanol and Cardol) are a natural source of phenolic compounds and unsaturated long chain. This feature gives some important properties for use as antioxidant activity. Assessing the main characteristics of this compound, the work was to study the activity of LCC constituents as active antioxidant potential for cosmetic products, for antioxidant efficacy in skin and repellent action. Formulations were prepared using cardanol, cardol saturated and unsaturated, in concentrations from 0.03 to 20% for bactericidal activity and more specifically from 0.03 to 0.1% antioxidant. Formulations BHT were prepared and used as a reference. By DPPH method it was possible to verify that all formulations showed higher antioxidant activity or similar to the formulations containing the BHT in all concentrations. In addition, these formulations were subjected to antimicrobial tests and were active against strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, indicating that in addition to antioxidant, these can be employed as antimicrobial active formulations. It has also produced a moisturizer repellent with LCC Natural, technical, and Cardol Cardanol comparing its activity to a commercial repellent N, N-dimethyl-met-toluamide (DEET). In tests using mice, the product showed the percentage of repellency of 98% to 100% compared with the pure moisturizer. Furthermore, in studies with humans, it has been found that the Natural CNSL was repellency of 93.8%, followed by 92.4% cardol. These values have proved to be equivalent to the percentage of commercial repellent DEET (93.6%). In addition to other activities, the cardanol was tested as a biological shield in pigskin, this asset was used to decrease free radicals in the skin with the submission to radiation UV. This was served to the skin with a proprietary delivery system favoring its solubility in aqueous vehicles and their permeation into the skin. It was shown to reduce the formation of radicals lives in the presence of this antioxidant. Thus, the results presented here will contribute to sustainable development and origin of natural and effective raw materials. However, many studies are still necessary in order to add value to a substrate that has a lot of potential but that is little explored

*Key Words:* Repellent. Natural antioxidant. Biological shield. Cardanol. Cardol

## LISTA DE SIGLAS

*BHA* - Butil-Hidroxi-Anisol

*BHI* - Brain Heart Infusion

*BHT* - Butil-Hidroxi-Tolueno

*CCD* - Cromatografia em Camada Delgada

*CG /EM* - Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas

*DEET* - N,N-Dimetil-Meta-Toluamida

*DMPO* - N-Óxido de 5,5 Dimetil-1-Pirrolina

*DPPH* - 2,2 Difenil-Picriltrazina

*DSL* – Espalhamento Dinâmico da Luz

*E* - Eficácia de eliminação

*ECDC* - Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças

*EPR* - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

*HD* - Diâmetro hidrodinâmico

*IR3535* - 3-[N-acetyl-N-butyl]-aminopropionic acid ethyl ester

*LCC* - Líquido da Casca da Castanha do Caju

*MDA* - Malonaldeído

*NUVET* - Núcleo de Vetores e Endemias

*OMS* - Organização Mundial de Saúde

*PBS* - Tampão Fosfato Salina

*PI* - Índice de Polidispersidade

*POLAWAX* - Álcool cetoestearílico e Polisorbato

*RMN* - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

*RSF* – Fator de Proteção Radical da Pele

*TCA* – Ácido Tricloroacético

*TCL* - Thin Layer Chromatography

*UV* – Ultravioleta

*UV-VIS* - Ultravioleta Visível

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do processo de extração o LCC .....	23
Figura 2: Composição Química do LCC .....	24
Figura 3: Descarboxilação do ácido anacárdico .....	25
Figura 4: Molécula de cardanol evidenciando as duplas ligações.....	26
Figura 5: Estrutura química do Cardol .....	28
Figura 6: Estrutura química do Cardol .....	29
Figura 7: Esquema geral da oxidação lipídica.....	31
Figura 8: Representação das etapas da auto-oxidação.....	31
Figura 9: Estrutura do $\beta$ -caroteno.....	33
Figura 10: Estrutura química do $\alpha$ -tocoferol .....	33
Figura 11: Estrutura das bicelas.....	34
Figura 12: Estrutura do sistema bicosome.....	35
Figura 13: Representação da ação dos bicosomes na pele .....	35
Figura 14: Estrutura química do BHT .....	36
Figura 15: Mapa de países de sob risco da dengue.....	39
Figura 16: Etapas realizadas durante os ensaios de atividade repelente em ratos brancos.....	53
Figura 17: Formulações de gel base com o cardanol associado ao bicosome e cardanol.....	53
Figura 18: Procedimento de separação do extrato córneo da derme. ....	59
Figura 19: Ressonância de hidrogênio do LCC natural.....	62
Figura 20: Ressonância de hidrogênio do LCC Técnico .....	63
Figura 21: Tempos de retenção dos constituintes do LCC técnico .....	64
Figura 22: Espectro de massa do cardanol saturado.....	65
Figura 23: Espectro de massa do cardol saturado.....	65
Figura 24: Espectro de massa do cardanol monoinsaturado.....	66
Figura 25: Espectro de massa do cardol monoinsaturado .....	66
Figura 26: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido para o cardanol saturado .....	67
Figura 27: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido para o cardol.....	68
Figura 28: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do cardanol insaturado.....	69
Figura 29: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do cardol insaturado ....	69
Figura 30 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono obtido para o cardanol saturado .....	70
Figura 31 -Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono obtido para o cardol saturado .....	72
Figura 32 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono do cardanol insaturado....	73
Figura 33 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono do cardol insaturado.....	73
Figura 34: Porcentagens de inibição de DPPH nas concentrações 0,03 e 0,05 .....	74
Figura 35: Placa de Ágar com as formulações contendo BHT.....	75
Figura 36: Placa de Ágar contendo as formulações com os ativos fenólicos.....	76
Figura 37: Porcentagem de repelência dos repelentes.....	79
Figura 38: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação do branco.....	81
Figura 39: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 0,5%. ....	81
Figura 40: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 1,0%.....	81

Figura 41: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardol 0,5%.....	81
Figura 42: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardol 1,0%.....	82
Figura 43: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC N 0,5%.....	82
Figura 44: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC N 1,0%.....	82
Figura 45: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC T 0,5%.....	82
Figura 46: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC T 1,0%.....	83
Figura 47: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação do branco.....	83
Figura 48: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 0,5%.....	83
Figura 49: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 1,0%.....	83
Figura 50: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardol 0,5%.....	83
Figura 51: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardol 1,0%.....	83
Figura 52: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC N 0,5%.....	84
Figura 53: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC N 1,0%.....	84
Figura 54: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC T 0,5%.....	84
Figura 55: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC T 1,0%.....	84
Figura 55: Gráfico de viscosidade nos tempos em dias.....	86
Figura 57: Valor das integrações antes, durante e após a radiação.....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de cardanol responsável por causar toxicidade.....	27
Tabela 2: Resultados dos testes de toxicidade.....	27
Tabela 3: Taxa de oxidação relacionada ao nível de saturação dos óleos.....	30
Tabela 4: Valores que correspondem à mortalidade de larvas causada pelos componentes do LCC no combate ao vetor <i>Aedes aegypti</i> .....	38
Tabela 5: Repelentes disponíveis comercialmente no Brasil, concentrações e tempo de ação estimado. ....	42
Tabela 6: Componentes e quantidades de composição da solução oleosa preventiva de escaras com cardanol insaturado. ....	47
Tabela 7: Componentes e quantidades de composição da emulsão de alta viscosidade (creme) preventiva de escaras com cardanol insaturado. ....	47
Tabela 8: Componentes e quantidades de composição da emulsão de média viscosidade (loção) preventiva de escaras com cardanol insaturado.....	48
Tabela 9: Composição dos componentes para a formulação de uma emulsão com ação de repelência (LCC natural).....	51
Tabela 10: Porcentagens dos constituintes do LCC técnico.....	64
Tabela 11: Ensaio de Atividade repelente do hidratante com adição do óleo do LCC Técnico, LCC Natural, Cardol, Cardanol, Citronela e Andiroba. ....	77
Tabela 12: Mudança das características de acordo com o tempo.....	85
Tabela 13: Resultados do total de perda de cor de acordo com o padrão.....	85
Tabela 14: Variação de pH de acordo com o tempo.....	87
Tabela 15: Avaliação da peroxidação lipídica de acordo com o tempo.....	87
Tabela 16: Valor médio de HD correspondente a diferentes populações nas curvas de distribuição de tamanhos a 25 °C.....	88
Tabela 17: Percentagem de preservação de Cardanol incorporada em bicosome e Cardanol sem bicosome após radiação (500 W m <sup>-2</sup> por 24 horas).....	90
Tabela 18: Fator de proteção radical da pele (RSF) e eficácia de eliminação (E) após a radiação UV de sistemas de cardanol aplicada na pele.....	92



## *LISTA DE EQUAÇÕES*

Equação 1: Equação para cálculo da porcentagem de inibição de DPPH .....	49
Equação 2: porcentagem de repelência.....	54
Equação 3: Cálculo da diferença de coloração .....	56
Equação 4: Cálculo do diâmetro hidrodinâmico .....	57
Equação 5: Cálculo da razão entre os números de radicais livres gerados na nativa sobre a pele tratada.....	61
Equação 6: Cálculo da eficácia de eliminação dos radicais livres.....	61

## SUMÁRIO

<i>1 INTRODUÇÃO</i> .....	21
<i>2 REVISÃO DE LITERATURA</i> .....	23
2.1 Líquido da casca da castanha de caju (LCC) .....	23
2.2 Constituintes do LCC .....	24
2.2.1 LCC Técnico .....	24
2.2.2 LCC Natural .....	25
2.2.3 Cardanol .....	25
2.2.4 Cardol .....	28
2.2.5 Ácido anacárdico .....	28
2.3 Aplicações do LCC e seus constituintes .....	29
2.3.1 Antioxidante .....	29
2.3.2 Atividade antimicrobiana .....	36
2.3.3 Atividade inseticida e larvicida .....	37
2.3.3.1 Arboviroses .....	38
<i>3 OBJETIVOS</i> .....	43
3.1 Objetivo Geral .....	43
3.2 Objetivos Específicos .....	43
<i>4 METODOLOGIA</i> .....	45
4.2 Extração do LCC natural .....	45
4.3 Separação dos constituintes majoritários do LCC técnico: cardanol e cardol, em suas formas saturadas e insaturadas .....	45
4.4 Caracterização do lcc e seus constituintes .....	45
4.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	45
4.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	46
4.4.3 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) .....	46
4.5 Metodologia para atividade antioxidante na formulação .....	46
4.5.1 Formulação de óleo preventivo para escaras .....	46
4.5.2 Formulação de uma emulsão preventiva para escaras .....	47
4.5.3 Método 2,2 difenil-picriltrazina (DPPH) .....	48
4.6 Metodologias para atividade bactericida .....	49
4.6.1 Difusão em ágar .....	49
4.7 Metodologias para atividade repelente .....	50
4.7.1 Formulação do hidratante com atividade repelente .....	50
4.7.2 Ensaio de repelência em camundongos .....	52

4.7.3 Ensaio de repelência em humanos.....	53
4.7.4 Estudo da reologia dos hidratantes.....	54
4.8 Metodologia para atividade antioxidante na pele de porco .....	54
4.8.1 Formulação do sistema lipídico .....	54
4.8.2 Caracterização do sistema lipídico .....	55
<b>4.8.2.1 Aparência e odor.....</b>	<b>55</b>
<b>4.8.2.2 Medida de cor.....</b>	<b>55</b>
<b>4.8.2.3 Medida de viscosidade .....</b>	<b>56</b>
<b>4.8.2.4 Determinação de pH.....</b>	<b>56</b>
<b>4.8.2.5 Peroxidação lipídica .....</b>	<b>57</b>
<b>4.8.2.6 Espalhamento Dinâmico da Luz (DSL).....</b>	<b>57</b>
<b>4.8.2.7 Conteúdo de cardanol.....</b>	<b>58</b>
4.8.3 Estabilidade de cardanol a radiação Ultravioleta (uv).....	58
4.8.4 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	58
<b>4.8.4.1 Preparo da pele .....</b>	<b>58</b>
<b>4.8.4.2 Medidas spin-trap .....</b>	<b>60</b>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
5.2 Caracterização dos constituintes.....	62
5.2.1 Caracterização do LCC técnico e do LCC natural .....	62
5.2.2 Caracterização do Cardol e Cardanol.....	64
5.4 Resultados para atividade repelente .....	76
5.4.1 Resultados dos ensaios em ratos mus musculus.....	76
5.4.2 Resultados dos ensaios em humanos .....	78
5.4.3 Resultados da reologia .....	80
5.5 Resultados para atividade antioxidante na pele.....	84
5.5.1 Caracterização do sistema bicosome .....	84
<b>5.5.1.1 Avaliação da aparência e odor.....</b>	<b>84</b>
<b>5.5.1.2 Medidas de cor .....</b>	<b>85</b>
<b>5.5.1.3 Medidas de viscosidade.....</b>	<b>86</b>
<b>5.5.1.4 Determinação do pH.....</b>	<b>86</b>
<b>5.5.1.5 Peroxidação lipídica .....</b>	<b>87</b>
<b>5.5.1.7 Conteúdo de Cardanol.....</b>	<b>88</b>
5.5.2 Estabilidade de Cardanol a radiação UV.....	89
5.5.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94
REFERÊNCIAS.....	96

<i>APÊNDICES</i> .....	103
<i>APÊNDICE A</i> – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do repelente corporal .....	103
<i>ANEXOS</i> .....	106
<i>ANEXO A</i> – Depósito de Patente .....	106
<i>ANEXO B</i> – Depósito de patente .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro é a principal região responsável pelo agronegócio do caju, sendo o Piauí, o Rio Grande do Norte e o Ceará os principais estados em que essa produção está concentrada. Esse negócio mantém uma grande quantidade de pessoas empregadas nos estados e gera a amêndoa e Líquido da casca da castanha do caju (LCC) destinados à exportação.

O Ceará, por ser um dos estados envolvidos na produção desse suprimento, articula várias ações com a intenção de desenvolver a cadeia produtiva do agronegócio do caju (AMORIM *et al.*, 2011; FRANÇA *et al.*, 2016). Além do Brasil, Vietnã, Índia e Nigéria também são considerados, em pequena escala, como países produtores (AMORIM *et al.*, 2011).

O cajueiro, *Anacardium occidentale*, é uma das espécies mais cultivadas nas regiões tropicais, representando uma área com mais de três milhões de hectares. O principal produto derivado dessa espécie é a amêndoa comestível, e o seu subproduto é o LCC (AMORIM *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2016).

A produção da castanha gera rendimento importante para um parque industrial que alimenta inúmeras fábricas de pequeno, médio e grande porte. A maior parte desse produto é destinada à exportação, sendo responsável por gerar um qualitativo em torno de 225 milhões de dólares por ano (AMORIM *et al.*, 2011).

A preocupação com a sustentabilidade e a qualidade do produto exportado vem do aumento da competitividade entre os principais países exportadores. Apesar de o Brasil apresentar altos índices de qualidade do produto comercializado, o baixo custo da mão de obra de outros países acaba acarretando em uma redução do preço total da amêndoa (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Além disso, países como a Índia e o Vietnã empregam um processo manual na produção das castanhas, que não gera como subproduto o LCC. Já no Brasil esse processo é semiautomatizado, além de possuir um menor rendimento e uma grande geração de LCC (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Para obter o produto do agronegócio - a castanha de caju - é necessário que o fruto passe por um tratamento prévio. A castanha *in natura* apresenta algumas características que impedem a sua decorticação por compressão (ARAÚJO; FERAZ, 2008).

Com o intuito de alterar essas características e liberar a castanha para o meio externo, prepara-se o aquênio através de um processo de hidratação e de um tratamento utilizando altas temperaturas, para que a casca fique fragilizada e as amêndoas se rompam (ARAÚJO; FERAZ, 2008). Esse tratamento térmico envolve a imersão do fruto em um líquido existente na própria casca (o LCC) (ARAÚJO; FERAZ, 2008). As empresas brasileiras - juntas - produzem anualmente 250 mil toneladas de castanha, gerando 45 mil toneladas de LCC por ano (OLIVEIRA, 2016).

O LCC, muitas vezes, é descartado no processo de beneficiamento das amêndoas, mas antes desse descarte, é necessário que haja um tratamento prévio, que encarece o processo. Apesar desse líquido, em muitas circunstâncias, não ter valor comercial, várias pesquisas apontam que ele pode ser útil em diversos seguimentos (BALACHANDRAN *et al.*, 2013). O LCC é uma fonte natural de alguns compostos fenólicos de cadeia longa e insaturada. Essa característica confere algumas propriedades importantes para sua utilização - como a atividade antioxidante (BALACHANDRAN *et al.*, 2013). Além disso, pode ser utilizado como produto industrial na fabricação de cimentos e aplicação na indústria de polímeros e resinas (PORTO *et al.*, 2013).

Aliado aos benefícios que esse produto pode trazer para sociedade, a busca por tecnologias sustentáveis vem se tornando uma grande preocupação nos últimos anos, de forma que o desenvolvimento econômico deve ter por objetivo a melhoria de vida das presentes e futuras gerações, incorporando, na sua concepção, modos de produção menos poluentes, impactantes e estimulando o desenvolvimento sustentável.

Nesse sentido, o desenvolvimento de produtos derivados do LCC e de seus constituintes passa a ser uma opção de grande viabilidade para resolver o acúmulo desse líquido nas indústrias de beneficiamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Líquido da casca da castanha de caju (LCC)

O LCC é um produto de baixo valor agregado derivado da casca da castanha do caju, obtido a partir do cajueiro *Anacardium occidentale*. Apesar de ser um subproduto do agronegócio, o LCC é uma fonte de procedência natural rica em lipídios fenólicos não-isoprenoídes. O LCC (óleo marrom extraído do processamento das amêndoas de castanha de caju constitui 18 entre 27% do total do peso do aquênio e tem baixo valor agregado (BALACHANDRAN *et al.*, 2013).

A produção do LCC pode ser realizada por diversos métodos. Dentre os processos, pode-se citar a extração a frio (por meio de prensas), a extração por solvente (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006) e o processo térmico-mecânico (*hot oil process*), que consiste em aquecer o próprio LCC a aproximadamente 190 °C e usá-lo como um meio para fornecer o aquecimento das castanhas *in natura* (OSMARI *et al.*, 2015).

O líquido é extraído quando a casca externa se rompe e, nesse processo, há liberação de alquifenois que estão presentes no mesocarpo. Esse procedimento pode ser representado pela Figura 1 (PATEL, 2006). É importante ressaltar que a composição final do LCC dependerá do método de extração.

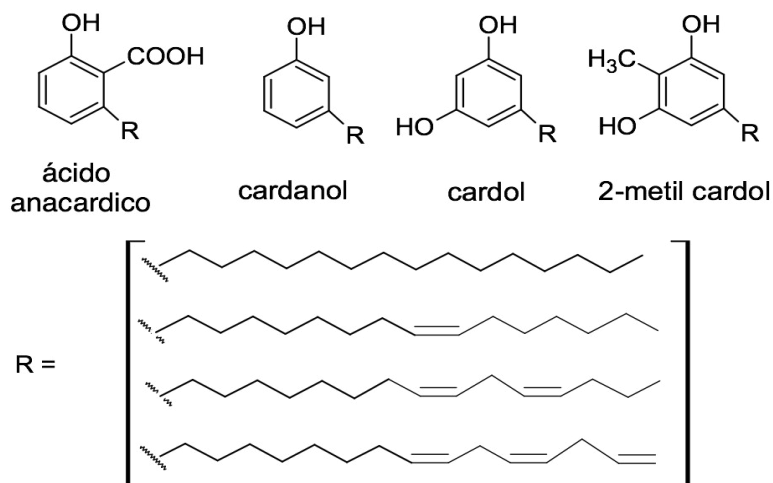
Figura 1: Representação do processo de extração o LCC



Fonte: autoria própria.

Através de um método de extração, é possível separar os constituintes químicos do LCC (cardanol, cardol, ácido anacárdico e 2-metilcardol), que podem ser visualizados na Figura 2 (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Figura 2: Composição Química do LCC



Fonte: (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

## 2.2 Constituintes do LCC

### 2.2.1 LCC Técnico

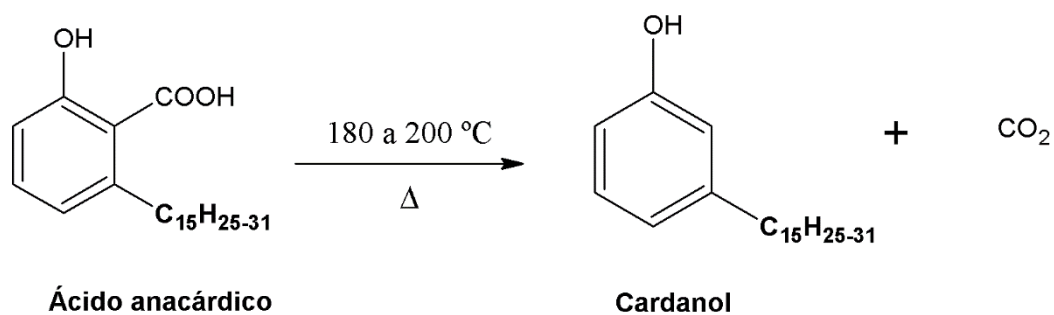
O LCC Técnico é obtido através do processo de extração que envolve o aquecimento das amêndoas a uma temperatura de 180-200 °C. Quando o ácido anacárdico é submetido a altas temperaturas, sofre uma reação de descarboxilação e é convertido em cardanol, produzindo o LCC Técnico, como é possível evidenciar na Figura 3 (GUISSONI *et al.*, 2013).

O LCC Técnico contém principalmente cardanol (60-65%), cardol (15-20%), material polimérico (10%) e traços de 2-metil cardol. Vale ressaltar que, dependendo das condições do processo de torrefação das amêndoas, a composição do LCC pode ser alterada e chegar a graus mais altos de cardanol (83-84%), menor proporção de cardol (8-11%), manter níveis de material polimérico (10%), além de aumentar a concentração de 2-metil cardol para 2% de proporção (KUMAR *et al.*, 2002; LOPEZ *et al.*, 2012).



O material polimérico encontrado no LCC Técnico é advindo do processo de aquecimento. Para se avaliar a formação desse material polimérico durante o processo de extração, é observada a medida de viscosidade (SILVA *et al.*, 2016).

Figura 3: Descarboxilação do ácido anacárdico



Fonte: autoria própria.

Esse procedimento de extração é o processo industrial utilizado no Brasil, e é um processamento semiautomático, com menor desempenho e com grande geração de LCC Técnico como subproduto (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

### 2.2.2 LCC Natural

Quando o LCC é extraído por meio de solventes ou prensas, é obtido o LCC Natural, no qual a concentração de ácido anacárdico (71 % a 82 %) é superior à concentração de cardanol (1,08%) e não apresenta material polimérico na sua composição total. Quanto à concentração de cardol, essa proporção fica similar tanto no LCC Natural quanto no LCC Técnico (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). O LCC Natural pode ser utilizado com fonte para produção de tensoativos naturais (FRANCA *et al.*, 2016)

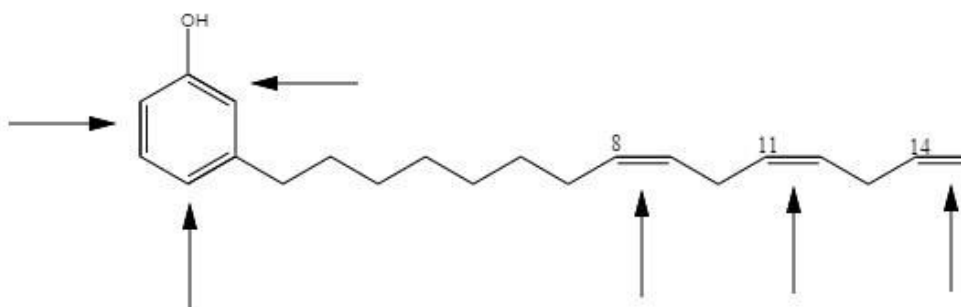
### 2.2.3 Cardanol

Para a obtenção dos constituintes do LCC, vários métodos de extração podem ser utilizados a partir do LCC Técnico. Um dos métodos é a extração em coluna cromatográfica, de acordo com Lomonaco *et al* (2009), que consegue promover com eficácia a separação do cardanol e cardol. Esse composto também pode sofrer uma reação de hidrogenação sob

pressão, formando o cardanol hidrogenado, que pode ser visualizado nas estruturas da Figura 2.

As principais características desse constituinte é não apresentar odor forte, ser pouco volátil e possuir ponto de ebulição elevado. Quando se observa na sua estrutura química o posicionamento das duplas ligações, observa-se que estas permitem que seja possível realizar inúmeras funcionalizações, e que produtos finais sejam gerados, tais como aditivos, surfactantes, antioxidantes, pesticidas, repelentes, entre outros compostos. A presença de uma estrutura fenólica aumenta a probabilidade da atividade bactericida do composto. Já as insaturações são responsáveis pela promoção da lipossolubilidade, que facilita sua passagem através da membrana celular sendo responsável pela atividade larvicida e aumenta a funcionalização desses constituintes (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Figura 4: Molécula de cardanol evidenciando as duplas ligações.



Fonte: autoria própria.

A principal vantagem da utilização do Cardanol como matéria-prima para o desenvolvimento de produtos é a ausência de toxicidade ambiental e aguda dessa substância. Segundo o documento *Screening-Level Hazard Characterization*, publicado em 2009 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, os perigos agudos para os peixes, invertebrados aquáticos e plantas aquáticas produzidos pelo cardanol estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração de cardanol responsável por causar toxicidade.

Concentração de Cardanol que causa toxicidade	Meio Ambiente
0,001 mg / L	Peixes
0,004 mg / L	Invertebrados Aquáticos
0,010 mg / L	Plantas Aquáticas

Fonte : (Screening-Level Hazard Characterization,2009)

Esses valores reportados são superiores aos valores comumente utilizados nas formulações cosméticas (0,05 a 1%) .

A toxicidade aguda oral dessa substância em ratos foi considerada baixa. Quando utilizado por via cutânea, ele foi considerado um sensibilizador, porém, não foi o responsável por apresentar efeitos mutagênicos. Os resultados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes de toxicidade.

Toxicidade aguda oral LD50 (mg/kg)	>1000 mg/kg
Toxicidade reprodutiva / desenvolvimento	
Toxicidade reprodutiva Toxicidade evolucional	NOAEL = 150 mg/kg LOAEL = 1000 mg/kg NOAEL = 1000 mg/kg
Toxicidade genética – Mutação genética <i>In vitro</i>	Negativo
Toxicidade genética – Aberração cromossomal <i>In vitro</i>	Negativo
Infomação adicional Sensibilização da pele	Positivo

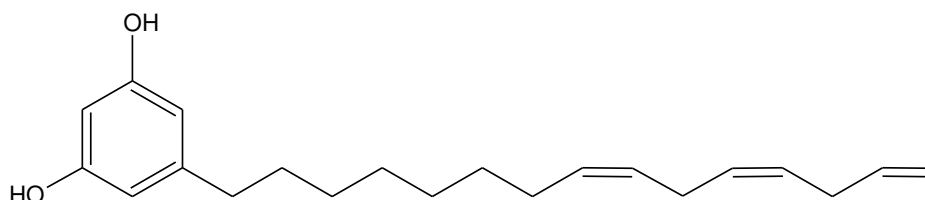
Fonte:(Screening-Level Hazard Characterization,2009)

#### 2.2.4 Cardol

O cardol (Figura 5) está presente em menores concentrações tanto no LCC Técnico (3,8 a 18,6 %) quanto no LCC Natural (13,8 a 20,21%). Ele apresenta uma estrutura semelhante a do ácido anacárdico, por ter uma segunda hidroxila no anel aromático. Assim como o cardanol, esse composto pode sofrer reações de hidrogenação e deixar suas cadeias saturadas (LOMONACO *et al.*, 2009).

Apesar de anteriormente ter sido considerada tóxica por sua atividade antifilaríase -através da inibição da acetilcolinesterase-, essa substância possui diversas aplicações, tais como atividade antioxidante, larvicida e bactericida (OSMARI *et al.*, 2015).

Figura 5: Estrutura química do Cardol



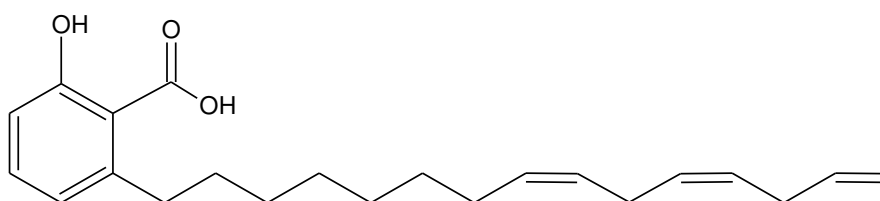
Fonte: autoria própria.

#### 2.2.5 Ácido anacárdico

O Ácido anacárdico é encontrado em grande quantidade no LCC Natural, porém, no LCC Técnico a sua descarboxilação através do aquecimento dá origem ao cardanol.

É um composto fenólico biossintetizado através dos ácidos graxos. No LCC Natural, eles constituem aproximadamente de 70 a 90% do líquido extraído da casca de castanha de caju, além disso, são responsáveis pelas propriedades cáusticas e irritantes desse líquido (FRANCA *et al.*, 2016). Segundo Andrade *et al* (2011), esse composto é responsável por apresentar uma atividade biológica de desnaturação de proteínas dos micro-organismo. Sua estrutura está representada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura química do Cardol



Fonte: autoria própria.

## 2.3 Aplicações do LCC e seus constituintes

### 2.3.1 Antioxidante

Em virtude da presença de compostos fenólicos em sua constituição, o LCC tem se destacado em muitos trabalhos como fonte de antioxidantes naturais, os quais podem ser aplicados na inativação do processo oxidativo de sistemas biológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2011; TREVISAN, 2006; MAIA *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante desse composto e de seus constituintes foi exemplificada por Andrade *et al* (2011), e essa atividade foi atribuída a alta participação do cardanol e do cardol presentes nesse líquido.

Além disso, também foi evidenciado que o ácido anacárdico possui uma capacidade de quelar metais, portanto, é responsável por estabilizar as formulações e diminuir a oxidação (KUBO *et al.*, 2006). O cardanol hydrogenado (saturado) tem sido utilizado como aditivo antioxidante em processos industriais flavorizantes: estabilizantes, alimentícios e lubrificantes (TREVISAN, 2006; RIOS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Alguns autores reportaram as atividades antioxidantes desses compostos comparadas a antioxidantes comerciais, como butil-hidroxi-tolueno (BHT), o butil-hidroxi-anisol (BHA) (RIOS *et al.*, 2008; FAÇANHA *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante encontrada no LCC, no cardanol e no cardol, quando comparada aos demais constituintes e derivados, evidencia claramente que a presença de insaturações aumenta o potencial antioxidante desses compostos.

Baseado em pesquisas, foi observado que, de acordo com a atividade antioxidante, o LCC >> cardanol > cardanol hydrogenado e alquilado > cardanol hydrogenado (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009)

A busca por antioxidantes de origem natural como os constituintes do LCC tem crescido , pois muitos alimentos e cosméticos são produzidos com a presença de ácidos graxos e esse material lipídico é suscetível à oxidação (GRASSI; MARCOS; PONSANO, 2016).

A peroxidação lipídica é um processo oxidativo responsável pelo surgimento de odores alterados e o surgimento do ranço. A diminuição do tempo de prateleira de alguns produtos se deve, em sua maioria, pela oxidação de lipídios. Apesar de não serem totalmente elucidados, esses processos podem ocorrer por diferentes mecanismos e estão relacionados à estrutura lipídica (ALVES *et al.*, 2010).

Existem algumas variabilidades relacionadas à natureza e ao número de insaturações, como é possível visualizar na Tabela 3. Nota-se que quanto maior for o número de insaturações, maior será a taxa de oxidação, portanto os mais insaturados possuem maior tendência a sofrer oxidação (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 2000).

Tabela 3: Taxa de oxidação relacionada ao nível de saturação dos óleos.

Ácido graxo	Nível de insaturação	Taxa de Oxidação
Ácido esteárico	18:0	1
Ácido oléico	18:1	10
Ácido linoléico	18:2	100
Ácido linolénico	18:3	200

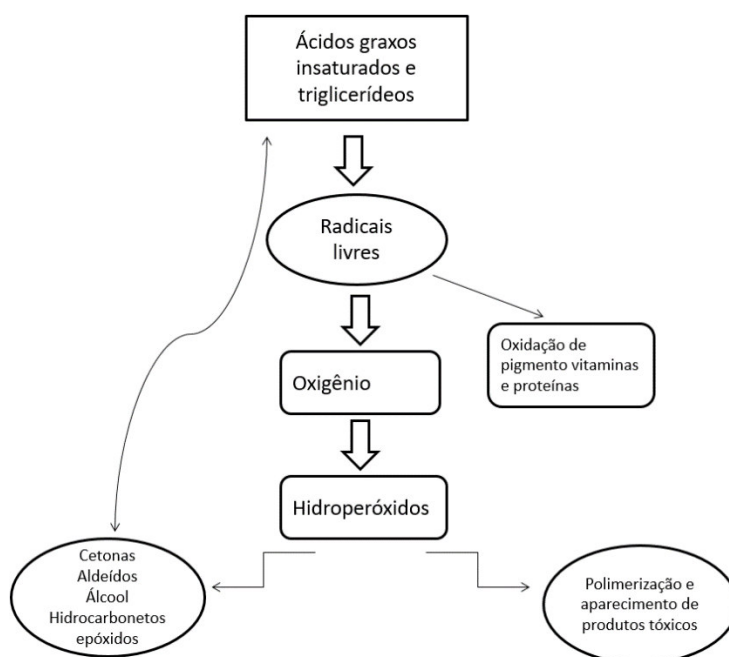
Fonte: (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 2000).

Essa oxidação também pode variar de acordo com o tipo de interação entre os lipídios e o oxigênio, bem como nas fases que aquele se apresenta nas formulações (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão) (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 2000).

Outros fatores que podem influenciar nessa oxidação são os relacionados à temperatura e à exposição à luz (ALVES *et al.*, 2012). Eles envolvem tanto a via enzimática quanto não enzimática, como demonstrado na Figura 7.

Os produtos com grande concentração de ácido graxo precisam conter em suas formulações agentes antioxidantes, com o intuito de diminuir esse processo (ALVES, *et al.*, 2012).

Figura 7: Esquema geral da oxidação lipídica.



Fonte: Adaptado (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

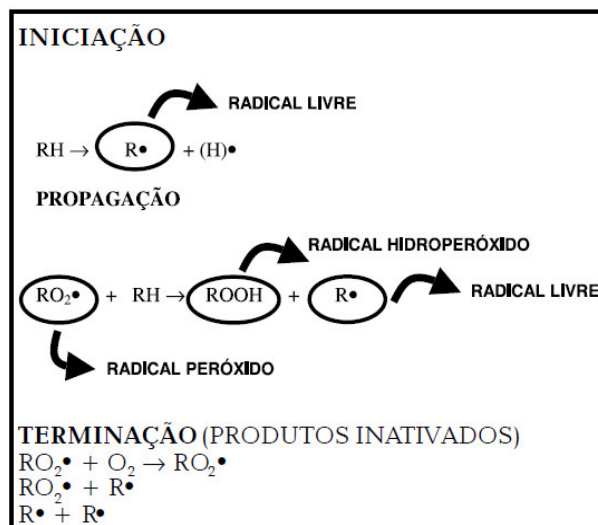
A oxidação enzimática acontece através da enzima lipoxigenase, que age com grande especificidade sobre os ácidos graxos poli-insaturados. Dessa forma, o oxigênio é adicionado nas cadeias insaturadas desses ácidos, formando os hidroperóxidos.

O resultado da formação dos peróxidos é o aumento das reações de degradação que os compostos envolvidos no processo são responsáveis, formando produtos diferentes dos originais. Esse procedimento é similar ao realizado no método de auto-oxidação. (RAMALHO; JORGE, 2006).

A auto-oxidação é um processo rápido e pode ser dividido em três etapas (Figura 6): iniciação, propagação e terminação.

1. Primeira etapa: os substratos da reação (oxigênio e lipídios insaturados) vão desaparecer.
2. Os produtos iniciais da reação (peróxidos e hidroperóxidos) aparecem.
3. Início da produção dos produtos secundários derivados da reação de cisão e rearranjo dos peróxidos (RAMALHO; JORGE, 2006; AHMAD *et al.*, 2011)

Figura 8: Representação das etapas da auto-oxidação.



Fonte: (RAMALHO; JORGE, 2006).

Outro processo de oxidação é a foto-oxidação que é um mecanismo que depende principalmente da radiação ultravioleta (UV). A UV é a responsável por formar um intermediário, resultando na formação de hidroperóxidos que podem provocar as reações de oxidação no produto e na pele humana (AHMAD *et al.*, 2011).

A pele é considerada o órgão mais extenso do corpo humano, além de ser o mais exposto a inúmeros fatores, riscos ambientais e radiações solares. A radiação UVA (comprimento entre  $\lambda=320$  e  $\lambda=400$  nm) é uma radiação capaz de penetrar até a derme, podendo ser responsável pelo envelhecimento precoce e pelo câncer de pele. Já a UVB (comprimento de onda entre  $\lambda=290$  a  $\lambda=320$  nm) é responsável pela vermelhidão causada pelos raios solares (BALOGH, *et al.*, 2011).

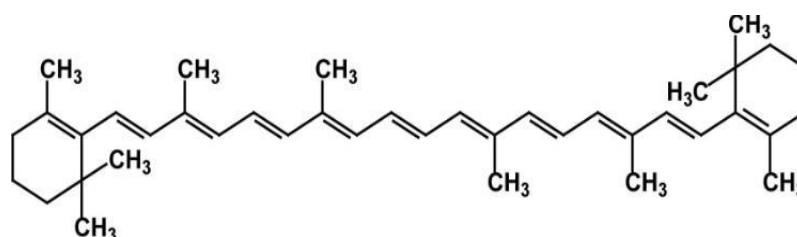
Ambas as radiações podem ser responsáveis por produzir radicais livres, como os ânions superóxido (DOT -  $O_2^-$  radical) e hidroxilas ( $OH^\bullet$ ) que causam o processo de fotossensibilização da pele. Por essa razão, a aplicação tópica de antioxidantes ou formulação com antioxidante tem sido utilizada para proteger a pele da radiação (LADEMANN, 2011).

A utilização oral ou tópica de antioxidantes tem representado uma estratégia inovadora para a proteção cutânea contra o estresse oxidativo causado pelas radiações solares. Existe uma busca crescente por substâncias que aumentem direta ou indiretamente a proteção contra esses radicais (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).



O  $\beta$ -caroteno (Figura 9) é um precursor do retinol que tem sido bastante estudado como antioxidante lipofílico na prevenção da produção de radicais livres. Esse composto provou ser muito eficaz para a prevenção do câncer de pele quando ingerido em dietas orais. Para prevenir a carcinogênese e o melasma, ele funciona como captador de radicais livres, impedindo que o processo de oxidação ocorra na pele (MIRANDA; VALÊNCIA; FERNANDEZ, 2015).

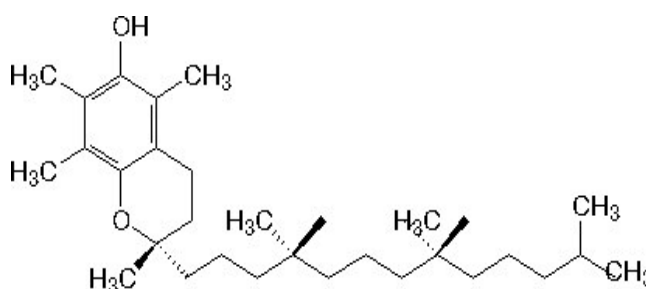
Figura 9: Estrutura do  $\beta$ -caroteno.



Fonte: autoria própria.

Outro antioxidante bastante citado na literatura como substância capaz de proteger as membranas contra a lipoperoxidação é o  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E). Essa vitamina (Figura 10), por ter sua eficácia comprovada, é utilizada em fotoprotetores como protetor biológico não só por impedir a lipoperoxidação, mas também por evitar o desenvolvimento de dímeros de timina e a imunossupressão.

Figura 10: Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol



Fonte: autoria própria.

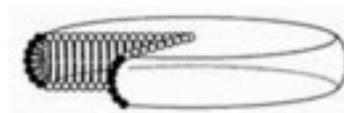
Apesar dessas afirmações, pesquisas recentes evidenciaram que essa vitamina pode inibir a glutathione-S-transferase, é responsável pela detoxificação dos compostos

citotóxicos. Dessa forma, o  $\alpha$ -tocoferol pode estar envolvido no aparecimento do câncer de pele (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, pode atuar contra a radiação UV, captando as espécies reativas geradas. Estudos realizados evidenciaram que a vitamina C tem esses efeitos quando administrada topicamente, porém a suplementação oral não evidencia esses benefícios (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). Muitos fabricantes estão contribuindo para o desenvolvimento do protetor solar com proteção biológica. Além da importância do efeito, a estratégia de marketing inclui a adição desses antioxidantes de origem natural (WANG; OSTERWALDER; JUNG, 2011). Assim, patentes nessa área têm sido depositadas como uma patente internacional (WO 2006/042391), que atestou que as substâncias que foram sintetizadas e isoladas a partir do LCC obtiveram a capacidade de fornecer proteção para a pele contra a radiação solar (UVA e UVB) (ROMEIRO, 2006).

Apesar da utilização ser importante para diminuição da formação dos radicais livres, a utilização desses antioxidantes se torna muito limitada devido à sua fraca solubilidade e instabilidade química. Para melhorar a veiculação desses ativos na pele e evitar a oxidação prematura, estas moléculas podem ser encapsuladas em diferentes veículos lipídicos (ZHAO; CASTRANOVA, 2011). As Bicelas (Figura 11) podem ser descritas como estruturas na escala nanométrica e discoidal (15-25nm) formadas por uma moléculas de fosfolipídeos de cadeias longas e curtas. Por ter um tamanho pequeno essas bicelas podem permear a pele com maior facilidade. E sua estrutura é capaz de permitir o encapsulamento de diferentes sistemas podendo aumentar as aplicações dermatológicas (FERNANDEZ *et al.*, 2015).

Figura 11: Estrutura das bicelas



Fonte: (FERNANDEZ *et al.*, 2015)

Para manter essas nanoestruturas é necessário um ambiente com grande quantidade de água, portanto uma alternativa é encapsulá-la com lipossomas produzindo assim novas estruturas denominadas bicosomes (Figura 12). Esses sistemas, baseiam-se em misturas de vesículas esféricas em torno de 100-200 nm de diâmetro que quando comparada aos lipossomas tradicionais possuem inúmeras vantagens. Quando comparamos os bicosomes com micelas, é possível evidenciar a ausência de surfactantes no sistema, o que evitaria a irritação da pele promovida por esses (FERNANDEZ *et al.*, 2015).

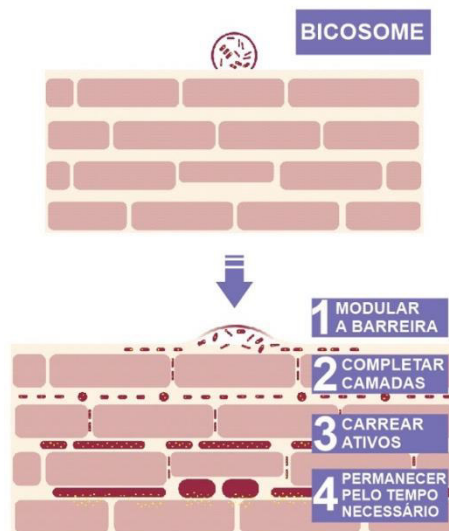
Figura 12: Estrutura do sistema bicosome.



Fonte: (FERNANDEZ *et al.*, 2015)

Os bicosomes são formados exclusivamente por moléculas lipídicas e são bons portadores para aplicações tópicas (FERNANDEZ *et al.*, 2015). É possível visualizar como esse sistema age ultrapassando as camadas da pele na Figura 13.

Figura 13: Representação da ação dos bicosomes na pele

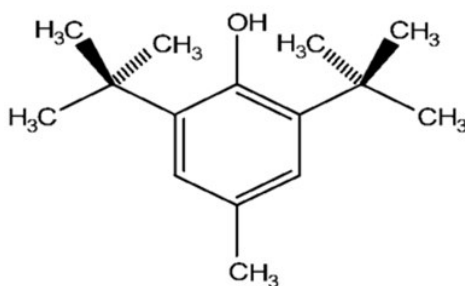


Fonte: <http://www.bicosome.com/es/> (2016)

Além de antioxidantes com a função de diminuir a formação de radicais livres na pele existem disponíveis no mercado vários antioxidantes utilizados para produtos, e os mais usados são o BHT, BHA e o butil-hidroquinonas terciárias. A ação pode ser sinérgica, com a associação entre eles ou com ácido cítrico (MIRANDA *et al.*, 2016).

Sabe-se que os mais utilizados nas formulações cosméticas, para a fase hidrofóbica, são os tocoferóis e os compostos aromáticos, como BHT (Figura 14). Já para fase hidrofílica, são o ácido cítrico e o ácido ascórbico. O mecanismo de ação desses antioxidantes atua na estabilização dos ácidos graxos, provocando a quelação dos íons metálicos, assim torna-se possível parar a propagação da oxidação lipídica (MIRANDA *et al.*, 2016).

Figura 14: Estrutura química do BHT



Fonte: autoria própria.

O uso desses compostos é questionado por vários estudos em termos de segurança, tendo em vista os riscos de causar doenças cardíacas e carcinogênese. Por essa razão, no continente europeu e em países como Japão, Canadá e Estados Unidos, por exemplo, não é permitido a utilização de determinados antioxidantes sintéticos em alimentos. (MARANGONI; MOURA, 2011).

### 2.3.2 Atividade antimicrobiana

A seleção do agente antimicrobiano e antioxidante depende dos mecanismos de ação, toxicidade e custo. Além disso, alguns antimicrobianos que estão disponíveis não possuem espectro de ação adequado, portanto muitos pesquisadores têm se concentrado na

investigação de produtos naturais como fonte de novas moléculas bioativas (VALGAS *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, agentes antimicrobianos e antioxidantes de origem natural têm chamado a atenção dos consumidores. Isso se deve ao aumento da sensibilização das pessoas em relação à proteção ao ambiente e à preocupação para o controle de doenças infecciosas (LI; PENG, 2015).

Foi observado na literatura que o LCC apresenta ação antimicrobiana sobre o *Streptococcus mutans*, e essa atividade pode estar relacionada como núcleo de ácido anacárdico e à quantidade de insaturações da molécula, pois evidenciou-se maior atividade em moléculas com maior número de insaturações na cadeia do substituinte (GAITÁN *et al.*, 2003).

Além disso, os principais compostos fenólicos (ácido anacárdico, cardanol, cardol e 2 - metil-cardol), quando isolados a partir do LCC, apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. No entanto, os mesmos compostos não foram efetivos contra *Enterobacter aerogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Penicillium chrysogenum* (HIMEJIMA; KUBO, 1991). O cardanol hidrogenado e seus derivados também foram evidenciados por apresentar atividade bactericida (SALADINO, 2000) e fungicida (FENNER *et al.*, 2006).

### 2.3.3 Atividade inseticida e larvicida

Recentemente, a revista *Green Chemistry* publicou o emprego do LCC Técnico, cardol, cardanol e seus análogos como produtos que apresentam atividade larvicida. As concentrações em ppm utilizadas por essas substâncias, para que houvesse 50 % de mortalidade larval, estão representadas na Tabela 4 (LOMONACO *et al.*, 2009).

O cardol foi o constituinte do LCC que apresentou atividade larvicida com menor concentração nos bioensaios realizados por Lomonaco *et al* em 2009. Esse potencial foi ligado diretamente às insaturações desses compostos - quanto mais insaturados, mais lipossolúveis, o que facilitaria a passagem através das membranas celulares. Dessa forma, o autor afirma que o LCC e seus constituintes podem ser considerados novos “larvicidas verdes” no combate ao mosquito *Aedes aegypti* (LOMONACO *et al.*, 2009).

Tabela 4: Valores que correspondem à mortalidade de larvas causada pelos componentes do LCC no combate ao vetor *Aedes aegypti*.

Amostra	CL <sub>50</sub> (ppm)
LCC Técnico	51,043 ± 0,625
Cardanol	28,903 ± 0,365
Cardol	14,202 ± 0,626
Cardanol hidrogenado	68,187 ± 0,500
Cardol hidrogenado	> 500

Fonte: (LOMONACO *et al.*, 2009).

Outros estudos também mostraram que produtos derivados do ácido anacárdico (sódio anacárdico) foram efetivos contra larvas e pupas do mosquito da dengue (FARIAS *et al.*, 2009).

Segundo Oliveira *et al* (2011), comprovando os dados apresentados por Lomonaco *et al*, os constituintes do LCC, além de apresentarem atividade antioxidante e serem inibidores da enzima acetilcolinesterase, também mostraram atividade larvicida. Esses principais constituintes foram o ácido anacárdico, o cardol e o cardanol. Dessa forma, ele afirma que surge então uma oportunidade de aumentar o valor agregado e desenvolver novos larvicidas naturais.

Embora muitos exemplos literários relatem a utilização do LCC e de seus constituintes como inseticidas e larvicidas, poucas mencionam a sua utilização com repelente.

### 2.3.3.1 Arboviroses

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as arboviroses são viroses que podem ser transmitidas através de vetores artrópodes. Elas são consideradas doenças tropicais por seus vetores se desenvolverem com maior frequência no clima dos trópicos como evidenciado na Figura 15.

Figura 15: Mapa de países de sob risco da dengue.



Fonte: OMS,2011

Segundo Silva e colaboradores (2009), o clima foi apontado como fator determinante para o aumento da proliferação e distribuição do mosquito transmissor, principalmente em climas quentes e úmidos. Nos últimos 10 anos, houve um aumento no surgimento das arboviroses, como Chikungunya e o vírus Zika em diferentes países das Américas, portanto já está comprovado que existe maior necessidade de um estudo preventivo dessa epidemia (LIMA, 2016).

O mosquito *Aedes aegypti* é conhecido por ter hábito diurno; ele age principalmente no começo da manhã e no fim da tarde, e os ambientes urbanos e domiciliares são os mais habitados por ele (FIOCRUZ, 2009).

O mosquito pode se alimentar tanto das seivas das plantas quanto de sangue. As suas fêmeas são hematófagas e sua principal fonte de alimentação é o sangue humano. Dessa forma, à medida que elas se alimentam do sangue do hospedeiro que está infectado, elas também se contaminam e podem afetar os próximos hospedeiros. Logo após a alimentação, as fêmeas são capazes de depositar entre 150 a 200 ovos (SILVA; ARIANO; IRACI, 2008).

A forma utilizada para a proliferação dos mosquitos é através da postura dos ovos pela fêmea - isso acontece em água parada. Logo depois os ovos eclodem, gerando as larvas.

Esse ciclo dura em torno de 10 dias, dependendo de fatores externos como temperatura, que pode acelerar o processo. O ovo pode sobreviver por até um ano fora do ambiente aquático e pode aguardar as melhores condições ambientais para eclodir (FIOCRUZ, 2009).

A dengue é a arbovirose considerada mais prevalente no mundo. Até o momento foram descobertos quatro sorotipos desse vírus, e a sua circulação tem aumentado as formas consideradas graves e letais (SILVA *et al.*, 2009; WILDER *et al.*, 2009).

Seus principais sintomas podem variar e vão desde febre e dor nas articulações até várias manifestações hemorrágicas e choque. A dengue convencional é uma patologia com sintomas inespecíficos e que pode ser classificada por cefaleia, dores nas articulações e febre alta (CALVO *et al.*, 2016).

O Zika vírus foi inicialmente isolado em um macaco em uma floresta da Uganda e, assim como a dengue e a *Chikungunya*, também é transmitido por várias espécies de mosquitos *Aedes*. Segundo pesquisas, o Brasil foi evidenciado como o país mais afetado, com cerca de 1,4 milhões de casos foram informados até setembro de 2016.

Segundo o documento técnico do Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças (ECDC), o quadro clínico é muito semelhante às demais patologias transmitidas pelo *Aedes*, e sua manifestação ocorre por dor de cabeça, mialgia e febre. Além disso, essa doença também está relacionada à síndrome de Guillain-Barré.

Segundo relatórios recentes do Ministério da Saúde, foram relatados casos de microcefalia na região Nordeste associados ao Zika vírus (ECDC, 2016).

Além da dengue, outra arbovirose que possui surtos frequentes é a febre *Chikungunya*. Estima-se que, entre os anos de 2015 a 2016, ocorreram vários surtos totalizando 230 mil casos dessa arbovirose (ESPOSITO; FONSECA, 2016).

Essa febre é causada por um alfavírus (*Chikungunya*) e possui a mesma forma de transmissão da dengue. A incubação dessa patologia varia entre dois a 12 dias, e não são todos indivíduos infectados que desenvolvem obrigatoriamente os sintomas. O principal sintoma da febre *Chikungunya* é o aumento da temperatura corporal, e esse sintoma é acompanhado por poliartralgias (ESPOSITO; FONSECA, 2016).

A transmissão dessas patologias ocorre através do contato direto com o mosquito *Aedes aegypti* ou por *Aedes albopictus*, que, além de ter uma proliferação semelhante, também possuem morfologia similar (ESPOSITO; FONSECA, 2016). Até o momento, ainda não



existe vacina que seja eficaz para esses vírus; a alternativa utilizada é a prevenção, tendo o enfoque no controle do vetor e na prevenção individual (ABRAO *et al.*, 2015).

Os repelentes contra insetos são o método de proteção pessoal mais importante contra doenças transmitidas por mosquitos, visto que uma única picada pode resultar na transmissão de patógenos (FRADIN; DAY, 2002).

O uso de repelentes, seja por moradores de áreas endêmicas ou por viajantes que se deslocam para áreas de risco, além de impedir o desconforto causado pelas picadas, pode se configurar como única medida de proteção contra doenças nas quais o controle vetorial não é possível (FRANCES *et al.*, 2009; NASCIMENTO, 2014).

Os repelentes são considerados substâncias que impedem a proximidade dos mosquitos. Eles podem ser administrados em tecidos, pele e outras superfícies. Dessa forma, pode-se considerar que a sua utilização reduz consideravelmente a transmissão de várias doenças que podem ser transmitidas por esses vetores (RIBAS; CARREÑO, 2010).

Os repelentes agem gerando uma camada de vapor, que forma um odor responsável por repelir os insetos da pele. As principais características do repelente são repelir várias espécies, não ter toxicidade, não ter cheiro evidente e ser economicamente viável (STEFANI *et al.*, 2009).

O *N,N*-dimetil-meta-toluamida (DEET) é o repelente considerado mais eficaz e começou a ser utilizado desde a década de 1950. A sua eficácia e duração de proteção dependem da concentração desse ativo (STEFANI *et al.*, 2009). Apesar de sua eficiência comprovada, ele é criticado por alguns autores por sua toxicidade. Foram relatados alguns casos de encefalite que tinham correlação com seu uso.

Existe um consenso na literatura sobre as concentrações de repelentes. Deve-se utilizar a menor concentração de ativos. Além disso, ativos naturais podem causar menor irritação e toxicidade para pele. As principais concentrações dos repelentes mais usados no mercado estão dispostas na Tabela 5 (STEFANI *et al.*, 2009).

Icaridina ou KBR 3023 (1-piperidinecarboxylic acid, 2-(2-hydroxyethyl)-1-methylpropylester) é um repelente novo derivado da pimenta. Sua ação é comparável ao DEET na concentração de 15-20 %.

IR3535 (3-[N-acetyl-N-butyl]-aminopropionic acid ethyl ester) possui a mesma forma do aminoácido alanina e, em concentração de 20%, foi eficaz contra *Anopheles* e

*Aedes*. Óleos naturais são considerados os mais antigos repelentes e, dentre eles, podemos encontrar o óleo de citronela, eucalipto, coco, andiroba e hortelã (STEFANI *et al.*, 2009).

Tabela 5: Repelentes disponíveis comercialmente no Brasil, concentrações e tempo de ação estimado.

Princípio ativo	Produto (fabricante) e formas de apresentação	Concentração (%)	Idade permitida*
DEET	Autan (Johnson Ceras) aerossol, loção, spray	6-9%	
	OFF (Johnson Ceras) loção, spray	6-9%	> 2 anos
	spray OFF kids (Johnson Ceras)	6-9%	> 2 anos
	loção OFF (Johnson Ceras)	14%	> 2 anos
	Super Repelex (Reckitt Benckis) spray, loção Aerossol	14,5% 11,05%	> 12 anos
	Super Repelex kids gel (Reckitt Benckis)	7,34%	> 12 anos
Ircaridina	Exposis adulto (Osler) gel, spray	50%	> 12 anos
	Exposis Extreme (Osler) spray	25%	> 10 anos
Óleo de citronela	Citromim spray (weleda)	1,2%	> 2 anos
IR3535	Loção anti-mosquito (Johnson & Johnson)	Informação não fornecida pelo fornecedor	> 6 meses

\*Idade permitida para utilização desse produto

Fonte: Adaptada (STEFANI, 2009)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade dos constituintes do Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC) como potencial ativo antioxidante para produtos cosméticos, para eficácia antioxidante na pele e ação repelente.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar o cardanol e o cardol (saturado e insaturado) através das técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM);
- Para avaliar atividade antioxidante na formulação:
  - Desenvolver soluções oleosas e emulsões para combater escaras e comparar o comportamento dos diferentes tipos de antioxidantes e por ensaios *in vitro*;
- Para avaliar atividade bactericida:
  - Realizar testes antimicrobianos nas formulações contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*;
- Para avaliar atividade repelente na formulação:
  - Formular as emulsões repelentes à base de POLAWAX (Álcool cetosteárico e polisorbato), propilenoglicol, Cetiol, Vaselina líquida, citronela, andiroba e antioxidantes naturais (compostos fenólicos) derivados do Líquido da Casca da Castanha de Caju – LCC Natural, Técnico e seus principais constituintes (cardanol, cardol, ácido anacárdico);
  - Investigar o comportamento reológico de todos os hidratantes produzidos com o LCC Natural, Técnico e seus componentes (Cardanol e Cardol);

- Avaliar a eficácia da atividade repelente das emulsões formuladas através da exposição dos ratos ao mosquito *Aedes aegypti* - com a proteção dos hidratantes contendo os ativos fenólicos;
- Realizar os testes de repelência em humanos utilizando o DEET como repelente de referência para controle positivo;
- Para avaliar atividade antioxidante na pele:
  - Encapsular o cardanol insaturado no sistema Bicosome;
  - Realizar a caracterização físico-química do sistema (Realizar o Diâmetro hidrodinâmico (HD) e índice de polidispersibilidade (PI) dos bicosomes de cardanol);
  - Realizar a estabilidade (30 dias) do sistema bicosome contendo cardanol quanto à coloração, à viscosidade, à peroxidação lipídica e à quantificação de cardanol no sistema;
  - Analisar a estabilidade à radiação UV do cardanol isolado e no sistema bicosome;
  - Avaliar a Eficácia Antioxidante in vitro: Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e determinação do Fator de proteção radical da pele (RSF).

## 4 METODOLOGIA

### 4.2 Extração do LCC natural

Para a extração do LCC Natural, as castanhas de caju foram primeiramente biseccionadas e depois as amêndoas foram removidas. As cascas (90,0 g) foram imersas em um becker de 2 litros contendo um litro de acetato de etila e aquecidos a 75 ° C durante 3 horas. Após filtração, o extrato foi concentrado num rotaevaporador, obtendo-se uma massa final de LCC natural de 31,0 gramas (rendimento de 34%) (LOMONACO *et al.*, 2009).

### 4.3 Separação dos constituintes majoritários do LCC técnico: cardanol e cardol, em suas formas saturadas e insaturadas.

Para o isolamento dos compostos saturados, o LCC técnico (20,0 g) foi previamente hidrogenado. A separação de cardanol e cardol a partir do LCC técnico foi de acordo com a metodologia utilizada por Lomonaco et al, utilizando como técnica a cromatografia em coluna. O LCC técnico empregado nos experimentos foi fornecido pela Amêndoas do Brasil empresa Ltda e foi utilizado sem qualquer tratamento prévio. Para a separação destes constituintes, 30 g de LCC técnico foram pesados e transferidos para uma coluna cromatográfica de 60 cm de comprimento x 6 cm de diâmetro, utilizando sílica como fase estacionária. Para a fase móvel, utilizou-se misturas de solventes de hexano: acetato de etila, iniciando com a proporção 90: 10 e posteriormente aumentando a polaridade para 70:30. Após separação, as frações contendo cardanol, após serem analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), foram unidas e concentradas em um rotaevaporador, proporcionando uma recuperação de 21 g de Cardanol (70% de rendimento). Em seguida, as frações contendo cardol foram analisadas por CCD, reunidas e rotaevaporadas sob pressão reduzida. Neste processo foram obtidos 3 g de cardol que representam um rendimento de 10% (LOMONACO *et al.*, 2009).

### 4.4 Caracterização do lcc e seus constituintes

#### 4.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear AVANCE DRX 500 BRUKER, operando a 500 MHz. O solvente utilizado para as diluições das amostras foi acetona delterada ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ). Tetrametil silano (TMS) foi utilizado como padrão interno para os experimentos envolvendo RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

#### 4.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Nesse processo foram utilizadas cromatoplasacas de alumínio (*Thin Layer Chromatography*) TCL ALUMINUM SHEETS SILICA GEL-60 F254 MERCK 20x20cm, as quais foram reveladas em solução de vanilina.

#### 4.4.3 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM)

As análises de CG/MS foram obtidos através de um cromatógrafo CG-MS-QP 2010 SHIMADZU, equipado com uma coluna DB-5 (5% fenil-metilpolisiloxano) de 20 m de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno e 0,4  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. O volume injetado de cada amostra foi de aproximadamente 1  $\mu\text{L}$ , o gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A pressão total foi de 58 Kpa o fluxo total foi de 87,4 mL/min e a razão de split foi de 100. A temperatura da fonte de íons foi de 230°C, a temperatura de interface foi de 300°C e a razão de detecção de massa foi de 18-800.

### 4.5 Metodologia para atividade antioxidante na formulação

#### 4.5.1 Formulação de óleo preventivo para escaras

A solução oleosa, foi obtida pelo processo de solubilização dos componentes, seguindo uma ordem previamente estudada e posteriormente estabelecida por uma Ficha de Produção (Tabela 6). O processo de preparo consistiu na dissolução dos óleos, podendo conter apenas um ou associação dos seguintes componentes: óleo de rosa mosqueta, óleo de amêndoas doces, óleo de semente de uva, óleo de girassol, óleo de abacate, óleo de macadâmia, óleo de jojoba, óleo de cenoura, óleo de buriti, óleo de pequi, manteiga de karité, óleo de andiroba e óleo de coco.

Tabela 6: Componentes e quantidades de composição da solução oleosa preventiva de escaras com cardanol insaturado.

Fase	Componente	Quantidade em % (p/p)
1	Óleo de rosa mosqueta	12,0
2	Óleo de amêndoas doce	15,0
3	Óleo de coco	5,0
4	Óleo de semente de uva	8,0
5	Óleo de Macadâmia	10,0
6	Óleo de girassol q.s.p	100
7	Ativos Fenólicos	0,03-0,1

A concentração dos ativos fenólicos a ser adicionado à solução compreende de 0,03 a 20% para ação bactericida, sendo, preferencialmente, recomendada o uso entre 5 e 10%, e, preferencialmente de 0,03 a 0,1% para atividade de antioxidante.

#### 4.5.2 *Formulação de uma emulsão preventiva para escaras*

A emulsão preventiva de escaras foi obtida pelo processo de emulsificação, as duas fases foram aquecidas separadamente até atingir uma temperatura entre 70°C e 75°C. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa sob agitação a 600 rpm por 30 minutos e foi iniciado o resfriamento sob agitação constante. Na Tabela 7 é possível observar os excipientes utilizados para emulsão de alta viscosidade e na Tabela 8 para formulação da emulsão de média viscosidade. As proporções utilizadas dos ativos fenólicos (cardanol saturado, cardol saturado, cardanol insaturado e cardol insaturado) para atividade antioxidante variaram de 0,03 a 0,1% e para atividade bactericida variou 0,03 a 20%.

Tabela 7: Componentes e quantidades de composição da emulsão de alta viscosidade (creme) preventiva de escaras com cardanol insaturado.

Fase	Componente	Quantidade em % (p/p)
------	------------	--------------------------

Oleosa	Base auto emulsionante não iônica (polawax NF)	12,0
	Óleo de girassol	5,0
	Óleo de abacate	8,0
	Miristato de isopropila	3,0
	Cardanol insaturado	0,05
Aquosa	EDTA	0,2
	Glicerina	3,0
	Propilenoglicol	2,0
	Água qsp	100
	Solução de parabenos 20%	0,5

Tabela 8: Componentes e quantidades de composição da emulsão de média viscosidade (loção) preventiva de escaras com cardanol insaturado.

Fase	Componente	Quantidade em % (p/p)
Oleosa	Base auto emulsionante não iônica (polawax NF)	8,0
	Óleo de girassol	5,0
	Óleo de semente de uva	8,0
	Cardanol saturado	0,05
Aquosa	EDTA	0,2
	Propilenoglicol	5,0
	Água qsp	100
	Solução de parabenos 20%	0,5

#### 4.5.3 Método 2,2 difenil-picriltrazina (DPPH)

Esse método tem como fundamento a captura dos radicais livres do DPPH pelas espécies antioxidantes. Esse radical absorve em  $\lambda=517$  nm e à medida que a sua absorbância



diminui, maior será a atividade antioxidante da substância no composto. As soluções foram avaliadas quanto suas atividades antioxidantes pelo uso do método espectrofotométrico, utilizando este radical estável, sendo pesadas e dispersas em álcool etílico P.A., visando obter misturas de concentração de 20 mg/mL (1:50). Foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante em 2,5 mL de DPPH (100 µM ou 39,4 µg/mL), que foi vigorosamente agitada e incubada ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C). Após esse período, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-VIS) no comprimento de onda λ=517 nm, e a porcentagem de inibição do DPPH foi calculada pela equação (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998):

Equação 1: Equação para cálculo da porcentagem de inibição de DPPH

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = [(ABS_{\text{controle negativo}} - ABS_{\text{amostra}}) * 100] / ABS_{\text{controle negativo}}$$

## 4.6 Metodologias para atividade bactericida

### 4.6.1 Difusão em ágar

Para a verificação da atividade antimicrobiana das formulações, foi seguida a metodologia de Mahata (2014). Foram utilizadas três bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Esses micro-organismos foram reativados a partir de culturas estocadas em meio ao caldo *brain heart infusion* (BHI) por 24 horas a 37°C, retirando-se duas alçadas de cada micro-organismo e transferindo para tubos contendo 10 mL de meio BHI esterilizado.

Posteriormente, foi realizada a cultura em ágar BHI por 24 horas a 37 °C, utilizando a técnica de espalhamento por superfície, pipetando 100 µL dos tubos com os microrganismos reativados anteriormente e espalhando com a alça de Drigalsky sobre a superfície do ágar. Todas as cepas foram estocadas em ágar BHI sob refrigeração, de forma a permanecerem inalteradas em todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

Após a reativação dos microrganismos foram aplicados 10 µL da solução oleosa nas placas de Petri previamente inoculadas. Após a incubação em estufa a 37°C por 24 horas, a

atividade inibitória foi avaliada com base na zona clara em torno das placas. A formulação oleosa sem a presença dos bioativos foi utilizada como controle positivo. (MAHATA *et al.*, 2014)

#### 4.7 Metodologias para atividade repelente

##### 4.7.1 *Formulação do hidratante com atividade repelente*

Foi formulado um hidratante à base de álcool cetosteárico e polisorbato (POLAWAX), propilenoglicol, cetiol, vaselina líquida e derivados de biomassa regional, mais precisamente o Líquido da Casca da Castanha de Caju – LCC (Técnico e Natural) e seus principais constituintes (cardol e cardanol) para o combate ao mosquito *Aedes aegypti* e as proporções estão dispostas na Tabela 9.

Tabela 9: Composição dos componentes para a formulação de uma emulsão com ação de repelência (LCC natural).

Composição do produtos	Porcentagem	Função	Fase
1 - POLAWAX (Álcool cetostearílico e polisorbato)	10%	Cera auto-emulsionante não iônica	Fase oleosa
2-PROPILENOGLICOL	2%	Umectante	Fase aquosa
3- VASELINA LÍQUIDA (Petrolato líquido)	10%	Emoliente	Fase oleosa
4- SOLUÇÃO DE PARABENOS 20%	1%	Conservante	Fase aquosa
5 - CETIOL HE (Cocoato de glicerila PEG – 7)	3%	Umectante	Fase aquosa
6- PRODUTOS COM ATIVIDADE BIOATIVAS	0,5 - 1,0%	Ativo	Fase complementar
7- SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	q.s	Ajuste de Ph	Fase complementar
8- ÁGUA PURIFICADA q.s.p	Q.S.P 100%	Veículo	Fase aquosa

Os hidratantes foram formulados pelo processo de emulsificação convencional. Separadamente, a fase oleosa foi solubilizada e aquecida a  $75\pm 2^{\circ}\text{C}$  e A fase aquosa, composta de água recém destilada, foi aquecida à mesma temperatura. Após a etapa de aquecimento, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a oleosa - sob agitação constante a 650 rpm,

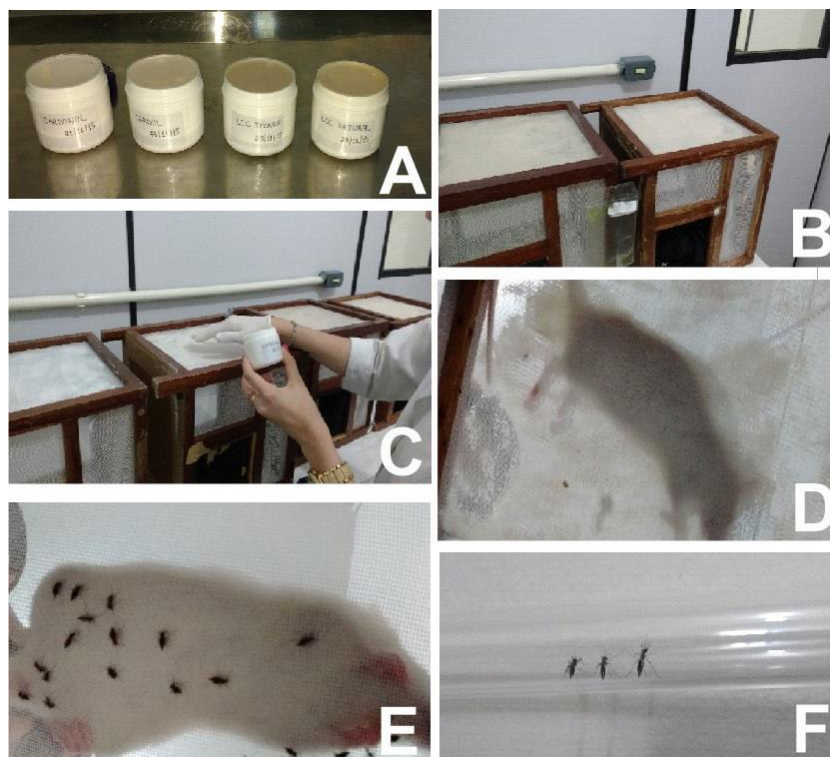
utilizando um agitador mecânico (Fisaton-Mod 713). Quando a temperatura atingiu 40°C, foi adicionada a fase complementar. A agitação foi mantida até alcançar a temperatura de 25±2°C.

#### 4.7.2 *Ensaio de repelência em ratos mus musculus*

Os testes para determinar a atividade repelente foram realizados no Laboratório de Análise de Culicídeos situado no Núcleo de Vetores e Endemias (NUVET) da cidade de Fortaleza - Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 27 °C ± 2 °C, umidade relativa de 70 a 80 % e ocorreram no período diurno. Foram utilizadas 5 gaiolas de madeira medindo 40 cm x 40 cm protegidas com telas nas suas laterais e para cada ensaio foram selecionados 50 mosquitos fêmeas da espécie *Aedes aegypti* de Geração 1, cepa Rockefeller, copuladas, sem nenhuma alimentação anterior mantidos sob condições de laboratório e portanto, livres de qualquer contaminação por vírus.

O processo de anestesia dos ratos (*mus musculus*) atendeu à Comissão de Ética para uso de animais em experimentos de número 1684504. Para a realização dos ensaios escolheu-se em cada gaiola um dos lados (Figura 16B) que foi impregnado com 10 g dos hidratantes já preparados (Figura 16C). Após impregnação, ratos brancos de 300 g entre fêmeas e machos, já anestesiados, foram dispostos durante 30 minutos (Figura 16D) seguindo o procedimento de alimentação sanguínea do NUVET. A atividade de repelência foi observada através da aproximação dos mosquitos fêmeas nos ratos do teste controle (Figura 16E). O tempo de exposição dos ratos foi definido de acordo com a metodologia utilizada por Andrade e colaboradores (2011). A verificação da captação de sangue foi feita pela contagem do número das fêmeas alimentadas retiradas das gaiolas através de um equipamento específico (Figura 16F)

Figura 16: Etapas realizadas durante os ensaios de atividade repelente em ratos brancos



Fonte: autoria própria.

#### 4.7.3 Ensaios de repelência em humanos

Os testes de repelentes em seres humanos é o método de escolha, uma vez que utiliza o próprio usuário do repelente no processo de teste e seus resultados são relevantes para as condições reais de utilização. Os testes devem ser realizados em voluntários humanos adultos que podem ser escolhidos entre candidatos que exibem leve ou nenhuma sensibilidade a picadas de mosquito (OMS,1996).

Na preparação para os ensaios de laboratório, a região da mão em estudo foi lavada com sabão neutro e enxaguada com água, depois lavada com uma solução de 70 % de etanol em água e secada com uma toalha descartável. Vários fatores podem alterar a atração dos vetores entre eles cheiro, portanto os 40 voluntários foram selecionados para os testes e foram orientados a evitar o uso de perfumes bem como outros repelentes, durante 12 horas, antes e durante os ensaios.

Os testes em voluntários para determinar a atividade repelente foram autorizados pelo comitê de ética com o número do parecer 1684504. Foram realizados no Laboratório de Análise de Culicídeos situado no Núcleo de Vetores e Endemias – NUVET. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 70 a 80 % e ocorreram no período diurno. Foram mantidas as mesmas condições de uso dos mosquitos nos testes anteriores para uso em animal. Para a realização dos ensaios, as mãos dos voluntários foram impregnadas com hidratante formulado  $0,8\text{g/m}^2$  de pele e durante 30 minutos foram mantidas dentro das gaiolas contendo 50 mosquitos fêmeas da espécie *Aedes aegypti*. A avaliação da atividade repelente ocorreu através da contagem do número de mosquitos alimentados em relação à quantidade total. O teste controle foi realizado com um hidratante sem a presença dos ativos e com repelente comercial, O DEET ( N , N-dietil - 3 - metilbenzamida). A repelência (R) foi calculada usando a fórmula:

Equação 2: porcentagem de repelência

$$R (\%) = (C-T/C) \times 100\%$$

onde C é o número de picadas de mosquito nos ensaios de controle e T o número de picadas nos ensaios em tratamento (YOON *et al.*, 2015; WHO, 1996 )

#### 4.7.4 Estudo da reologia dos hidratantes

A viscosidade aparente eo perfil reológico foram avaliados utilizando um viscosímetro rotacional Brookfield R / S-CC + equipado com fuso V3 40/20. O pH foi controlado por um método potenciométrico (medidor de pH Metrohm® pH Meter 744, eletrodo de vidro)

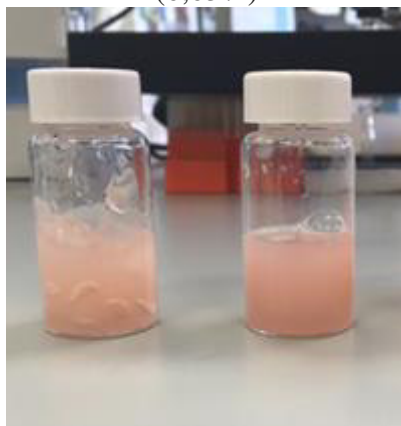
### 4.8 Metodologia para atividade antioxidante na pele de porco

#### 4.8.1 Formulação do sistema lipídico

Bicosomes com cardanol foram preparados dispersando 80% p / v de Lipoid S-100 em clorofórmio. O clorofórmio foi removido utilizando um rotaevaporador até se obter uma película lipídica. Posteriormente, a película foi hidratada utilizando as bicelas previamente formadas com cardanol (RUBIO *et al.*, 2012). A concentração total de lípidos nos bicosomes foi de 20% p / v e a concentração de cardanol foi de 10 mg / mL.

Para ensaios *in vitro*, 3% do sistema bicosome com cardanol foi incorporado numa formulação em gel e para realizar testes e comparar a eficácia do sistema bicosome, a mesma concentração de cardanol puro (0,03%) foi incorporada também em gel (Figura 17).

Figura 17: Formulações de gel base com o cardanol associado ao bicosome(3%) e cardanol (0,03%)



Fonte: Autoria própria

#### 4.8.2 Caracterização do sistema lipídico

##### 4.8.2.1 Aparência e odor

Este teste foi realizado subjetivamente comparando as amostras das formulações e é definida como a amostra de referência aquela mantida sob refrigeração 4°C.

Para a avaliação da aparência foram observados níveis de alteração que foram classificados em: (I) normal, sem alteração; (II) ligeiramente separado; ligeiramente precipitado ou ligeiramente turvo e (III); Precipitado ou turvo (IV). O grau de odor observado na formulação foi avaliado de acordo com os seguintes critérios: (I) normal sem alteração; (II) ligeiramente modificado; (III) e alterado (IV) fortemente modificado (ANVISA,2004).

##### 4.8.2.2 Medida de cor

A estabilidade da coloração da formulação (bicosome com cardanol) foi calculada de acordo com o tempo. Foram medidas utilizando um espectrofotômetro (Macbeth Color-eye 3000, Neurtek Instruments, Espanha). As medidas de cor foram obtidas utilizando o modelo CIE L \* a \* b, modelo que corresponde à percepção humana da cor (TASI,2004).

Onde:

L \* = Brilho

A \* = vermelho / verde (+ a indica vermelho e verde indica -a)

B \* = coordenada amarelo / azul (+ b indica amarelo e azul indica -b)

A diferença de cor total ( $\Delta E$ ) foi calculada através da avaliação das alterações nas leituras de L /, a /, b /. Estas leituras foram realizadas em diferentes épocas de estabilidade utilizando um espectrocolorímetro. A equação 3 usada para calcular a diferença de cor total foi:

Equação 3: Calculo da diferença de coloração

$$\Delta E = [ (\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 ]^{1/2}$$

Sendo o  $\Delta E$  é o valor que define a diferença total da cor da amostra em relação ao padrão.  $\Delta L$  é considerada a diferença de luminosidade,  $\Delta a$  diferença de coloração das cores primárias vermelho e verde e,  $\Delta b$  diferença de coloração das cores primárias amarelo e azul.

#### **4.8.2.3 Medida de viscosidade**

A viscosidade é a razão entre a tensão de cisalhamento aplicada e a taxa de deformação observada. O aparelho utilizado foi um viscosímetro de rotação, Visco Alpha L Series (Fungilab S.A.) com um adaptador de pequeno volume (10 ml) e TL6 como fuso. O valor de viscosidade obtido foi expresso em mPa • s e a medida foi feita nos tempos 0,3, 6, 20, 60 e 100 rpm.

#### **4.8.2.4 Determinação de pH**

pH da formulação (bicosoma com cardanol) foi avaliado utilizando um medidor de pH digital com contra-eletrodo de vidro Thermo Scientific, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0, 7,0 e 10,0 à temperatura ambiente.



#### 4.8.2.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é responsável por gerar algumas espécies de malonaldeído (MDA), esse participa diretamente de uma reação nucleofílica com ácido tiobarbitúrico (TBAARS) para gerar um produto (dimetilacetal) que possui fluorescência (1: 2 MDA: TBAARS), quando submetido a pH baixo e a alta temperatura. Foi possível quantificar esse produto utilizando espectrofotometria a 534 nm, e a absorbância foi expressa como MDA: TBAARS mM utilizando uma curva padrão para o complexo MDA: TBAARS puro. A curva de calibração foi obtida utilizando MDA em diferentes concentrações (0-30 mM) e essa concentração obtida por MDA: TBAARS é diretamente proporcional aos peróxidos lipídicos presentes na amostra.

Foram adicionados (0,5 mL) do sistema lipídico (bicosome contendo cardanol) a alíquotas (1 mL) de uma solução constituída por 0,4% de TBAARS e 15% de ácido tricloroacético (TCA) em 100 mL de uma solução de HCl (0,25 M). Em seguida, foi incubada em um aquecedor a 100 °C durante 1 h. Após a reação estar completa, as amostras foram filtradas e medidas utilizando um espectrofotômetro (Varian Cary 300 Bio UV-VIS Spectrophotometer, EUA). A concentração correspondente do complexo MDA: TBAARS foi calculada a partir da média de absorvância a 534 nm (FERNANDEZ *et al.*, 2015).

#### 4.8.2.6 Espalhamento Dinâmico da Luz (DSL)

O diâmetro hidrodinâmico (HD) e o índice de polidispersidade (PI) foram determinados por meio de DLS usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Systems, Southborough, MA) que fornece as curvas de distribuição de tamanho. O DLS mede o coeficiente de auto-difusão das partículas através do movimento browniano. A relação entre o tamanho de uma partícula e o seu coeficiente de auto-difusão é definida pela equação de Stokes-Einstein:

Equação 4: Cálculo do diâmetro hidrodinâmico

$$HD = kT / 3\pi\eta D$$

Onde  $H_D$  é o diâmetro hidrodinâmico,  $D$  é o coeficiente de difusão translacional,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\eta$  é a viscosidade. A detecção da luz dispersa foi realizada num ângulo de  $173^\circ$  e a medição foi realizada à temperatura ambiente. O tratamento do sinal foi elaborado utilizando o software fornecido pela Malvern Instruments (FERNANDEZ *et al.*, 2015).

#### **4.8.2.7 Conteúdo de cardanol**

Para realizar a dosagem de cardanol, fez-se uma diluição (1:10) do bicosome contendo cardanol, em etanol, e a leitura foi efetuada imediatamente no espectrofotômetro ultravioleta-visível (Varian's Cary 300 Bio UV-VIS Spectrophotometer, EUA) a 295 nm. A curva de calibração externa foi construída com seis pontos de concentração variando entre 5 e 30mg / ml de cardanol (COSTA *et al.*, 2005).

#### **4.8.3 Estabilidade cardanol a radiação Ultravioleta (uv)**

As amostras de bicosomes (1% de cardanol) e Cardanol em etanol (1%) foram submetidas a espectroscopia de radiação eletromagnética de 310 nm a 800 nm (UVA de 310-400 nm, VIS de 400-760 nm e uma pequena região de IRA de 760 a 800 nm). A radiação foi realizada utilizando uma fonte de luz que simulava a radiação solar (Suntest CPS +, Atlas, EUA) a  $500 \text{ W m}^2$  por 90 min, 3h, 6h, 15h e 24h ( $90$  e  $360 \text{ J cm}^2$ , respectivamente).

De acordo com o guia de radiação solar de Catalunha essa intensidade de radiação é equivalente ao dobro de exposição de radiação comum no mês de junho na região da Catalunha, Espanha (FERNANDEZ *et al.*, 2015).

Em seguida, para quantificar o cardanol não degradado utilizou-se um espectrofotômetro ultravioleta visível (Espectrofotômetro Cary 300 Bio UV-VIS da Varian, EUA) a 295 nm. A mesma metodologia utilizada para avaliar o conteúdo de cardanol (COSTA *et al.*, 2005).

#### **4.8.4 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)**

##### **4.8.4.1 Preparo da pele**

A pele de porco foi retirada do dorso de porcos brancos (Landrace, 35 kg) e foram obtidas da Universidade Autonoma de Barcelona, Espanha. Para separar a derme da epiderme, a pele foi colocada em água a 65 °C durante 2-5 min, e a epiderme foi raspada em folhas. As folhas epidérmicas foram cortadas em pedaços cada uma com uma área de 28 mm<sup>2</sup>. Os pedaços de epiderme foram dispostos em papel de filtro.

Figura 18: Procedimento de separação do extrato córneo da derme.



Fonte: Autoria própria

Em seguida, adicionou-se 10 µl das amostras em pedaços separados de epiderme. As amostras foram:

- Gel com Bicosome-cardanol a 3%
- Gel com Cardanol 0,03%
- Gel com 3% de Bicosome
- Água (Pele Nativa)

Eles foram aplicados em três pedaços de pele (apenas epiderme). Após o tratamento a pele foi deixada em repouso protegida da luz durante 18 horas, à temperatura ambiente e quando o tempo de incubação terminou a pele foi lavada com água destilada e seca com papel. Em seguida, adicionou-se 20 µl de N-óxido de 5,5 dimetil-1-pirrolina (DMPO) a 5 M em tampão fosfato salina (PBS) à superfície da pele durante 20 minutos, o DMPO foi removido

da pele e as amostras foram lavadas com água destilada e colocadas em uma célula de Quatzo (COCERA *et al.*, 2011).

#### **4.8.4.2 Medidas spin-trap**

As amostras de pele de porco que foram tratadas com as formulações e a pele nativa foram colocadas na célula de tecido de quartzo do espectrômetro EPR (espectrômetro EMX-Plus 10/12 Bruker Bio Spin), com uma ponte de microondas de banda X (9 GHz) (EMX Premium X), imã de 10 polegadas (ER073) com uma fonte de alimentação de 12 kW (ER083).

A medição é realizada antes, durante a irradiação de 20 min e após a irradiação. A irradiação foi realizada com uma lâmpada de 500 mercury de pressão which (Oriol) ligada ao espectrômetro EPR a uma distância de 50 cm. As amostras de pele foram expostas a uma densidade de potência de  $147,9 \text{ Wm}^{-2}$ , correspondendo a 12,1% de UV-A, 5,9% de UV-B, 3,5% de UV-C, 39,9% de visível e 38,5% de radiação infravermelha. A radiação infravermelha foi bloqueada com um filtro de papel, assim, apenas UV e luz visível chegou a amostras de pele. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente e a temperatura na cavidade EPR foi medida utilizando um termômetro a laser T-637 (Crison Instruments, Alella, Barcelona) com imersão de sonda Pt-100 (Cat. no: 30.900.971).

Para verificar a estabilidade da pele, uma amostra com DMPO foi colocada durante 1 h na cavidade do EPR nas condições descritas, e o sinal de EPR durante este período foi avaliado. Dado que não foram observadas alterações na estrutura e na composição dos espectros registados durante 1 h, assume-se a estabilidade da pele nas condições experimentais.

A partir dos espectros obtidos, é possível calcular a segunda integração do sinal. Este valor de integração está diretamente correlacionado com a proporção de radicais livres formados na pele. Neste trabalho, o segundo valor de integração foi utilizado para comparar o efeito de eliminação dos diferentes sistemas lipídicos. A razão entre o número de radicais livres (RSF) gerados na pele desprotegida e a pele protegida e os valores integrais permitiram calcular o fator de proteção radical da pele (RSF, equação (5)) e a eficácia de eliminação (E, Equação (4)) (JURKOVLC *et al.*, 2003; HERRLING; JUNG, 2012).

Equação 5: Cálculo da razão entre os números de radicais livres gerados na nativa sobre a pele tratada

$$\text{RSF} = \frac{(\text{segundo valor integral})_{\text{pele nativa}}}{(\text{segundo valor integral})_{\text{pele tratada}}}$$

$\text{RSF} > 1 = \text{Proteção UV}$

Equação 6: Cálculo da eficácia de eliminação dos radicais livres

$$E = \frac{(\text{segundo valor integral})_{\text{pele nativa}} - (\text{segundo valor integral})_{\text{pele tratada}}}{(\text{segundo valor integral})_{\text{pele nativa}}}$$

$E < 1 = \text{Proteção UV}$

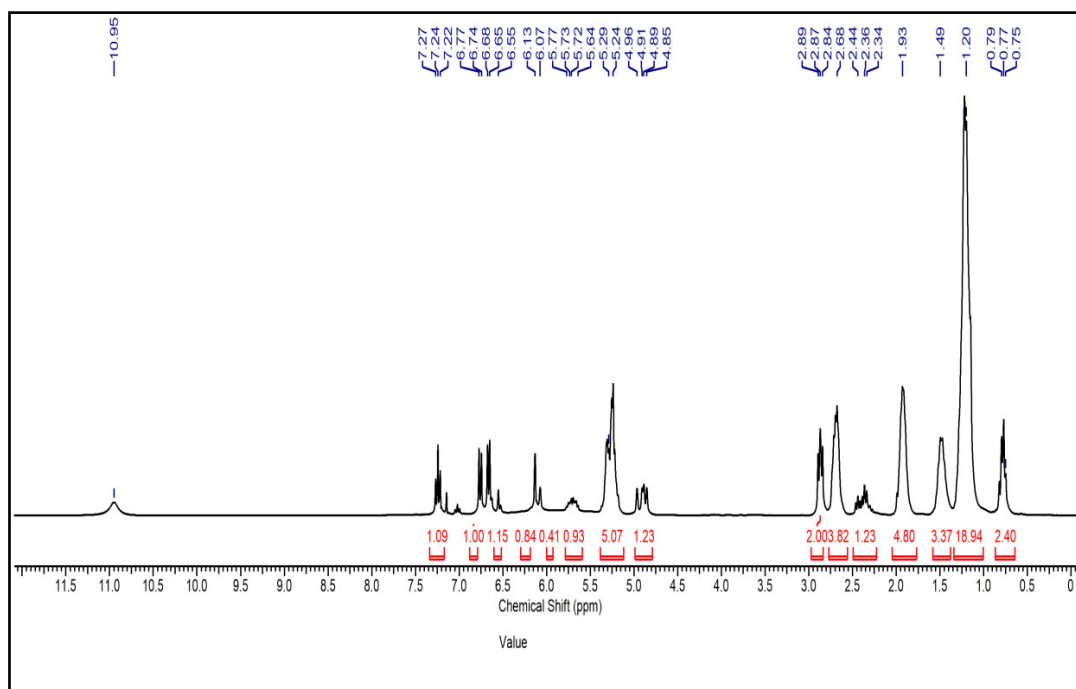
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2 Caracterização dos constituintes

#### 5.2.1 Caracterização do LCC técnico e do LCC natural

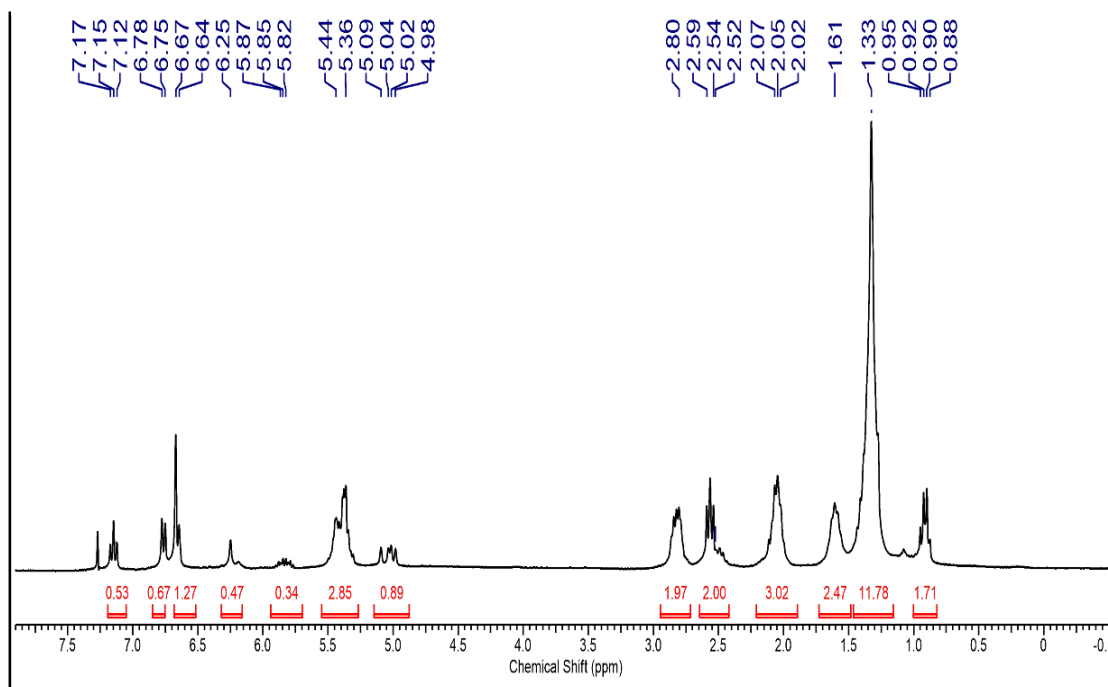
Para caracterização do LCC (Técnico e Natural) foi utilizado a técnica de RMN  $^1\text{H}$ . Foi possível identificar o surgimento do sinal em 10,95ppm (que está ausente no LCC técnico - Figura 20) , esse sinal é característico da presença do hidrogênio ácido. Observando a Figura 19, foi possível evidenciar os sinais na região entre 6,65 e 7,27 ppm que correspondem aos hidrogênios aromáticos. Os multipletos observados na região entre 2,89 e 2,87 ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel benzênico. Os hidrogênio metilênicos foram observados no sinal em 1,20 ppm referente a cadeia lateral e além disso os hidrogênio dos grupamentos metilas terminais se apresentaram na forma de um tripleto sobreposto em 0,75 e 0,79 ppm. O tripleto na região entre 4,85 e 4,91 foi atribuído aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral.

Figura 19: Ressonância de hidrogênio do LCC natural



Fonte: Elaborado pela autor

Figura 20: Ressonância de hidrogênio do LCC Técnico



Fonte: Elaborado pela autor

Para o LCC técnico, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 20), apresentou sinais de hidrogênio aromáticos entre 6,64 a 7,17 ppm. Os sinais evidenciados entre 4,98 a 5,87 ppm são referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral. Também foi possível observar que houve a presença do multiplete em 2,80 ppm que foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos situados entre os átomos de carbono  $\text{sp}^2$  da cadeia lateral; Os hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel benzênico apresentaram sinais entre 2,52 e 2,59 ppm, já os da cadeia lateral apresentaram sinal em 1,33 ppm. Os sinais encontrados na região entre 0,88 e 0,95 ppm são os hidrogênio do grupo metila terminal.

O LCC técnico foi analisado por CG/MS e o cromatograma está disposto na Figura 21. É possível observar os picos referentes aos seus constituintes e as porcentagens desses constituintes nas amostras (Tabela 10). O pico que contém maior abundância é referente ao cardanol (84,89%), seguido pelo cardol (10,9%) e o 2-metil-cardol (4,21%)

Figura 21: Tempos de retenção dos constituintes do LCC técnico

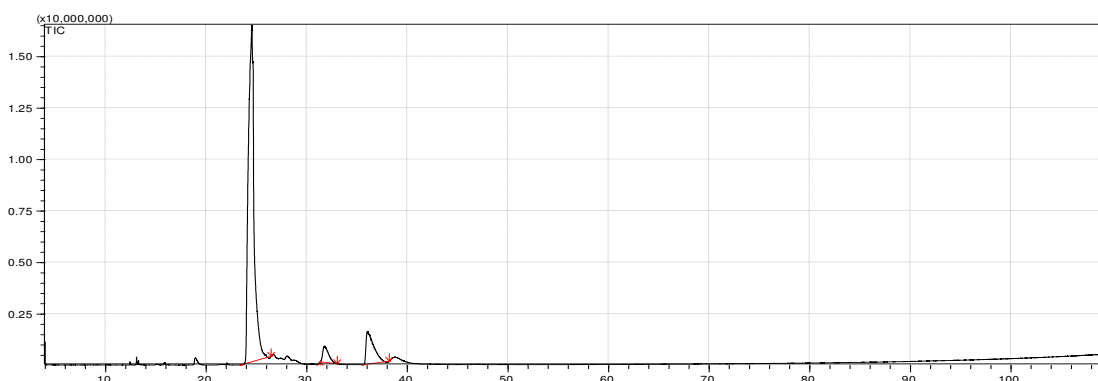


Tabela 10: Porcentagens dos constituintes do LCC técnico

Constituintes do LCC Técnico	Pico	Tempo de retenção	Porcentagem dos constituintes
Cardanol	1	24.550	84,89
2-metil-Cardol	2	31.761	4,21
Cardol	3	36.089	10,90

### 5.2.2 Caracterização do Cardol e Cardanol

Depois do processo de separação e purificação através de uma coluna cromatográfica, os compostos fenólicos (Cardanol e Cardol) tanto nas formas saturadas quanto nas insaturadas foram caracterizados por técnicas convencionais de análise (CG/EM, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ ). Na técnica de RMN os sinais foram atribuídos na numeração que foi apresentada para os átomos de hidrogênio em cada composto presente nos espectros de ressonância magnética nuclear.

As Figuras 22 e 23 evidenciam, respectivamente, os espectros de massa que foram obtidos para os constituintes fenólicos quando estão em suas formas saturadas. Foi possível evidenciar a presença do íon molecular, que de acordo com a literatura para ambos apresentou razão massa/carga compatível com a massa molecular desses compostos. Para o cardanol saturado o íon molecular evidenciado foi o 304 e para o Cardol saturado 320, confirmando a separação desses compostos.



Figura 22: Espectro de massa do cardanol saturado

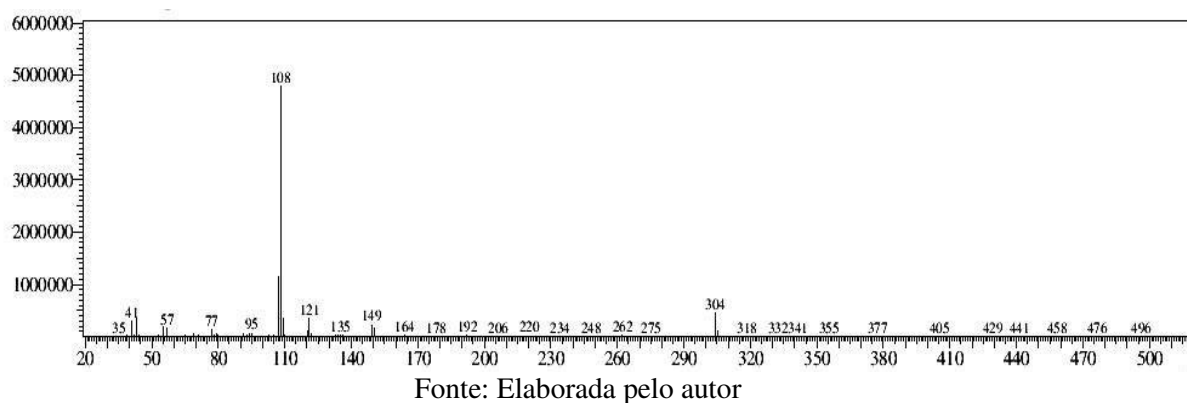
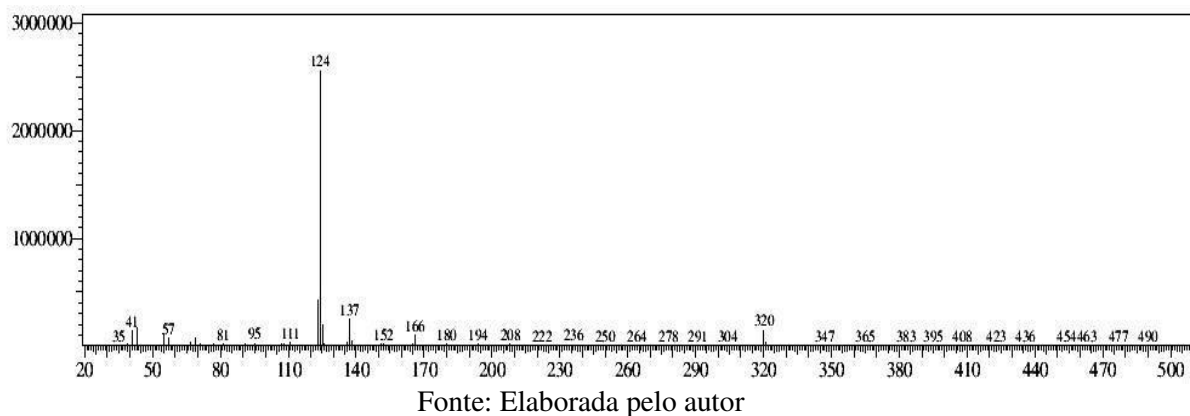


Figura 23: Espectro de massa do cardol saturado



A caracterização dos compostos insaturados também foi realizada e está representada nas Figuras 24 e 25. Da mesma forma da análise dos compostos fenólicos saturados foi possível visualizar o íon molecular que se mostrou compatível com a razão massa/carga. Respectivamente o cardanol insaturado e Cardol insaturado apresentaram massa molecular de 302 e 316, as quais estão relacionadas com a presença predominante de compostos com uma dupla ligação. Dessa forma, esses resultados mostram que o processo de separação e síntese dos compostos insaturados foi também eficiente.

Figura 24: Espectro de massa do cardanol monoinsaturado

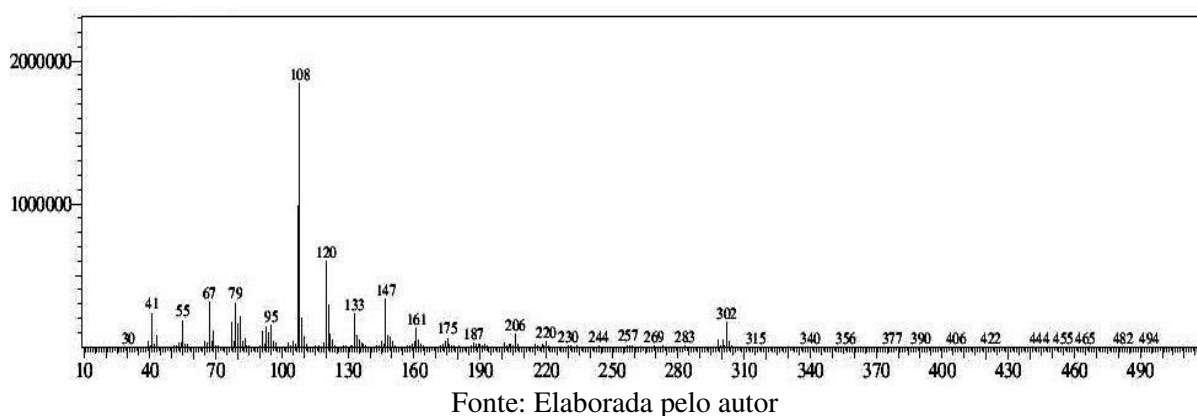
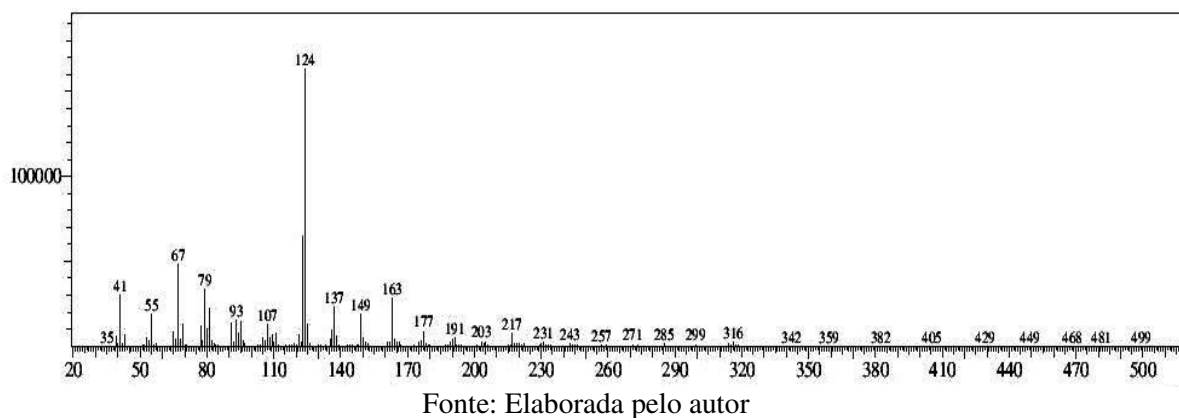


Figura 25: Espectro de massa do cardol monoinsaturado



Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio das amostras de cardanol saturado e cardol saturado estão representados nas Figuras 26 e 27.

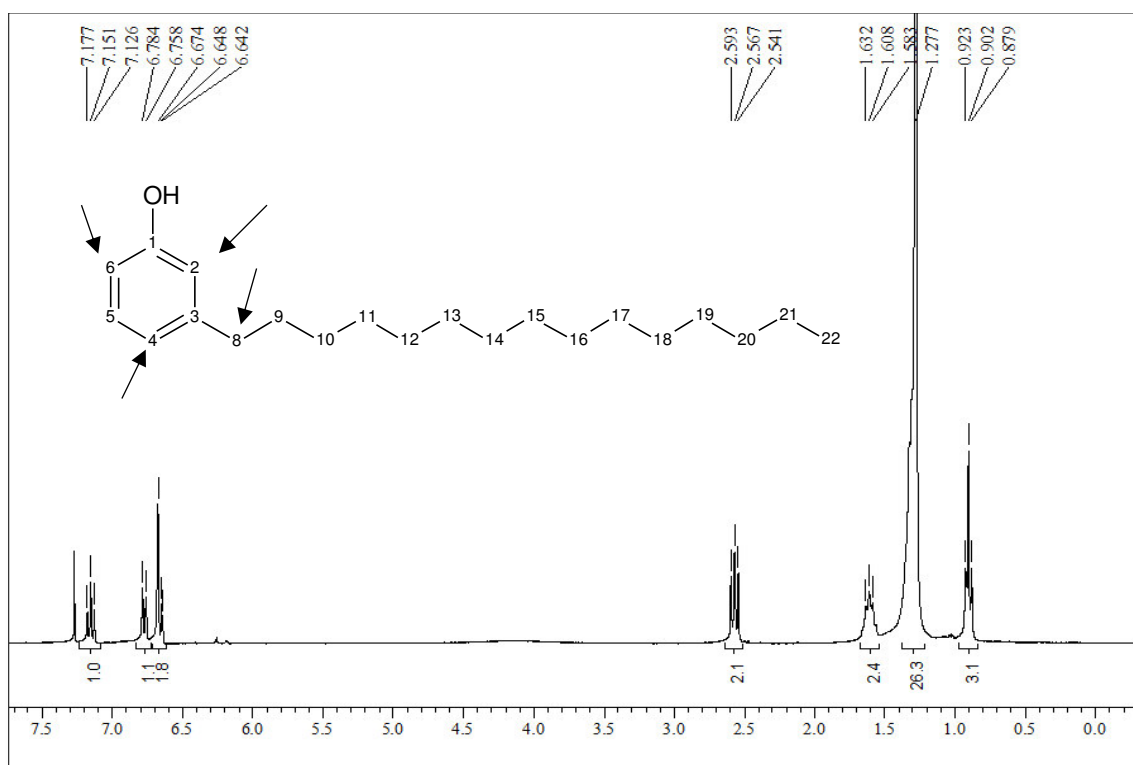
Foi possível evidenciar sinais característicos, em ambos compostos, de deslocamento químico próximo a 0,8 e 0,9 ppm, os quais são atribuídos aos hidrogênios do grupamento ( $\text{CH}_3$ ) terminal da cadeia alifática (H-22), esses se acoplam com os hidrogênios  $\text{CH}_2$  dessa mesma cadeia (H-21) gerando tripletos. Um multipletto (H-9 a H-21) pode ser observado entre os sinais 1,0 e 2,0 ppm referentes aos hidrogênios do grupo  $\text{CH}_2$  da cadeia alifática e em 2,5 e 3,0 ppm é referente aos hidrogênios do grupamento  $\text{CH}_2$  ligados ao anel aromático (H-8).

A principal diferença nos espectros de hidrogênio desses compostos está na região característica de hidrogênios aromáticos. Para o cardanol (Figura 26) pode ser observado três sinais; um deles com deslocamento químico próximo a 6,6 ppm (singleto sobreposto a um dubleto) atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos situados nas posições *orto* a hidroxila (H-6 e H-2); o segundo com deslocamento químico próximo a 6,7 ppm (dubleto) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono situado na posição *para* a hidroxila (H-4) e o terceiro com

deslocamento químico próximo a 7,1 ppm (triplete) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono situado na posição *meta* a hidroxila (H-5).

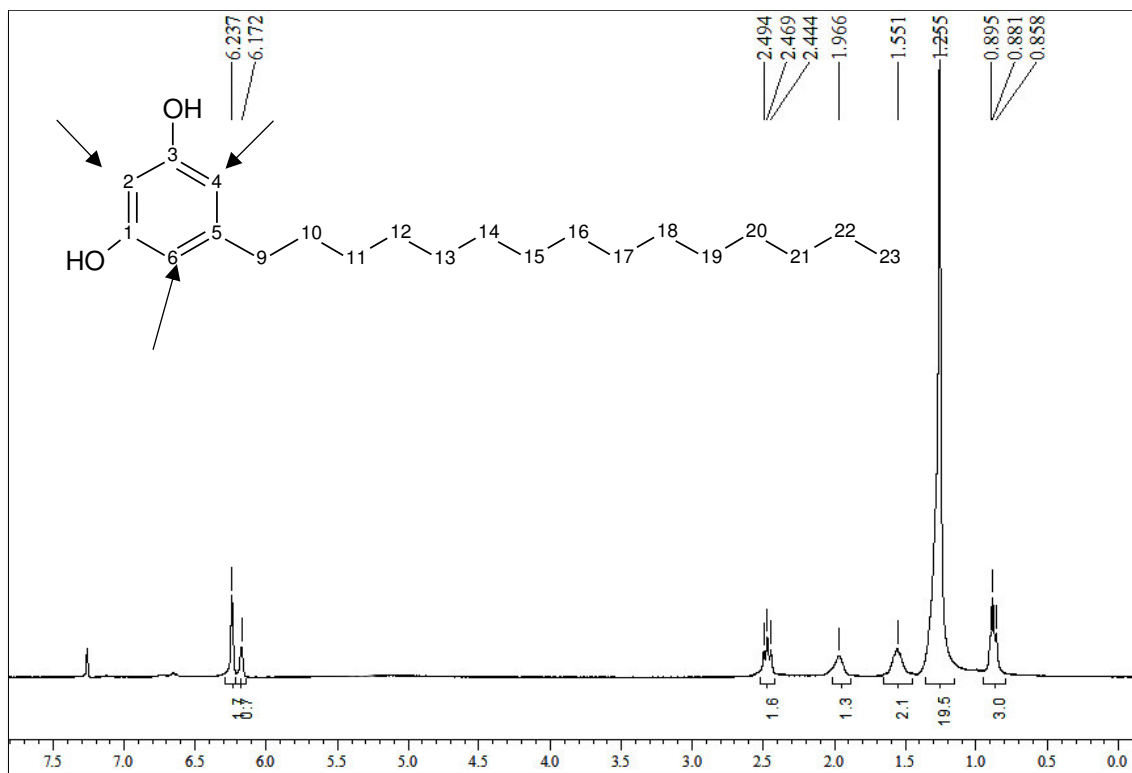
Para o cardol (Figura 27) são observados dois sinais: o primeiro com deslocamento químico próximo a 6,1 ppm atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono situado entre as hidroxilas (H-2) e o segundo com deslocamento químico de 6,2 ppm atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos situados entre as hidroxilas e a cadeia alifática (H-4 e H-6).

Figura 26: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido para o cardanol saturado



Fonte: Elaborada pelo autor

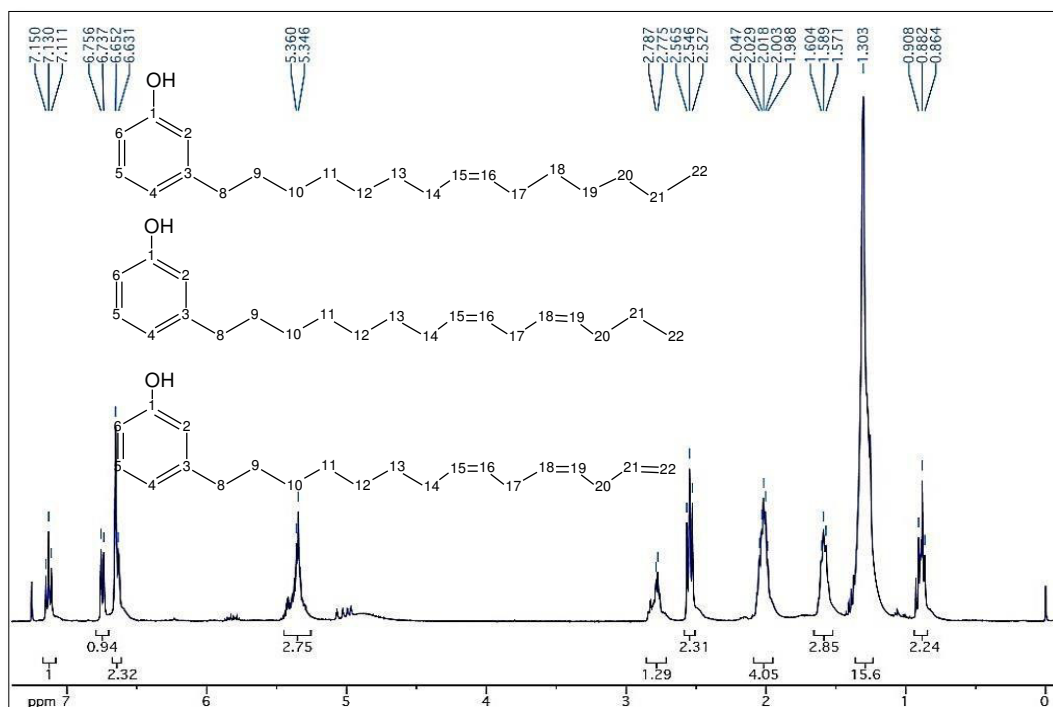
Figura 27: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido para o cardol Saturado



Fonte: Elaborada pelo autor

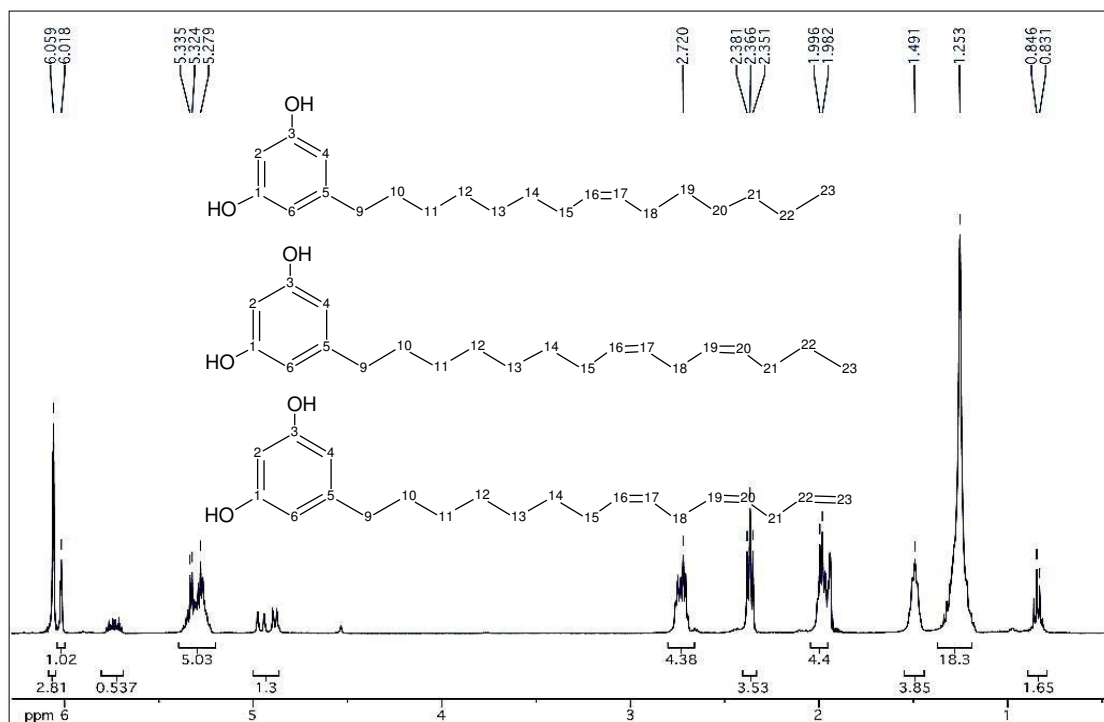
As Figuras 28 e 29 apresentam os espectros de RMN <sup>1</sup>H, obtidos a partir da análise dos compostos fenólicos em suas formas insaturadas, sendo observados conjuntos de sinais semelhantes aos obtidos para os análogos saturados. Nesses espectros, os hidrogênios da cadeia alifática (H-9 a H-22) foram associados aos sinais observados entre 0,8 - 2,7 ppm para o cardanol insaturados e 0,8 - 2,7 ppm para cardol insaturado. A presença das insaturações (H-15, H-16, H-18, H-19, H-21 e H-22) foram confirmadas pela observação dos sinais com deslocamento químico próximo a 5,3 ppm para o cardanol e cardol. Já os sinais entre 6,6 - 7,1 ppm observados no espectro de hidrogênio do cardanol insaturados e 6,0 - 6,1 ppm observados no espectro de hidrogênio do cardol insaturado foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos de cada um desses compostos (H-1 a H-6).

Figura 28: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do cardanol insaturado



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 29: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do cardol insaturado



Fonte: Elaborada pelo autor

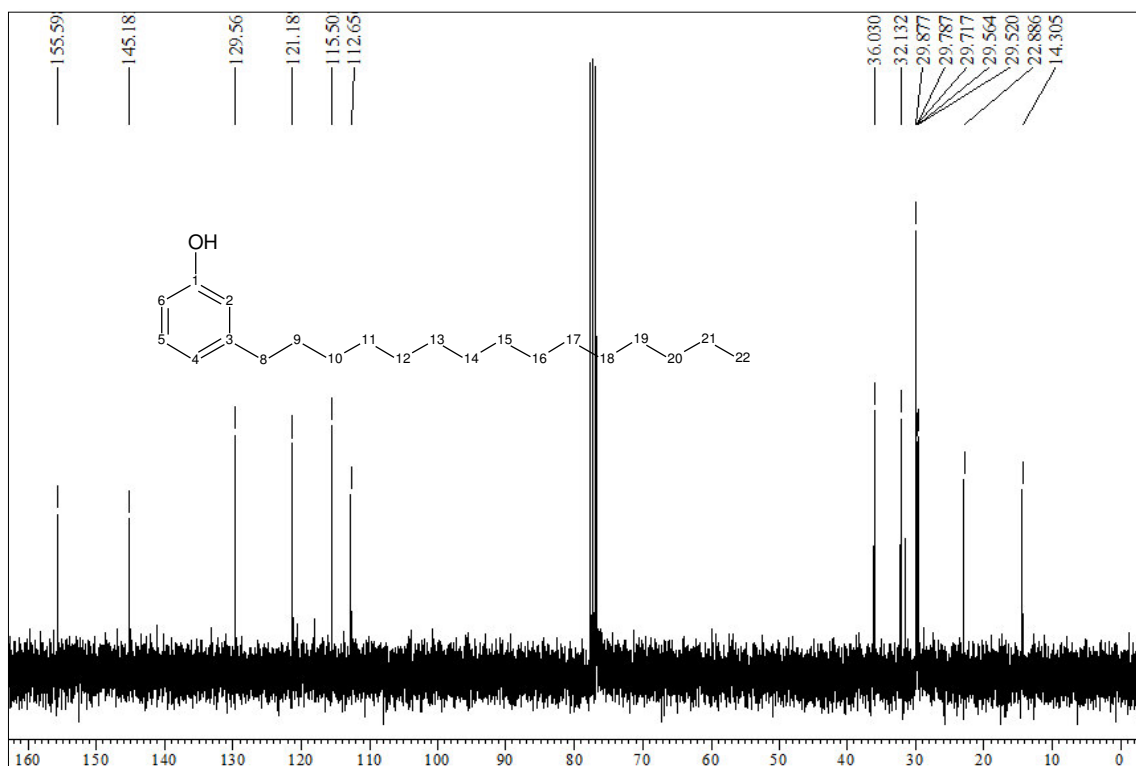
Nas Figuras 30 e 31 são apresentados os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , obtidos respectivamente para cardanol, cardol em suas formas saturadas. Para esses dois compostos foram observados sinais similares com deslocamento químico próximo a 14,4 ppm atribuído ao carbono terminal do grupo  $\text{CH}_3$  da cadeia alifática (C-22) e sinais com deslocamento químico entre 22,8 e 36,6 ppm referentes aos carbonos do grupo  $\text{CH}_2$  dessa mesma cadeia (C-9 a C-21).

As principais diferenças nesses espectros estão nos sinais com deslocamento químico característico de carbonos aromáticos. Para cardanol (Figura 30) foram observados seis sinais (um para cada átomo de carbono do anel aromático) com os quatro sinais com menor deslocamento químico sendo atribuídos aos carbonos hidrogenados, que são mais protegidos que os não hidrogenados.

Considerando o efeito protetor da hidroxila, o primeiro sinal, com deslocamento químico de 112,6 ppm, pode ser atribuído ao carbono situado na posição *orto* a esse grupo, próximo à cadeia alifática (C-2); o segundo, com deslocamento químico de 115,5 ppm, atribuído ao outro átomo de carbono situado na posição *orto* à hidroxila situado do lado oposto da cadeia alifática (C-6) e o terceiro, com deslocamento químico de 121,1 ppm, atribuído ao carbono hidrogenado situado na posição *para* à hidroxila (C-4).

O sinal com deslocamento químico de 129,5 ppm foi atribuído ao carbono hidrogenado situado na posição *meta* à hidroxila (C-5). O sinal com deslocamento químico de 145,1 ppm foi atribuído ao átomo de carbono ligado diretamente à cadeia alifática (C-3). Por fim, o sinal com deslocamento químico de 155,6 ppm atribuído ao carbono ligado diretamente à hidroxila que exerce um efeito retirador de elétrons por indução (C-1).

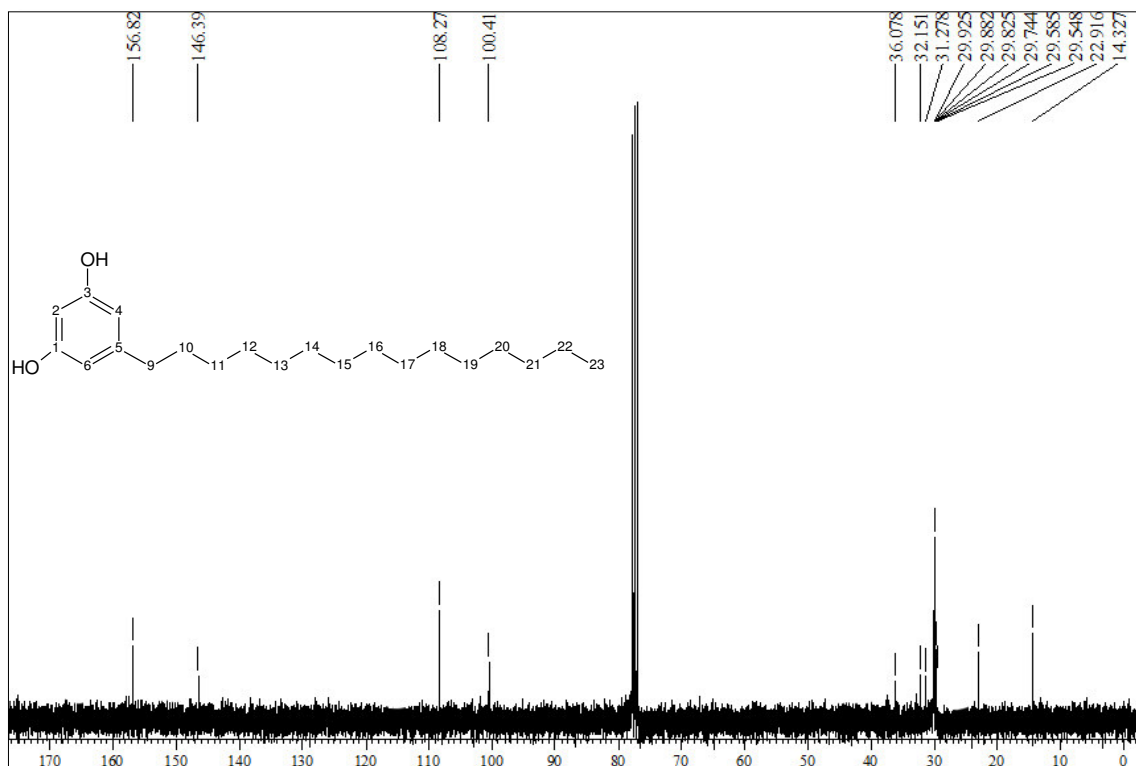
Figura 30 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono obtido para o cardanol saturado



Fonte: Elaborada pelo autor

Para cardol saturado (Figura 31) foram observados quatro sinais: o de menor deslocamento químico ( $\delta$  100,9) foi atribuído ao carbono situado na posição *orto*, entre as hidroxilas, e caracterizado por esse motivo como o carbono mais protegido devido ao efeito protetor conjunto desses substituintes (C-2); o sinal com maior deslocamento químico ( $\delta$  159,3) foi atribuído aos carbonos ligados diretamente a cada uma das hidroxilas e, portanto, mais desprotegidos devido ao efeito indutivo retirador de elétrons desse substituinte (C-1 e C-3); o sinal em 145,8 ppm foi atribuído ao carbono ligado diretamente a cadeia alifática, situado na posição *meta* às duas hidroxilas (C-5) e por esse motivo caracterizado como o segundo mais desprotegido, e, por fim, foi observado um sinal com deslocamento químico próximo a 107,7 ppm referente aos carbonos (hidrogenados) situados na posição *orto* a cada uma das hidroxilas (C-4 e C-6).

Figura 31 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono obtido para o cardol saturado

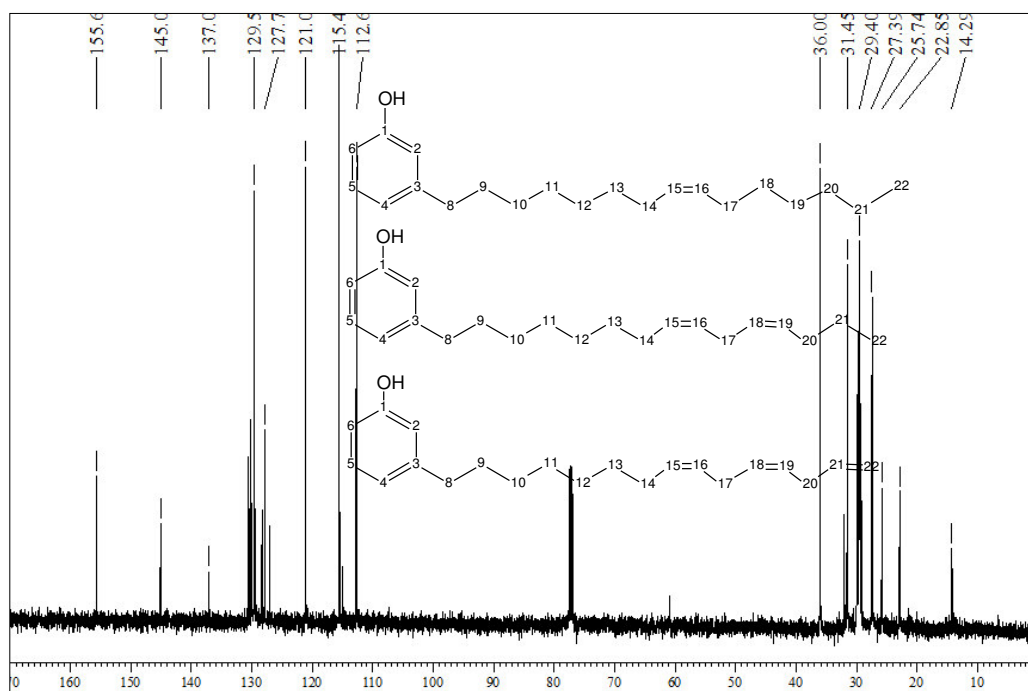


As Figuras 32 e 33 representam os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono  $^{13}\text{C}$ , obtidos para cardanol e cardol em suas formas insaturadas. Nesses espectros foi possível observar dois conjuntos de sinais bem distintos, o primeiro com menor deslocamento químico atribuído aos carbonos que fazem parte da cadeia alifática e o segundo conjunto de sinais, com maior deslocamento químico, atribuído aos carbonos que fazem parte do anel aromático de cada composto.

No espectro de carbono do cardanol insaturado (Figura 32), o conjunto de sinais com menor deslocamento químico foi observado entre 13,6 e 35,9 ppm e no espectro obtido para cardol insaturado esse conjunto de sinais foi observado entre 14,6 e 37,1 ppm. Já o segundo conjunto, em que os sinais foram atribuídos aos carbonos do anel aromático, foram observados entre 112,8 e 155,8 ppm no espectro do cardanol e entre 101,0 e 159,3 ppm no espectro do cardol e 112,8 e 155,7 ppm.

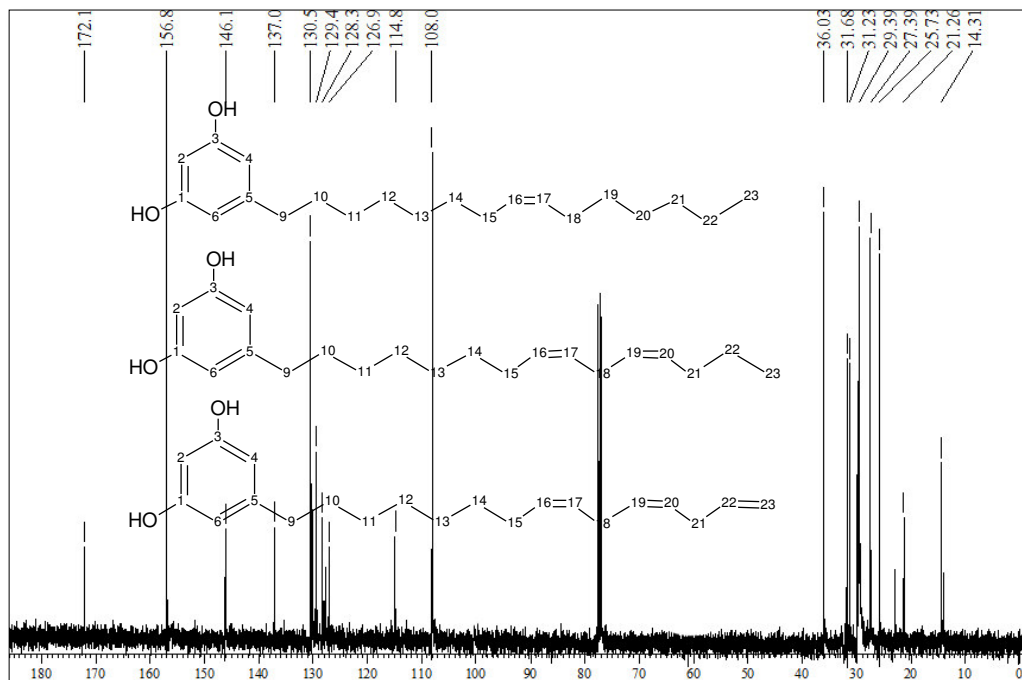


Figura 32 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono do cardanol insaturado



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 33 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono do cardol insaturado



Fonte: Elaborada pelo autor

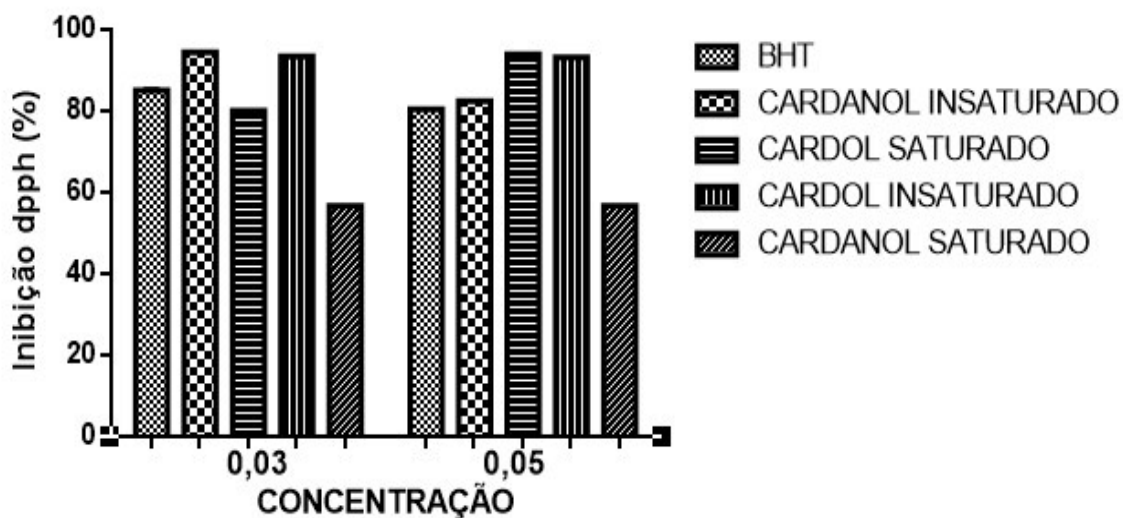
## 5.2 Resultados para atividade antioxidante na formulação

A Figura 34 revela a atividade antioxidante do BHT (comercialmente empregado) e das substâncias constituintes do LCC (natural e quimicamente modificado) em concentrações que podem variar de 0,03 a 0,05%, com a porcentagem de inibição do DPPH. A porcentagem de inibição do DPPH foi calculada pela equação 1:

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = [(ABS_{\text{controle negativo}} - ABS_{\text{amostra}}) * 100] / ABS_{\text{controle negativo}}$$

Ao comparar o antioxidante de referência (BHT) com os derivados do LCC, o cardanol insaturado e o cardol insaturado apresentaram porcentagens de inibição de DPPH superiores ao BHT, portanto a atividade antioxidante desses produtos ficou comprovada. Já o cardanol saturado apontou atividade antioxidante em torno de 50%, ou seja, inferior ao do BHT. Em uma busca patentária (PI 0804595-0) foi possível observar que na mesmas condições o Genippa americano apresentou porcentagem de inibição de 70%, portanto menor que os constituintes fenólicos.

Figura 34: Porcentagens de inibição de DPPH nas concentrações 0,03 e 0,05

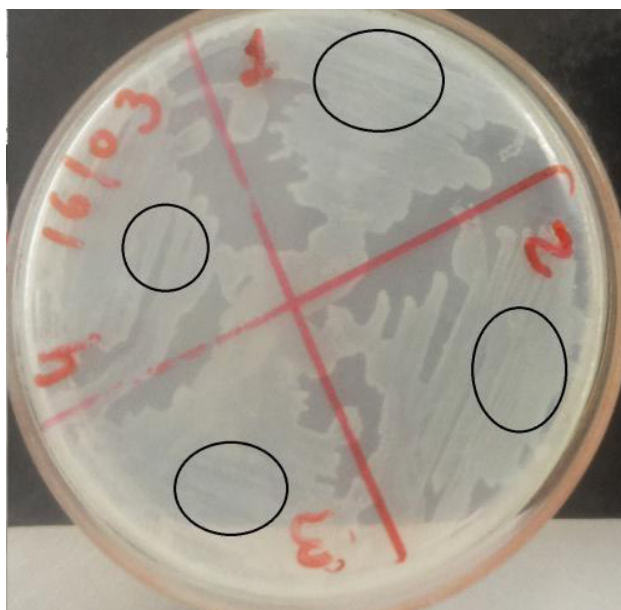


Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.3 Resultados para atividade bactericida

A Figura 36 representa uma avaliação preliminar da atividade antibacteriana da solução oleosa, onde foi empregado o teste de difusão em ágar. Foram aplicados 10  $\mu$ L da solução oleosa nas placas de Petri previamente inoculadas. Após a incubação em estufa a 37°C por 24 horas, a atividade antibacteriana foi determinada. A Figura 35 revela a presença de colônias bacterianas, marcadas, evidenciando que houve crescimento de microrganismos para quatro formulações (1, 2, 3 e 4) com diferentes concentrações, variando de 0,03 a 20% de BHT, confirmando que não apresentam atividade antimicrobiana. Os números representados na Figura 35 referem-se a diferentes concentrações de BHT: 1 (Formulação 1 = 0,03% de BHT), 2 (Formulação 2 = 0,05% de BHT), 3 (Formulação 3 = 0,1% de BHT) e 4 (Formulação 4 = 0,20% de BHT).

Figura 35: Placa de Ágar com as formulações contendo BHT



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 36 revela o halo de inibição bacteriano para 1 (formulação 1 = cardanol insaturado 0,05%), 2 (formulação 2 = cardanol saturado 0,05%), 3 (formulação 3 = cardol insaturado 0,05%) e 4 (formulação 4 = cardol saturado 0,05%). A concentração 0,05% foi utilizada pelo fato de ser a porcentagem usual de BHT nos compostos cosméticos. A Figura 4 confirma a atividade antimicrobiana das quatro formulações (1, 2, 3 e 4) propostas como objeto da invenção, visto que não houve crescimento de colônias bacterianas.

Figura 36: Placa de Ágar contendo as formulações com os ativos fenólicos



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 5.4 Resultados para atividade repelente

##### 5.4.1 Resultados dos ensaios em ratos *mus musculus*

O ensaio do teste controle foi realizado com a impregnação da emulsão hidratante sem a adição dos derivados dos componentes fenólicos (Cardanol, Cardol, LCC Técnico e LCC Natural). Das 50 fêmeas expostas na gaiola, apenas 6 não se alimentaram e 44 se alimentaram normalmente, os dados estão na Tabela 11. Este resultado é coerente com o esperado, uma vez que não existiu nenhum impedimento para que as mesmas realizassem o repasto sanguíneo. A porcentagem é calculada baseada a partir da equação 2:

$$R (\%) = (C-T/C) \times 100\%$$

onde C é o número de picadas de mosquito nos ensaios do controle negativo(hidratante sem os bioativos) e T o número de picadas nos ensaios em tratamento.

Tabela 11: Ensaio de Atividade repelente do hidratante com adição do óleo do LCC Técnico, LCC Natural, Cardol, Cardanol, Citronela e Andiroba.

PRODUTOS	Nº DE FÊMEAS	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	Nº DE FÊMEAS ALIMENTADAS	ATIVIDADE REPELENTE
HIDRATANTE LCC NATURAL (1%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
HIDRATANTE LCC TÉCNICO (1%)	50	30 MINUTOS	01	98 %
HIDRATANTE LCC TÉCNICO (1%)	50	30 MINUTOS	01	98 %
HIDRATANTE CARDOL (1%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100%
HIDRATANTE CARDANOL (1%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
HIDRATANTE LCC NATURAL (1%) CITRONELA (5%) ANDIROBA (5%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
HIDRATANTE LCC TÉCNICO(1%) CITRONELA (5%) ANDIROBA(5%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
HIDRATANTE CARDOL (1%) CITRONELA (5%) ANDIROBA (5%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
HIDRATANTE CARDANOL (1%) CITRONELA (5%) ANDIROBA (5%)	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
REPELENTE COMERCIAL DEET	50	30 MINUTOS	NENHUMA	100 %
HIDRATANTE SEM ADIÇÃO DE LCC	50	30 MINUTOS	44	12 %

Durante o período de alimentação sangüínea, ocorreu um aumento de 98% a 100% da atividade de repelência nos hidratantes, com os bioativos, comparados ao hidratante puro onde apresentou valores inferiores (12%). Dessa forma é possível comprovar que a atividade repelente está associada aos compostos fenólicos. Na literatura alguns óleos naturais também foram testados para verificar a atividade repelente nas mesmas condições de tempo. Esses apresentaram valores inferiores aos encontrados nesse ensaio, o Neem oil apresentou 70,59%, Sea Lily 57,89% e o Djulis Seed 67,86% (CHIO; YANG, 2008).

Os repelentes com os bioativos fenólicos também foram comparados com repelentes presentes no mercado como o DEET (7,125%) que obteve resultados iguais aos obtidos pelos bioativos fenólicos.

#### 5.4.2 Resultados dos ensaios em humanos

A partir dos ensaios realizados com ratos foi possível constatar que a melhor proporção foi a que utilizou os hidratantes com 1% dos constituintes fenólicos os quais apresentaram repelência equivalente aos de mercado. Vale salientar que outras formulações nas concentrações 0,5% e 0,25%, dos constituintes fenólicos também foram testadas, porém os índices de atividade de repelência para 0,25% foram abaixo de 40% o que inviabilizou a utilização das formulações nestas concentrações.

O percentual de repelência obtido foi calculado com base na fórmula e plotado no Gráfico (Figura 37)

$$R (\%) = (C-T/C) \times 100\%$$

Onde C é a quantidade de picadas utilizando o controle negativo (Hidratante sem a presença dos ativos fenólicos) e T é a quantidade de picadas com os repelentes testes.

Esses resultados foram aplicados o teste T de student e os dados foram considerados significativos.

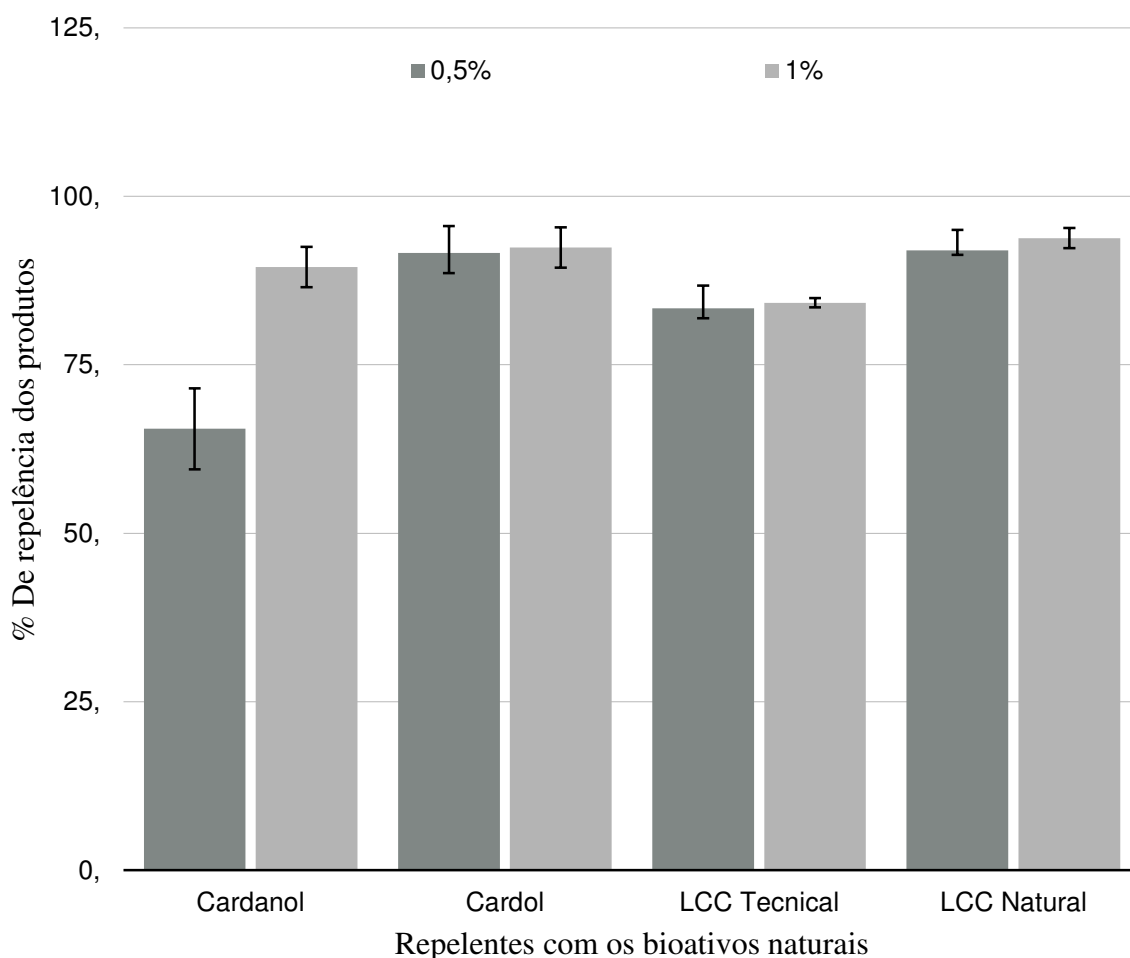
De acordo com a Figura 37 em todos os compostos estudados a taxa de repelência foi significativa a partir de 0,5% e houve um aumento deste índice com o aumento da concentração para 1,0%. Foi observado que o ativo LCC Natural (93,8%) na concentração de

1 % apresentou um percentual de repelência alta assim como o Cardol (92,4%) e quando comparados ao repelente de referência DEET (93,6%), essa porcentagem foi equivalente.

O repelente que é mais usado no mercado é o DEET e a comparação com formulação comerciais contendo esse ativo é recorrente (FRADIM; DAY, 2002; NENTWIG, 2003). Porém, apesar da sua eficácia segundo a ANVISA (2006) o DEET é um ativo que não pode ser utilizado em crianças menores de 2 anos e até 12 anos pode ser usado com restrições (ANVISA,2006).

Por essa razão, vários pesquisadores tentam substituir o DEET e utilizando os mesmos parâmetros Chang e colaboradores em 2006 determinaram a porcentagem de 97% de repelência para o óleo de gerânio e citronela (CHANG *et al.*, 2006). Outros extratos produzidos a 5 % de *Melaleuca ericifolia* em álcool produziram uma repelência de 93,3%.(GREIVE *et al.*, 2010). Dessa forma, é possível observar que os derivados fenólicos do LCC possuem atividade repelente equivalente aos de mercado e portanto podem ser uma alternativa para substituição desses ativos.

Figura 37: Porcentagem de repelência dos repelentes



Esta ação repelente envolve frequentemente sinergismo de fatores químicos que podem ser induzidos pelos metabólitos secundários, como por exemplo, compostos fenólicos mistos que executam papéis de defesa e proteção à planta ou que possuem sabores e odores característicos (CROTEA; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os fatores físicos estão associados às características olfativas, visuais como cor do recipiente, cor da água, o tamanho do recipiente e características térmicas (HARRINGTON, *et al*, 2008; LIMA *et al*, 2014; MOHAMAD; ZUHARAH, 2014).

Sabe-se que os compostos fenólicos estudados se situam na castanha do caju e tem como características odor forte. Esses fenóis exercem a função de proteger a amêndoa de predadores e insetos bem como preservar o seu poder germinativo (LIMA, 1988). Levando em consideração que os fatores foram mantidos entende-se que os fenóis da espécie *Anacardium occidentale*, exerceram uma efetiva ação positiva para deter (repelir) a aproximação da fêmea durante a alimentação. No entanto, não foi possível até o momento estabelecer por qual mecanismo essa repelência ocorre.

Com base em repelência, compostos derivados de espécies da Família Anacardiaceae, *Gluta rengas* e *Melanochyla fasciculiflora* apresentaram atividade de repelir a oviposição da fêmea (ELANGO; BAGAVAN; KAMARO, 2009). Elango e colaboradores (2009) da mesma forma mostraram propriedade de oviposição para o extrato em hexano de folhas de *Andrographis lineata*, espécie da Família Acanthaceae, uma planta de origem indígena indiana, para o controle do *Anopheles subpictus* (vetor da malária) mesmo em baixa concentração e curto tempo de exposição.

#### 5.4.3 Resultados da reologia

A tixotropia pode ser medida através das curvas de histerese e a área dentro do ciclo de histerese pode ser descrita como a energia necessária para o colapso da estrutura de materiais. Dessa forma com base nas Figuras 38 a 46 todas as amostras apresentaram histerese entre as curvas ascendente e descendente, caracterizando-as como tixotrópicas. Esse comportamento é característico de emulsões de aplicação de uso tópico, as quais precisam possuir uma boa espalhabilidade, facilitando a administração do produto sobre a pele. A medida que aumenta a força, esse fluido diminui sua viscosidade (TADROS, 2004). Segundo os gráficos presentes



nas Figuras 47 a 55, a tensão de cisalhamento não é diretamente proporcional a taxa de deformação, dessa forma todas as amostras apresentaram comportamento de fluido não-newtoniano e pseudoplástico (CASTELLI *et al.*, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2009; FERRARI; ROCHA, 2011). Esse comportamento é ideal para produtos cosméticos e para a função que o produto se destina, já que ele é capaz de se espalhar sem se liquefazer (GUARATINI *et al.*, 2006).

Figura 38: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação do branco

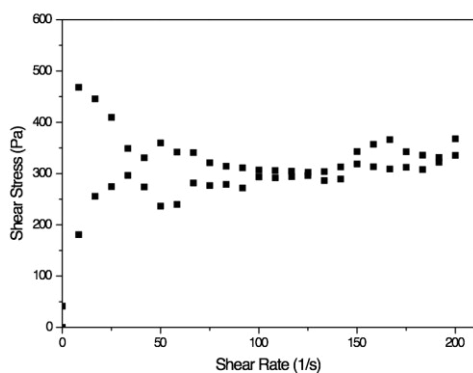


Figura 39: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 0,5%.

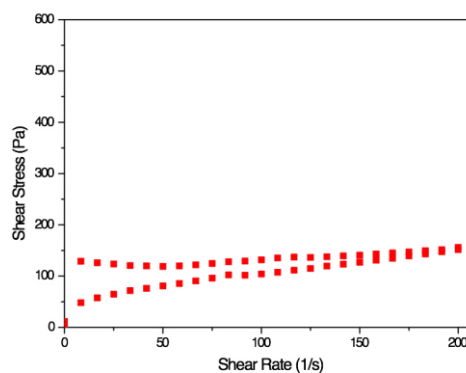


Figura 40: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 1,0%.

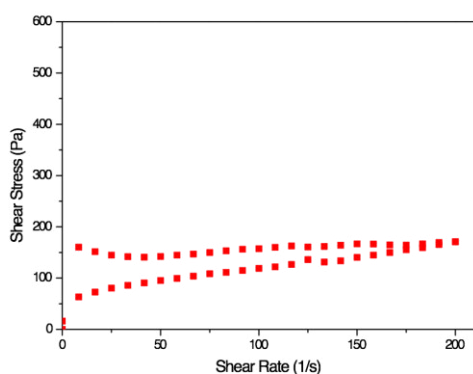


Figura 41: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardol 0,5%.

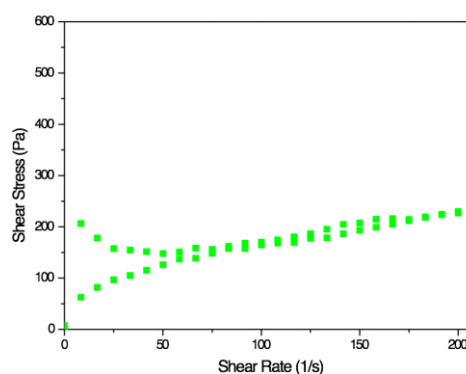


Figura 42: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de Cardol 1,0%.

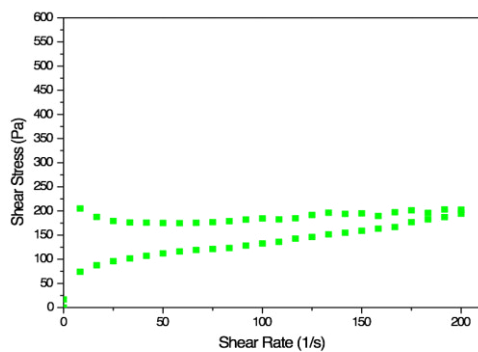


Figura 43: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC N 0,5%.

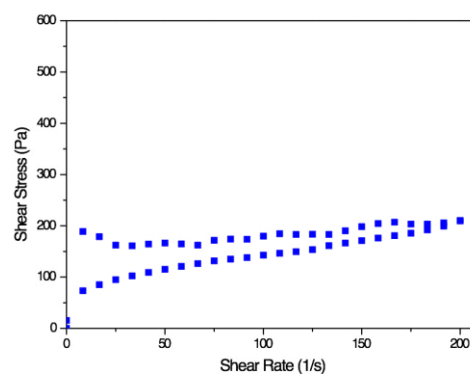


Figura 44: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC N 1,0%..

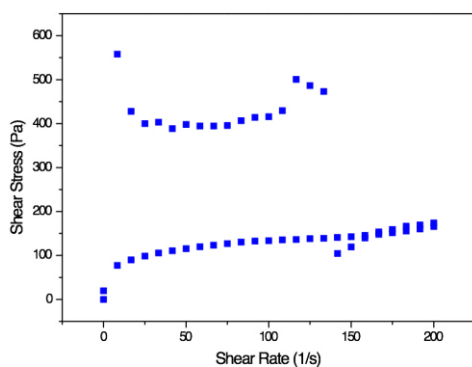


Figura 45: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC T 0,5%.

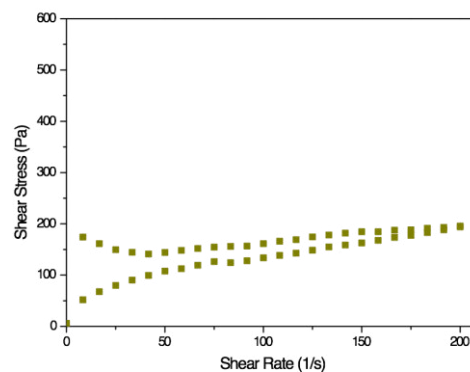


Figura 46: Gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de deformação da amostra de LCC T 1,0%.

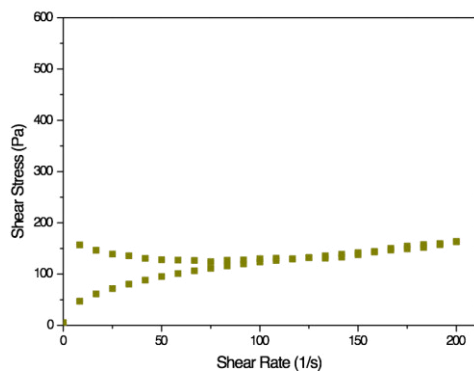


Figura 47: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação do branco.

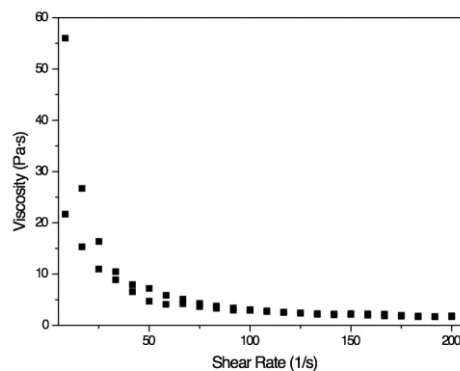


Figura 48: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 0,5%.

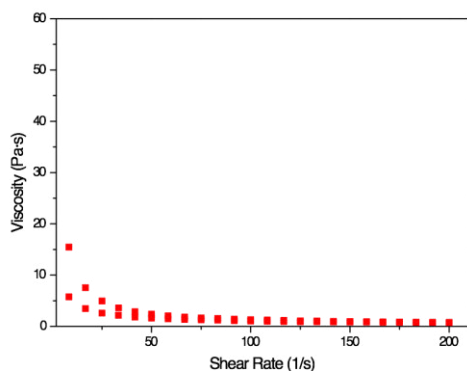


Figura 49: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardanol 1,0%.

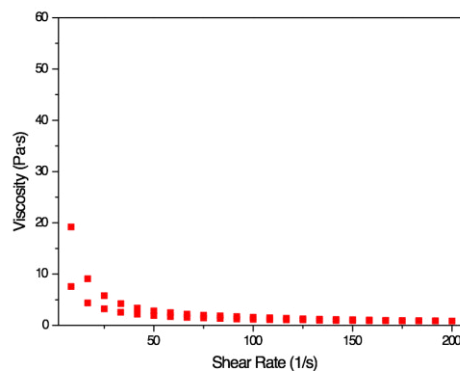


Figura 50: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardol 0,5%.

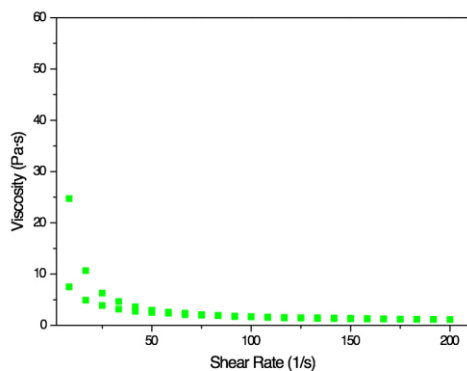


Figura 51: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de Cardol 1,0%.

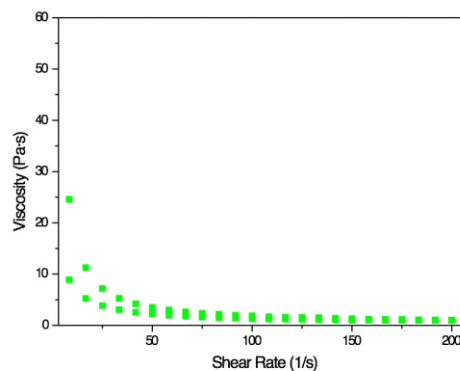


Figura 52: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC N 0,5%.

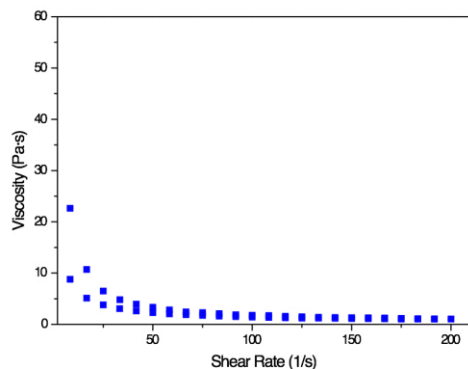


Figura 53: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC N 1,0%.

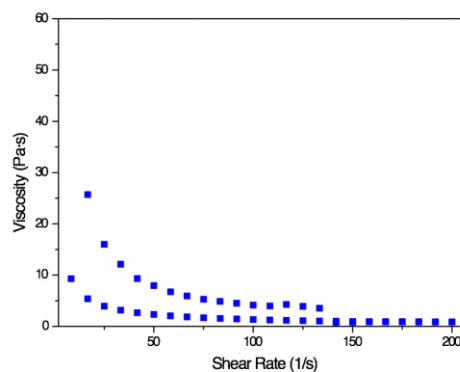


Figura 54: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC T 0,5%.

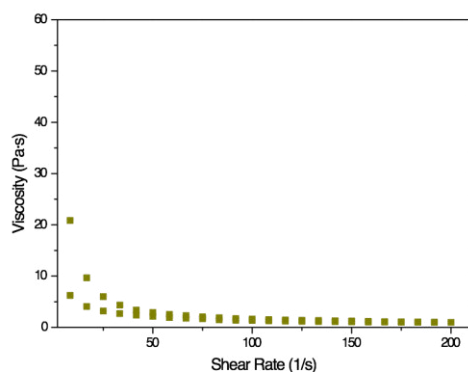
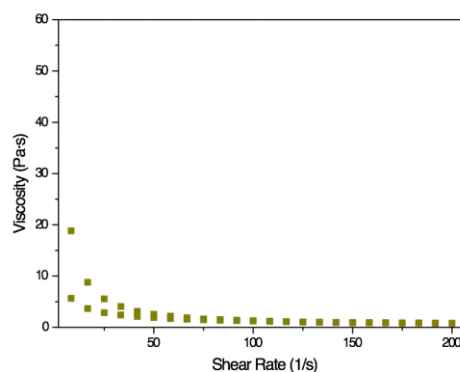


Figura 55: Gráfico da viscosidade pela taxa de deformação da amostra de LCC T 1,0%.



## 5.5 Resultados para atividade antioxidante na pele

### 5.5.1 Caracterização do sistema bicosome

#### 5.5.1.1 Avaliação da aparência e odor

De acordo com os resultados apresentados (Tabela 11) ficou claro que a formulação não apresentou alterações significativas em suas características, demonstrando que o produto permaneceu estável.

Tabela 12: Mudança das características de acordo com o tempo

Condição	Tempo (Dias)	Aparência	Odor
Geladeira (4°c)	0	(I)	(I)
	15	(I)	(I)
	30	(I)	(I)

Aparência : (I) normal, sem alteração; (II) ligeiramente separado; Ligeiramente precipitado ou ligeiramente turvo e (III); Precipitado ou turvo (IV). Odor: (I) normal sem alteração; (II) ligeiramente modificado; (III) e alterado (IV) fortemente modificado

### 5.5.1.2 Medidas de cor

O modelo utilizado foi o CIE L / a / b, sendo possível avaliar a cor correspondente à percepção humana. A diferença total do parâmetro de cor ( $\Delta E$ ) foi calculada e mostrada na Tabela 13. Foi utilizada a Equação 3 para calcular a diferença total de cor foi:

$$\Delta E = [ (\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 ]^{1/2}$$

A ausência de mudança na coloração durante o teste de estabilidade significa que a formulação permanece estável. Caso fosse evidenciada uma mudança drástica de coloração podia ser indicativo de oxidação lipídica. Os níveis de hidroperóxidos podem comprometer gravemente a formulação alterando a validade e promovendo a mudança de olfativa e de coloração (HAYAT *et al.*, 2016).

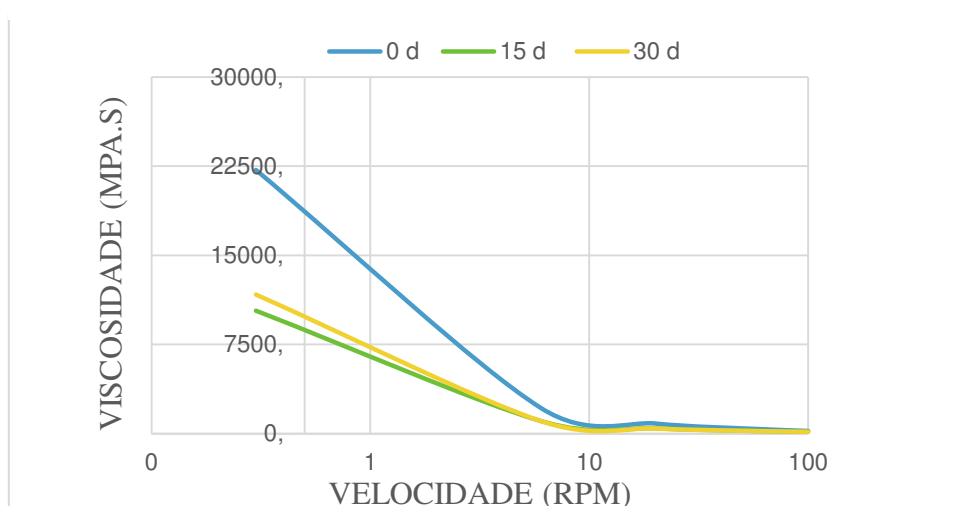
Tabela 13: Resultados do total de perda de cor de acordo com o padrão

Tempo(dias)	L	A	B	$\Delta e$
0	47.65	19.75	11.55	Padrão ( $\pm$ )
15	47.99	19.22	10.89	0.91
30	47.308	19.604	10.755	0.88

### 5.5.1.3 Medidas de viscosidade

Os sistemas que contém a estrutura de bicosomes possuem um comportamento reológico de fluido pseudoplástico, cuja viscosidade aparente diminui com o aumento do taxa de cisalhamento. Este comportamento característico das amostras de bicosome é responsável por facilitar a administração do produto sobre a pele (HAYAT *et al.*, 2016). A medida isolada da viscosidade funciona como um parâmetro adicional para avaliar as alterações físicas nas formulações estudadas. Foi possível mostrar na Figura 55 que a medida que varia mais está em 0,3 rpm, mas quando a velocidade aumenta, o comportamento reológico é igualado, portanto essa formulação pode ser considerada estável.

Figura 56: Grafico de viscosidade nos tempos em dias



### 5.5.1.4 Determinação do pH

A alteração de pH de uma formulação pode alterar as características físicas e químicas e influenciar atributos como estabilidade, biodisponibilidade e biocompatibilidade, comprometendo a segurança e a eficácia terapêutica da formulação (ANVISA,2004). O valor médio do pH evidenciado na Tabela 14 não mostrou variação significativa demonstrando que a formulação tem uma excelente estabilidade física e química.

Tabela 14: Variação de pH de acordo com o tempo

Tempo (dias)	pH
0	6.23
15	6.4
30	6.2

### 5.5.1.5 Peroxidação lipídica

Os peróxidos gerados pela oxidação de lipídeos não têm sabor ou odor, mas quebram rapidamente para formar produtos secundários, os quais têm um sabor e odor forte (ANGELO,1996). O teste utilizado para avaliar a peroxidação de lipídios é o ensaio com o TBARS. Os valores de absorvância obtidos a 534 nm são proporcionais à concentração de peróxido lipídico na amostra e, é possível mostrar se esta formulação sofreu oxidação ou não. O ensaio para demonstrar a presença de peróxido nas amostras foi realizado no tempo 0, após 15 dias e 30 dias para a estabilidade como demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15: Avaliação da peroxidação lipídica de acordo com o tempo

Tempo (Dias)	Absorvância	Concentração MDA :TBBARS
0	0.07	0%
15	0.05	0%
30	0.02	0%

A absorvância obtida foi 0,07, 0,05 e 0,02, respectivamente. Este resultado indicou a ausência de moléculas de peróxido nos bicosomes com cardanol. Estas duas concentrações do MDA: TBBARS representam um valor inferior a 0,00% em relação à concentração total de lípidos presente no sistema. Assim, não consideramos a formação de peróxido de lípidos de bicosome.

### 5.5.1.6 Espalhamento dinâmico da luz (DSL)

A técnica de DSL é amplamente utilizada para caracterizar os bicosomes. O Diâmetro Hidrodinâmico (HD) corresponde a uma esfera hipotética que se difunde com a mesma velocidade que a partícula e a intensidade percentual representa a proporção de luz dispersa correspondente à população obtida. As curvas de distribuição de tamanho para cada sistema lipídico mostraram a formação de duas populações, com diferentes tamanhos e intensidades de dispersão de luz. A formação das duas populações está relacionada ao sistema bicosome (bicelas encapsuladas em lipossomas), formada por um sistema heterogêneo e tem em sua composição dois tamanhos de partícula. O tamanho das micelas para as duas populações de amostras de bicosomes com cardanol foi de aproximadamente 29 nm e 237 nm.

O valor do índice de polidispersidade (IP) foi de 0,995, indicando a presença de um sistema heterogêneo, pois esse IP quanto mais próximo de 1 indica uma grande variedade no tamanho das micelas. No decurso de 30 dias, a estabilidade desses valores aumentou para HD e diminuiu para PI como podemos ver na Tabela 16 e essa pequena alteração significa que a formulação se manteve estável. Esse comportamento corresponde ao sistema bicosome, o que pode também ser evidenciado em literatura anteriores como os bicosomes formulados por rodriguez et al (2009).

Tabela 16: Valor médio de HD correspondente a diferentes populações nas curvas de distribuição de tamanhos a 25 °C.

Tempo (dias)	HD(nm)		%IP
	Pico 1	Pico 2	
0	29.03	237.5	0.995
15	56.3	334	0.847
30	56	360	0.867

### 5.5.1.7 Conteúdo de Cardanol

Para identificar a preservação do conteúdo de cardanol em bicosome, utilizou-se um espectrofotômetro. A amostra foi diluída numa razão de 1:10 e os valores de concentração de



cardanol de acordo com o tempo são respectivamente de 0, 15 e 30 dias ( $12 \pm 0,356$  mg / ml,  $11 \pm 0,07$  mg / ml e  $11 \pm 0,076$  mg / ml) . Com pouca variação de concentração de acordo com o tempo é possível evidenciar que a formulação permaneceu estável.

### 5.5.2 Estabilidade de Cardanol a radiação UV

As porcentagens de conservação de cardanol em relação ao tempo estão indicadas na Tabela 17. Os dados foram analisados pelo teste T de student e foram evidenciados significativos. Com 90 minutos de irradiação o cardanol foi completamente mantido tanto nas amostras de bicosome quanto na amostra contendo o cardanol disperso em etanol. Esses valores são compatíveis com a resistência térmica e solar do cardanol previamente evidenciada por Mazzetto em 2009.

Após 3 horas de irradiação, as amostras com extrato etanólico de cardanol apresentaram uma concentração de 93,05% e a amostra contendo cardanol com bicosome diminuiu apenas 3,44%. O sistema bicosome diminui a degradação do ativo no meio, pois esse sistema possui lipídeos que promovem uma proteção contra a degradação desse ativo. O mesmo comportamento é repetido com os outros tempos de exposição onde os produtos lipídicos têm a propriedade de proteger com maior eficácia o antioxidante. Dessa forma, os bicosomes são mais eficientes na proteção do cardanol nessas condições de irradiação do que o cardanol isolado, sendo o veículo mais eficaz para proteger o antioxidante como também foi evidenciado em outros ativos por Fernandez, (2015).

Tabela 17: Percentagem de preservação de Cardanol incorporada em bicosome e Cardanol sem bicosome após radiação ( $500 \text{ W m}^{-2}$  por 24 horas)

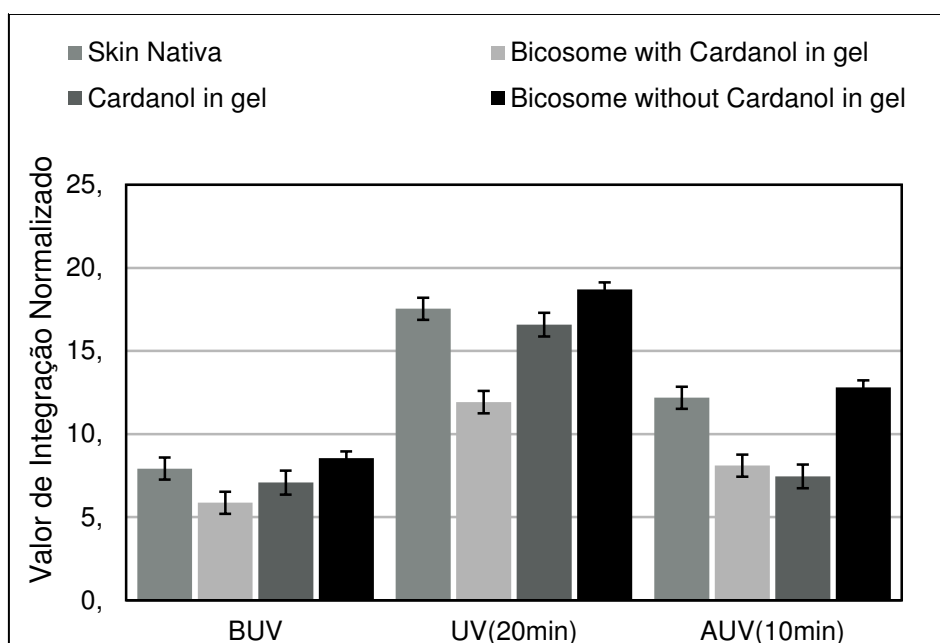
Amostra	Tempo de exposição $500 \text{ W m}^{-2}$	Preservação de Cardanol %
Cardanol+Etanol	0h	$100 \pm 2,15\%$
	1h30min	$99.5 \pm 2.15 \%$
	3h	$93.05 \pm 5.67 \%$
	6h	$81.94 \pm 4,37 \%$
	15h	$80.43 \pm 7.77 \%$
	24h	$77.24 \pm 4.29 \%$
Cardanol+Bicosome	0h	$100 \pm 2.05 \%$
	1h30min	$100.2 \pm 2.66 \%$
	3h	$96.76 \pm 7.25 \%$
	6h	$95.22 \pm 5,49 \%$
	15h	$83.78 \pm 6.75 \%$
	24h	$81.33 \pm 3,16 \%$

### 5.5.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

O N-óxido de 5,5 dimetil-1-pirrolina (DMPO) pode ser utilizado para identificar radicais que são gerados por radiação UV em sistemas fotoquímicos. A decomposição de DMPO está relacionada com a formação de radical aminoxil ( $RR'NO\cdot$ ), resultando na formação de um tripleto que é identificado pelo EPR. Para os produtos, foi formulado um produto comercial (Gel com 3% de Bicosome-cardanol e Gel com 0,03% de cardanol) e aplicado sobre o estrato córneo de pele de porco. Para medir a intensidade da formação de radicais livres sem a presença de antioxidante foi tratada a pele (Nativa) utilizando água agindo como um controle negativo. Também para se ter certeza de que bicosome isolado não era responsável pelo efeito antioxidante foi utilizada a mesma proporção de bicosome sem cardanol com gel (Gel com Bicosome 3%).

As intensidades dos sinais obtidos pela dupla integração dos espectros de EPR são proporcionais à concentração de radicais livres. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e plotados no gráfico (Figura 57). A Figura 57 relata o sinal da média de resistência antes da radiação UV (BUV), durante 20 minutos da radiação UV (UV 20 min) e após a radiação UV durante 10 minutos (AUV). Após a integração, observou-se que a amostra nativa (controle negativo) em comparação com a pele tratada (bicosome com cardanol) apresentou maior intensidade de formação de radicais livres. Além disso, quando comparado com o cardanol isolado em gel a atividade com bicosome foi maior provando que esta é a melhor maneira de administrar esse antioxidante. Os resultados mostraram uma redução de 36,7% na formação de radicais livres no sistema após radiação, provando que o cardanol tem o efeito de bloquear e recuperar a formação destes radicais livres. Os maiores valores de integração obtidos foram na pele tratada com água (nativa) e gel Bicosome. Ambos são controles negativos e não exibem proteção contra a produção de radicais livres.

Figura 57: Valor das integrações antes, durante e após a radiação



É possível visualizar na Tabela 18 o valor do RSF e da eficácia de eliminação ( $E$ ) e de acordo com a literatura, quando o RSF é maior do que 1 significa que o produto tem proteção UV. Quando avaliamos  $E$ , quando esse é menor do que 1 significa que o produto tem uma maior proteção UV. É possível verificar que o bicosome com cardanol em gel apresentou em ambos os parâmetros maior proteção UV, seguido por cardanol em gel indicando a melhor eficácia do cardanol é a administração associada ao bicosome.

Tabela 18: Fator de proteção radical da pele (RSF) e eficácia de eliminação ( $E$ ) após a radiação UV de sistemas de cardanol aplicada na pele

	Bicosome com cardanol em gel	Cardanol em gel	Bicosome sem cardanol em gel (branco)
RSF	1,47	1,06	0,94
$E$	0,32	0,05	-0,07

O sistema bicosome já mostrou ser mais eficaz e promover maior penetração da pele quando utilizado com  $\beta$ -caroteno, comprovando mais uma vez os resultados (FERNANDEZ *et al.*,2015). Esses resultados comprovam atividade antioxidante deste sistema quando comparado com Fernandez et al (2015), onde a o cardanol foi evidenciado 19% mais efetivo quando se compara o RSF dos dois sistemas. As bicelas contendo  $\beta$ -caroteno apresentaram RSF (1,19) e E (0,16) com valores inferiores aos apresentados para cardanol. De acordo com Jurkovic (2003) , o palmitato de ascorbila em microemulsões foi responsável por obter eficácia de eliminação de 0,20 quando usado 1% de palmitato de ascorbila, provando que nosso sistema tem uma atividade antioxidante promissora.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o LCC ser um subproduto da biomassa nordestina com um baixo valor agregado, foi possível, através desse trabalho, aumentar a inovação tecnológica e transformar o produto e seus constituintes em ativos eficientes.

Através do método do DPPH foi possível verificar que todas as formulações apresentaram atividade antioxidante superior ou semelhante às as formulações que continha o BHT em todas as concentrações estudadas.

Além disso, essas formulações foram submetidas a testes antimicrobianos e foram ativas contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, indicando que, além de antioxidante, estes podem ser empregados como ativos antimicrobianos em formulações.

Foi gerado uma patentente originária desse produto destinado à prevenção de formação de escaras com atividade bactericida, o que favorece o tratamento dessa patologia, além de aumentar o tempo de prateleira do produto com a diminuição da oxidação dos ácidos graxos.

Além disso, foi produzido também um hidratante repelente com o LCC Natural, Técnico, Cardol e Cardanol comparando sua atividade a um repelente comercial N,N-dimetilmeta-toluamida (DEET) e nos ensaios utilizando camundongo, os produtos apresentaram a percentagem de repelência de 98% a 100% em comparação com o hidratante puro. Esse potencial repelente foi confirmado em ensaios com seres humanos, verificou-se que o LCC Natural teve repelência de 93,8%, seguido do cardol de 92,4%. Estes valores demonstraram ser equivalentes e até mesmo superiores à percentagem de repelente comercial DEET (93,6%). Dessa forma, esse produto em percentagens menores de ativo (0,5-1%) conseguiu atingir percentuais semelhantes ao repelente de referência (7,125%) .

Além das demais atividades, o cardanol foi testado como bioprotetor em pele de porco, esse ativo foi utilizado para diminuição de radicais livres na pele com a submissão a radiação Ultravioleta (UV). Esse foi veiculado na pele com um sistema de liberação patenteado que favoreceu a sua solubilidade em veículos aquosos e a sua permeação . Foi evidenciado a redução da formação dos radicais livres (36,7%) na presença desse antioxidante, além de ser comprovado é um ativo muito estável na presença de luz UV após 24 horas de exposição (81,33 % de preservação).

De forma geral, os resultados apresentados até aqui confirmam que, aliado aos benefícios que esse produto pode trazer para sociedade, a busca por tecnologias sustentáveis tem se tornado uma grande preocupação nos últimos anos. Portanto, espera-se que o desenvolvimento econômico tenha por objetivo a melhoria de vida das presentes e futuras gerações, estimulando o desenvolvimento sustentável.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, E. P. *et al.* Dengue vaccines: what we know, what has been done, but what does the future hold?. *Revista de Saúde Pública*, v. 49, p.1-6, 2015.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quím. Nova*, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010 .
- ALVES, R. M. V. *et al.* Estabilidade de farinha de batata-doce biofortificada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 15, n. 1, p. 59-71, 2012.
- Anvisa. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2004.
- ANDRADE CFS, GUTIERREZ MJI, LUCHETTI RF. Comparação por meio de bioensaio de duas formulações de um produto comercial repelente de insetos à base de DEET. *Analytica*. p. 56:3,2011.
- ANDRADE, T. J. A. S. *et al.* Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). *Food Chemistry*, v. 126, p. 1044-1048, 2011.
- ANGELO, A. J. S. Lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.36, p.17-224, 1996.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Utilização do DEET em preparações de repelentes para insetos. (Parecer Técnico - 2). Brasília, DF. 2006.
- AMORIM, A. V. *et al.* Produção e fisiologia de plantas de cajueiro anão precoce sob condições de sequeiro e irrigado. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.*, v. 15, n. 10, p. 1014-1020,2011 .
- ARAÚJO, M. C.; FERRAZ, A. C. O. Características físicas e mecânicas do endocarpo e da amêndoa da castanha de caju 'CCP 76' antes e após tratamento térmico. *Eng. Agríc.*, v. 28, n. 3, p. 565-578, 2008.
- AHMAD, T. *et al.* Effect of Saturation and Micro Nutritional Status on Stability of Dietary Oils under Photooxidative Stress Condition. *Journal of Chemical Society of Pakistan*, v. 33, n.3, p 343-350, 2011.
- BALOGH, T. S. *et al.* Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An. Bras. Dermatol.* v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011 .
- BALACHANDRAN, V. S. *et al.* Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 413-832, 2013.
- CALVO, E. P. *et al.* Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos. *Biomédica*, v. 36, p. 35-43, 2016.



- CASTELLI, V.C. *et al.* Development and evaluation of the preliminary stability of O/W emulsion containing ketoconazole 2.0%. *Acta Sci. Health Sci.*,v.30,p.121-128, 2008.
- CHANG, K.S. *et al.* Repellency of Cinnamomum cassia bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions. *Pest. Manag. Sci.*, v.62, p.1032-8, 2006.
- CHIO, E. H.; YANG, En-cheng. A bioassay for natural insect repellents. *Journal Of A sia-pacific Entomology*, v. 11, n. 4, p.225-227, 2008.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.
- CÓCERA, M. *et al.* Characterisation of skin states by non-crystalline diffraction. *Soft Matter*, v.7, p.8605-8611, 2011.
- COSTA, T. S. *et al.* Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanha de caju. *Comunicado Técnico 122*. Brasília: DF, 2005.
- CROTEAU, R.; KUTCHA, T.M.; LEWIS N.G., Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, p.1250-1268, 2000.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.
- ESPOSITO, D. L. A; FONSECA, B. A. L. Zika and chikungunya infections in Brazil: reviewing the epidemic and treatment options. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 49, n. 5, p. 535-536, 2016 .
- ELANGO, G; BAGAVAN,A; KAMARA,J.C., Oviposition-deterrent, ovicidal, and repellent activities of indigenous plant extracts against *Anopheles Subpictus Grassi* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res Nov.*,v.105 p.1567-76, 2009.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). *Zika virus and safety of substances of human origin*. A guide for preparedness activities in Europe, Stockholm, 2016.
- FAÇANHA, M. A. R. *et al.* Evaluation of antioxidant properties of a phosphorated cardanol compound on mineral oils (NH10 and NH20). *Fuel*, v. 86, n. 15, p. 2416-2421, 2007.
- FARIAS, D. F. *et al.* Insecticidal action of sodium anacardate from Brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v. 25, p. 386-389, 2009.
- FERRARI, M.; ROCHA-FILHO P.A.D. Multiple emulsions containing amazon oil: açáfoil (*Euterpe oleracea*). *Rev. Bras. Farmacogn.*,v.21,p.737-743,2011.

- FIOCRUZ. **Vetor da dengue na Ásia, A. albopictus é alvo de estudos.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32>. Acesso em: 22 mai. 2016.
- FRANCES, S.P. *et al.* Comparative Field Evaluation of Repellent Formulations Containing Deet and IR3535 Against Mosquitoes in Queensland, Australia. *J. Am. Chem. Mosq. Controlo. Assoc.*;v.25, p. 511-513, 2009.
- FRADIN, M.S.; DAY, J.F. Comparative Efficacy Of Insect Repellents Against Mosquito Bites. *N Engl J Med.*,v. 34.,p 13-18, 2002.
- FRANÇA, F.C. F. *et al.* Síntese e caracterização de surfactantes alquilfenil poliglicosídios a partir da amilose e alquil fenóis extraídos do lcc natural. *Quím. Nova*, v. 39, n. 7, p. 771-781, 2016 .
- FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev Bras Cienc Farm*, v. 42, p. 369-394, 2006.
- FERNÁNDEZ, E. *et al.* Advanced lipid systemscontaining b-carotene: stability under UV–vis radiation and application on porcine skin in vitro. *Chem. Phys.* v.17, p.18710–18721,2015.
- GAITÁN, S. *et al.* Efecto de la temperatura de industrilización de la nuez de marañón en la actividad antibacteriana en S. mutans del líquido de la cáscara (LCNM). *Revista Colombiana de Química*, v. 32, p. 103-112, 2003.
- GRASSI, T. L. M; MARCOS, M. T. de S; PONSANO, E. H. G. Control of the lipid oxidation in Nile tilapia feed. *Cienc. Rural*, v. 46, n. 9, p. 1675-1677,2016 .
- GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.
- GUISSONI, A.C.P. *et al.* Atividade larvicida de Anacardium occidentale como alternativa ao controle de Aedes aegypti e sua toxicidade em Rattus norvegicus. *Rev. bras. Plantas med.*, Botucatu , v. 15, n. 3, p. 363-367, 2013.
- GREIVE K.A *et al.* Development of Melaleuca oils as effective natural-based personal insect repellents. *Australian Journal of Entomology*.v.48,p.49:40, 2010.
- HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th. ed. New York: Oxford Science Publications.p.936, 2000.
- HARRINGTON L.C *et al.* Influence of container size, location, and time of day on oviposition patterns of the dengue vector, Aedes aegypti, in Thailand. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v.8,p.415-423,2009.
- HAYAT,T. *et al.* Impact of radical magnetic field on peristalsis in curved channel with convective boundary conditions. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 403, p.227-258, 2016.

HERRLING, T.; JUNG, K. The radical status factor (RSF): a novel metric to Characterize skin products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, v.34, p.285-290, 2012.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 418-421, 1991.

JURKOVLC, P. *et al.* Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm.*,v. 56, p.59-66, 2003.

KUMAR, P. P. P.R. *et al.* Process for Isolation Cardanol from technical Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut shew Liquid *J. Agric. Food Chem*, v.50 p. 4750, 2002.

KUBO, I. *et al.* Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, p. 1012-1015, 1993.

LADEMANN, J *et al.* Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. *Skin Pharmacol. Physiol.*, v. 24, n. 5, p. 269-273, 2011.

LI, H.; PENG, L. Antimicrobial and antioxidant surface modification of cellulose fibers using layer-by-layer deposition of chitosan and lignosulfonates. *Carbohydrate Polymers*, v. 124, p. 35-42, 2015.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, v. 50, n. 36, 2016.

LIMA J.B *et al.* There an efficient trap or collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches?A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.109, p.685-705, 2014.

Lima V.P.M.S, *Cultura do Cajueiro no Nordeste do Brasil*. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, 1988.

LOMONACO, D. *et al.* Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chem.*, v. 11, n. 1, p.31-33, 2009.

LOPEZ, C.A.A. *et al.* . Effects of cashew nut shell liquid (CNSL) on the performance of broiler chickens. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 64, n. 4, p. 1027-1035, 2012 .

MAHATA, D *et al.* Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 69, p.5-11,2014.

MAIA, F. J. N. *et al.* Evaluation of antioxidant action by electrochemical and accelerated oxidation experiments of phenolic compounds derived from cashew nut shell liquid. *Industrial Crops and Products*, v. 67, p. 281-286, 2015.

- MARANGONI, C.; MOURA, N. F. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 31, n. 1, p. 124–128, 2011.
- MAZZETTO, S. E; LOMONACO, D; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.
- MIRANDA, C. A. S. F. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Rev. Ciênc. Agron.*, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- MIRANDA, G.A.F.; VALENCIA, G.T.; FERNANDEZ, J.Y. Stability evaluation of  $\beta$ -Carotene nanoemulsions prepared by homogenization-emulsification process using stearic acid as oil phase. *Rev. Mex. Ing. Quím.*, v. 14, n. 3, p. 667-680, 2015.
- MOHAMAD, N.; ZUHARAAH, W.F., Influence of container design on predation rate of potential biocontrol agent, *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae) against dengue vector. *Trop Biomed.*, v.31,p.166-173,2014.
- NASCIMENTO, A. M. D. *Atividade repelente e larvicida de Xylopiia laevigata, X. frutescens (Annonaceae) e Lippia pedunculosa (Verbenaceae) sobre mosquitos Aedes aegypti (Diptera-Culicidae)*, 2014. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) – centro de vivência, Universidade Federal de Sergipe,2014.
- NENTWING G. Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitology Research.*,v.90,p.40-48, 2003.
- OLIVEIRA, L. G. L. Gestão dos resíduos e sustentabilidade na cadeia produtiva do agronegócio do caju no ceará. *R. Gest. Anál*, v. 5, p. 78-95, 2016
- OLIVEIRA, M. S. S. *et al.* Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Trop*, v. 117, p. 165-170, 2011.
- OSMARI, M. P. *et al.* Líquido da casca da castanha de caju: características e aplicabilidades na produção animal. *Pubvet*, v. 9, 143-149, 2015.
- PATEL R. N.; BANDYOPADHYAY, S.; GANESH, A. Extraction of cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid using supercritical carbon dioxide. *Bioresour. Technol*, v. 97, p. 847-853, 2006.
- PORTO, K. R. A *et al.* Atividade inseticida do líquido da castanha de caju sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *R. bras. Bioci*, v. 11, p. 419-422, 2013.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, v.29, p.755, 2006.
- RIBAS, J.; CARREÑO, A. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. *An. Bras. Dermatol*, v. 85, p. 33-38, 2010.

RIOS, M. A. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2008.

RODRIGUEZ, G. *et al.* Bicosomes: Bicelles in Dilute Systems. *Biophysical Journal*, v.99, p.480-488, 2010.

ROMEIRO, L. A. S.; SILVA, V. C.; MURTA, M. M.; MAGALHÃES, G. C.; LOGRADO, L. P. L.; SANTOS, M. L.; RESCK, I. S.; MOURA, E. A.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; LEITÃO, A. A. C.; SILVA, C. S.; FREITAS, Z. M. F.; SANTOS, E. P.; WO Pat. WO2006/042391 A2, 2006.

RUBIO, L. *et al.* Characterization of new DOPC/DHPC platform for derma applications, *Colloids Surf.*, v.92, p.322-326, 2012.

SALADINO, R. *et al.* A new and efficient synthesis of ortho- and para-benzoquinones of cardanol derivatives by the catalytic system MeReO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, n. 4, p. 581-586, 2000.

SANCHEZ-MORENO, C. *et al.* A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, n.76 p.270-276, 1998.

SILVA, A. L. *et al.* Cardanol-based thermoset plastic reinforced by sponge gourd fibers (*Luffa cylindrica*). *Polímeros*, v. 26, n. 1, p. 21-29, 2016.

SILVA, A. R. *et al.* Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 32, n.1, p. 73-80, 2010.

SILVA, M. S. S. *et al.* Anacardic acid derivatives from Brazilian propolis and their antibacterial activity. *Eclat. Quím.*, v. 33, n. 3, p. 53-58, 2008.

SILVA-VOORHAM, J. M. *et al.* Dengue: a growing risk to travellers to tropical and subtropical regions. *Ned Tijdschr Geneesk.*, v. 153, n. A778, 2009.

SILVA, J. S.; ARIANO, Z. F.; IRACÍ, S.. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle-. *Hygeia*, v. 4, n. 6, 2008.

STEFANI, G. P. *et al.* Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 27, n. 1, p. 81-89, 2009.

TADROS T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v.108-109, p. 227-258, 2004.

Tasi. Colour theory: understanding and modelling colour, Technical Advisory Service for Images. Bristol, UK: *University of Bristol*, 2004.

TREVISAN, M. T. *et al.* Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem. Toxicol.*, v. 44, n. 2, p. 188-97, 2006.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Hazard Characterization Document. Screening-Level Hazard Characterization of cardanol.2009.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 369-380, 2007.

WANG, S. Q.; OSTERWALDER, U.; JUNG, K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. *J. Am. Acad. Dermatol.*,v. 65,p. 525-530, 2011.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Threat of dengue to blood safety in dengue-endemic countries. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 15, n. 1, p. 8-11, 2009.

World Health Organization. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. 1996.

YOON, J.K. *et al.* Comparison of repellency effect of mosquito repellents for DEET, citronella, and fennel oil. *J. Parasitol. Res.*, p.1-6, 2015.

ZHAO,J.; CASTRANOVA,V. toxicology of nanomaterials used in nanomedicine.*Journal of Toxicology and environmental Health*,v.14, p.593-632,2011.

ZUHARAH W.F. *et al.* Toxicity and sub lethal effect of endemic plants from family Anacardiaceae on oviposition behavior of *Aedes albopictus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. v.5, p.612-618, 2015.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do repelente corporal

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado pela Prof. Dr. Selma Elaine Mazzetto como participante da pesquisa intitulada “Repelente corporal baseado no Líquido da Casca da castanha de caju - LCC com ação repelente contra o mosquito *Aedes aegypti* transmissor da Dengue, Febre Chikungunya e Zika”.

Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Os testes serão realizados em voluntários humanos adultos que podem ser escolhidos de entre candidatos que exibem leve ou nenhuma sensibilidade a picadas de mosquito. (Guia para eficácia de repelentes em pele humana, OMS).

Na preparação para os estudos de laboratório, a área utilizada da pele do voluntário será lavada com sabão e enxaguado com água, depois lavado com uma solução de 70 % de etanol em água e secou-se com uma toalha . Dada a possibilidade de que vários fatores podem alterar de atração dos vetores , e que isto pode , por sua vez afecta o resultado de ensaios de repelência , voluntários de teste deve evitar o uso de perfumes e repelentes de produtos , durante 12 horas , antes e durante o ensaio.

Os testes para determinar a atividade repelente serão realizados no Laboratório de Análise de Culicídeos situado no Núcleo de Vetores e Endemias - NUVET da cidade de Fortaleza - Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Os ensaios serão realizados a uma temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 70 a 80 % e ocorreram no período diurno. Serão utilizadas gaiolas de madeira medindo 40 cm x 40 cm protegidas com telas nas suas laterais (Fe para cada ensaio foram selecionados 50 mosquitos fêmeas da espécie *Aedes aegypti* de Geração 1, cepa Rockefeller, copuladas e sem nenhuma alimentação anterior mantidas sob condições de laboratório e portanto, livres de qualquer contaminação por vírus. Para a realização dos ensaios 40 voluntários utilizarão a mão, a qual será impregnada com os hidratantes já preparados e serão expostos por 30 minutos .Será realizado um teste com um hidratante sem a presença de ativos que funcionará como branco e com repelentes comerciais para o controle positivo.

A metodologia foi baseada no guia para eficácia de repelentes na pele humana, YOON *et al.* (2015) e WHO (1996). O DEET (N , N-dietil - 3 - metilbenzamida) é o ingrediente ativo da maioria dos repelentes comercialmente disponível e é recomendado como controle positivo.

Os voluntários introduzirão a mão, por 30 minutos, nas gaiolas contendo 50 mosquitos fêmeas da espécie *Aedes aegypti*. Logo após, será avaliada a atividade repelente através da quantidade de mosquitos realizaram a alimentação sangüínea.

Os riscos iminentes da pesquisa estão associados as picadas pelo mosquito *Aedes aegypti*. Para eliminar o risco de contaminação todos os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* utilizados na pesquisa serão mantidos em laboratório sem nenhuma alimentação prévia, ou seja, sem risco de contaminação. Além disso após a exposição esses mosquitos não serão reutilizados. Os voluntários serão beneficiados por contribuírem para uma pesquisa de interesse de saúde publica. A transmissão desses vírus tem afetado a vida de muitos brasileiros e o lançamento de um novo repelente no mercado impactaria positivamente a vida dessas pessoas.

A participação dos voluntários será acompanhada pelos responsáveis da pesquisa que prestaram qualquer esclarecimento sobre o experimento. Além disso, caso haja alguma reação alérgica, os voluntários serão encaminhados para CEATOX setor especializado em picadas de insetos e animais peçonhentos no Instituto José Frota na Rua Barão do Rio Branco, 1816. Será disponibilizado para os dias de experimento um carro com motorista para encaminhar os voluntários para o hospital.

Os dados serão coletados somente para essa pesquisa e o participante não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa.

A qualquer momento, o voluntário poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, retirar consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo.

As informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Endereço d(os, as) responsável(is) pela pesquisa:

Nome: Selma Elaine Mazzetto

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua júlio Alcides , Maraponga, Casa: 13 , n: 323



Telefones para contato: (85) 991785222
--

<p>ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).</p>
---

<p>O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.</p>
---

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
----------------------------------	------	------------

Nome do pesquisador	Data	Assinatura
---------------------	------	------------

Nome da testemunha	Data	Assinatura
--------------------	------	------------

(se o voluntário não souber ler)

Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura
--	------	------------

## ANEXOS

## ANEXO A – Depósito de Patente

"HIDRANTE CORPORAL À BASE DE ÓLEO DE CITRONELA, ANDIROBA E LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU – LCC COM AÇÃO REPELENTE CONTRA O MOSQUITO *Aedes Aegypti*"



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENADORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que Vivian Romero Santiago, é um dos inventores da patente intitulada "Hidrante Corporal à Base de Óleo de Citronela, Andibora e Líquido da Casca da Castanha de Caju- LCC com Ação Repelente Contra o Mosquito *Aedes Aegypti*", em depósito no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), sob número de processo de patente definitivo BR 10 2016 015984 9.

Fortaleza, 13 de julho de 2016.

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho  
Pró-Reitor de Pesquisa e  
Pós-Graduação  
Universidade Federal do Ceará

*ANEXO B* – Depósito de patente

“USO DE COMPOSTOS NATURAIS E QUIMICAMENTE MODIFICADOS DERIVADOS DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU NA PRODUÇÃO DE PRODUTOS PARA PREVENÇÃO DE ESCARAS”



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENADORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

**DECLARAÇÃO**

Declaramos, para os devidos fins, que Vivian Romero Santiago, é um dos inventores da patente intitulada “**Uso de Compostos Naturais e Quimicamente Modificados Derivados do Líquido da Casca da Castanha do Caju na Produção de Produtos para prevenção de Escaras**”, em depósito no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), sob número de processo de patente definitivo BR 10 2016 015982 2.

Fortaleza, 13 de julho de 2016.

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho  
Pró-Reitor de Pesquisa e  
Pós-Graduação  
Universidade Federal do Ceará