



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE FITOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE A PARTIR DE  
EXTRATO PADRONIZADO DO COCO (*COCOS NUCIFERA*): UM ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE AS VARIEDADES AMARELA E VERDE**

**RAYANNE BRITO DE FREITAS**

Orientador: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Coorientador: Diogo Miron

**FORTALEZA**

**2017**

**RAYANNE BRITO DE FREITAS**

**DESENVOLVIMENTO DE FITOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE A PARTIR DE  
EXTRATO PADRONIZADO DO COCO (*COCOS NUCIFERA*): UM ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE AS VARIEDADES AMARELA E VERDE**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida  
Moreira Leal.  
Coorientador: Diogo Miron

**FORTALEZA**

**2017**

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)

---

D32d de Freitas, Rayanne Brito.  
Desenvolvimento de fitocosmético antioxidante a partir de extrato padronizado do coco (*Cocos nucifera*): um estudo comparativo entre as variedades amarela e verde / Rayanne Brito de Freitas. – 2017.  
94 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.  
Coorientação: Prof. Dr. Diogo Miron.

1. *Cocos nucifera*. 2. Antioxidante. 3. Extrato seco. 4. Fitocosmético. I. Título.

CDD 615

---

RAYANNE BRITO DE FREITAS

DESENVOLVIMENTO DE FITOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE A PARTIR DE  
EXTRATO PADRONIZADO DO COCO (*COCOS NUCIFERA*): UM ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE AS VARIEDADES AMARELA E VERDE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida  
Moreira Leal  
Coorientador: Diogo Miron

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

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)  
UFC

---

Prof. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva  
UFC

---

Prof. Dra. Antonia Torres Ávila Pimenta  
UFC

*Aos meus pais por todo amor e carinho  
prestados a mim.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia, minha fortaleza, meu amparo. Obrigada por nunca desistir de mim. Sou grata por tudo que tens feito em minha vida, Senhor.

Aos meus pais, Ricardo e Meire, pelo amor incondicional. Obrigada por me ajudar em todos os momentos que precisei, pelos conselhos, palavras de conforto, pelos abraços calorosos e, até, pelas massagens nos momentos de tensão... Obrigada por acreditarem em mim e nunca medir esforços para me dar uma boa educação. Devo TUDO isso a vocês, meus dois grandes amores.

Ao meu noivo, Jonathas, obrigada por está comigo durante toda essa caminhada...Por me compreender, me incentivar, me apoiar e por toda a paciência nos momentos de estresse. Obrigada pelo seu amor e carinho. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Te amo muito.

Ao meu irmão, Ricardo, que mesmo morando distante sei que está sempre mandando boas energias e torcendo por mim. Amo você.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luzia Kalyne A. M. Leal, por toda paciência, carinho e orientação durante esse período da minha vida acadêmica. Obrigada por acreditar sempre no meu potencial.

Às minhas amigas, em especial Hilmara e Aline, que me acompanham desde o período da graduação e que viveram junto comigo esse desafio que é a Pós-Graduação! Obrigada por todo o carinho, por se fazerem presentes nos momentos de dificuldades, pelos conselhos, orações, incentivo e por toda amizade que construímos ao longo desses anos. Obrigada por me ajudarem a enxergar as melhores decisões. Com certeza, sem a ajuda de vocês tudo seria muito mais difícil.

Ao Diogo, meu co-orientador, por todos os ensinamentos, dedicação a minha pesquisa, pela disponibilidade em me ajudar com os experimentos e por toda paciência com as minhas intermináveis dúvidas (rsrs).

À Bianca por nunca se opor a me ajudar nos experimentos. Obrigada por toda paciência e pelos conselhos “de mãe”.

À Talita e Elizama por toda paciência em tirar minhas dúvidas (que não foram poucas, rsrs) e por me auxiliar nos experimentos. Obrigada também pelos momentos de descontração e pelas conversas nas horas de almoço.

Ao João Vitor e Thalia, por me auxiliarem diretamente nos experimentos.

À Ana Paula, por sempre ter me ajudado nos momentos que precisei durante a execução dos experimentos.

Aos demais companheiros do CEFAC, Naya, Cirineu, Nuno, Bruna, João, Vinícius, Bruno, por todos os momentos de descontração.

Ao William, secretário do programa de Pós-Graduação, por sua paciência e boa vontade em me auxiliar com assuntos burocráticos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Por fim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho.

*“ Entrega o teu caminho ao Senhor; confia  
nele, e Ele tudo fará”*

(Salmos 37:5)

## RESUMO

*Cocos nucifera* L. (Arecaceae), é uma palmeira frutífera, conhecida popularmente como coqueiro, utilizada em vários setores industriais, desde agrícola até cosmético. Estudos têm demonstrado as atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral da água do coco (albúmen líquido) e/ou extratos da planta. Nos últimos anos nosso grupo tem investido de maneira inédita em pesquisas tecnológicas e biológicas de um resíduo (fibras/mesocarpo) da agroindústria do coco, que tem difícil decomposição na natureza. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um insumo fitocosmético padronizado antioxidante para uso facial a partir da fibra de coco (*Cocos nucifera*), investigando as duas variedades da planta. Inicialmente foi otimizado e validado método espectrofotométrico para análises de fenóis totais nos extratos de coco. Os extratos líquidos das duas variedades (amarela e verde) de *C. nucifera* foram produzidos por maceração e maceração associada a turbólise, usando 7% relação droga vegetal:solvente. Dentre os extratos produzidos a partir das duas variedades de coco, o extrato hidroalcoólico de coco amarelo (EHACNA) produzido por maceração 24h associado a turbólise 10 min, foi o que apresentou os melhores resultados quanto ao teor de fenóis totais - FT ( $5,20 \pm 0,1$  mg/mL), sólidos totais ( $16,72 \pm 0,04$  mg/mL) e DPPH (89 % inibição do radical). Esse extrato foi então empregado no desenvolvimento do extrato seco por *spray-dryer* com auxílio de planejamento fatorial. O extrato seco do coco amarelo apresentou um teor médio de fenóis totais de 29,36 % e a análise por microscopia eletrônica de varredura revelou que este possui partículas esféricas e uniformes. Análise cromatográfica (CLAE-DAD) do extrato seco determinou o perfil cromatográfico, além dos teores de três fenóis bioativos, ácido clorogênico – ACLOR (0,16%); catequina – CAT (0,29 %) e epicatequina – EPI (0,19%). O extrato seco produzido foi incorporado na formulação de máscara facial *peel off*, que mostrou-se estável (período de avaliação: 21 dias; temperaturas: 27 e 45 °C), mantendo sua cor, odor, aspecto e pH. A máscara facial apresentou atividade sequestradora do radical DPPH (50 µg/mL – 86% de redução), e do ânion superóxido (50 µg/mL – 44,3% redução), que foram comparáveis a vitamina C, padrão antioxidante (89 % e 52%, respectivamente). O estudo mostrou, de maneira inédita, que o extrato líquido do coco amarelo possui características físico-químicas de maior interesse para o desenvolvimento de cosméticos em relação ao coco verde. O extrato seco do coco amarelo mostrou propriedades tecnológicas de interesse, além de atividade antioxidante, conferindo assim uma concreta aplicação cosmética da máscara facial *peel off* do coco amarelo.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*. Antioxidante. Extrato seco. Fitocosmético.

## ABSTRACT

*Cocos nucifera* L. (Arecaceae), a fruit palm, popularly known as coconut, used in various industrial sectors, from agricultural to cosmetic. Studies have demonstrated the antibacterial, antifungal and antiviral activities of coconut water (liquid albumen) and / or plant extracts. In recent years our group has invested unprecedentedly in technological and biological research on a residue (fibers / mesocarp) of coconut agroindustry, which has difficult decomposition in nature. In view of the above, the objective of the present study was to develop a phytocosmetic standardized antioxidant for facial use from coconut fiber (*Cocos nucifera*), investigating the two plant varieties. Initially it was optimized and validated spectrophotometric method for analyzes of total phenols in coconut extracts. The liquid extracts of the two varieties (yellow and green) of *C. nucifera* were produced by maceration associated or not to turbolysis, using 7% vegetable drug: solvent ratio. Among the extracts produced from the two coconut varieties, the yellow coconut hydroalcoholic extract (EHACNA) produced by maceration 24h associated with 10 min turbolysis showed the best results regarding the total phenol content - FT ( $5,20 \pm 0.1$  mg / mL), total solids ( $16.72 \pm 0.04$  mg / mL) and DPPH (89% inhibition of the radical). Then this extract was used in the development of the dry extract by spray-dryer with the aid of factorial planning. The dry extract of the yellow coconut showed an average content of total phenol content of 29.36% and the analysis by scanning electron microscopy revealed that it has spherical and uniform particles. Chromatographic analysis (CLAE-DAD) of the dry extract determined its fingerprint, besides the contents of three bioactive phenols, chlorogenic acid - ACLOR (0.16%); catechin - CAT (0.29%) and epicatechin - EPI (0.19%). The dry extract produced was incorporated into the peel off facial mask formulation, which was stable (evaluation period: 21 days, temperatures 27 and 45 ° C), maintaining its color, odor, appearance and pH. The face mask showed scavenging activity of DPPH (50 mg / mL - 86% reduction) and superoxide anion (50 / mL - 44.3% reduction), which were comparable to vitamin C, antioxidant standard (89% and 52%, respectively). The study showed, unprecedentedly, that the liquid extract of the yellow coconut has physical-chemical characteristics of greater interest for the development of cosmetics in relation to the green coconut. The yellow coconut dry extract showed technological properties of interest, in addition to antioxidant activity, thus giving a concrete cosmetic application of the facial mask peel off the yellow coconut.

**Key words:** *Cocos nucifera*. Antioxidant. Dry extract. Phytocosmetics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Visão transversal da pele e da tela subcutânea	<b>21</b>
<b>Figura 2</b>	Corte histológico de pele jovem (A) e senil (B)	<b>22</b>
<b>Figura 3</b>	<i>Cocos nucifera</i> L., variedades anãs amarela (esquerda) e verde (direita)	<b>26</b>
<b>Figura 4</b>	Estruturas constituintes do fruto de <i>Cocos nucifera</i>	<b>28</b>
<b>Figura 5</b>	Representação estrutural das substâncias químicas presentes na espécie <i>C. nucifera</i>	<b>28</b>
<b>Figura 6</b>	Fluxograma representativo do planejamento do estudo	<b>33</b>
<b>Figura 7</b>	Avaliação da influência dos volumes dos reagentes na análise de fenóis totais através do método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria: Gráfico de Pareto	<b>48</b>
<b>Figura 8</b>	Avaliação da influência do volume de Folin-Ciocalteu na análise do ácido gálico por espectrofotometria	<b>48</b>
<b>Figura 9</b>	Espectro no visível dos produtos da reação do ácido gálico e do extrato hidroalcoólico de <i>Cocos nucifera</i> (EHACNA) com o reagente de Folin-Ciocalteu	<b>49</b>
<b>Figura 10</b>	Resultados da cinética da reação do reagente de Folin-Ciocalteu e amostras de ácido gálico e EHACNA	<b>50</b>
<b>Figura 11</b>	Resultados da absorvância para as diferentes condições avaliadas no ensaio da influência da luz (Escuro/Claro)	<b>51</b>
<b>Figura 12</b>	Espectro de varredura no visível dos produtos da reação com reagente de Folin-Ciocalteu do: Ácido Gálico (4 µg/mL), Glicose (8 µg/mL), Ácido Cítrico (8 µg/mL), EHACNA com e sem adição do reagente de Folin-Ciocalteu	<b>52</b>
<b>Figura 13</b>	Curva analítica do padrão ácido gálico (1 – 6 µg/mL) obtida por espectrofotometria (785 nm)	<b>53</b>
<b>Figura 14</b>	Gráfico de resíduos do ensaio de linearidade do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria (785 nm)	<b>54</b>
<b>Figura 15</b>	Avaliação da robustez do método para análise de fenóis no extrato de <i>C. nucifera</i> : Gráfico de Pareto	<b>58</b>

<b>Figura 16</b>	Representação gráfica dos resultados obtidos com a determinação dos fenóis totais e dos sólidos totais nas variedades de coco amarelo e verde	<b>60</b>
<b>Figura 17</b>	Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres dos extratos das fibras de coco verde e amarelo obtidos por maceração associado a turbólise determinado pelo ensaio do DPPH.	<b>62</b>
<b>Figura 18</b>	Avaliação do potencial antioxidante do extrato líquido da fibra de coco amarelo obtido por maceração associado a turbólise determinado pelo ensaio do sequestro do radical O <sub>2</sub> -	<b>63</b>
<b>Figura 19</b>	Diagrama de Pareto: efeito das variáveis (fluxo de ar, temperatura e fluxo de alimentação) sobre o teor de fenóis totais no extrato seco de <i>C. nucifera</i>	<b>67</b>
<b>Figura 20</b>	Diagrama de Pareto: efeito do fluxo de alimentação sobre o teor de umidade no extrato seco de <i>C. nucifera</i>	<b>68</b>
<b>Figura 21</b>	Fluxo de alimentação versus teor de umidade no extrato seco de <i>C. nucifera</i>	<b>68</b>
<b>Figura 22</b>	Resultado do teor de fenóis totais dos pós sob as diferentes condições de temperatura avaliadas	<b>70</b>
<b>Figura 23</b>	Extrato seco da fibra de <i>C. nucifera</i> obtido por secagem em <i>spray dryer</i>	<b>70</b>
<b>Figura 24</b>	Resultado do percentual de umidade dos pós sob as diferentes condições de temperatura avaliadas	<b>71</b>
<b>Figura 25</b>	Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres do extrato hidroalcoólico e extrato seco da fibra de <i>C. nucifera</i> variedade amarelo determinado pelo ensaio do DPPH	<b>72</b>
<b>Figura 26</b>	Cromatograma do extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> variedade amarela por CLAE-DAD: análise do ácido clorogênico	<b>74</b>
<b>Figura 27</b>	Cromatograma do extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> variedade amarela por CLAE acoplado a detector de fluorescência: análise da catequina e epicatequina	<b>74</b>
<b>Figura 28</b>	Fotomicrografias dos grânulos do extrato seco de <i>Cocos nucifera</i> variedade amarelo	<b>77</b>

<b>Figura 29</b>	Formulação piloto de máscara facial <i>peel off</i> à base de extrato seco de <i>C. nucifera</i>	<b>78</b>
<b>Figura 30</b>	Avaliação do potencial antioxidante da máscara facial de ESCNA determinado pelo ensaio do DPPH	<b>80</b>
<b>Figura 31</b>	Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres da máscara facial branca e à base de extrato seco da fibra de <i>C. nucifera</i> : sequestro do ânion superóxido	<b>81</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Fatores e níveis empregados no desenho experimental fatorial 2 <sup>3</sup> com ponto central para avaliação da influência dos volumes dos reagentes	<b>33</b>
<b>Tabela 2</b>	Volumes das amostras empregadas no ensaio de exatidão e número de réplicas preparadas	<b>37</b>
<b>Tabela 3</b>	Fatores considerados críticos no ensaio de robustez e seus respectivos níveis	<b>38</b>
<b>Tabela 4</b>	Delineamento fatorial empregado na secagem do extrato por <i>spray dryer</i>	<b>40</b>
<b>Tabela 5</b>	Planejamento fatorial para produção do extrato seco de <i>C. nucifera</i>	<b>41</b>
<b>Tabela 6</b>	Condição cromatográfica utilizada no desenvolvimento do método por CLAE	<b>42</b>
<b>Tabela 7</b>	Formulação da máscara facial <i>pell off</i> produzida com extrato seco da fibra de <i>C. nucifera</i>	<b>45</b>
<b>Tabela 8</b>	Análise dos parâmetros de regressão linear dos três dias de análise	<b>53</b>
<b>Tabela 9</b>	Avaliação da precisão do método para quantificação de polifenóis no extrato de <i>Cocos nucifera</i>	<b>56</b>
<b>Tabela 10</b>	Resultados do estudo da exatidão para extrato de <i>Cocos nucifera</i>	<b>57</b>
<b>Tabela 11</b>	Resultados do estudo de robustez do método para análise de polifenóis totais no extrato de <i>C. nucifera</i>	<b>58</b>
<b>Tabela 12</b>	Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> : teor de fenóis totais e teor umidade no extrato seco de <i>Cocos nucifera</i> segundo fluxo de ar, temperatura e fluxo de alimentação no processo de secagem por <i>spray dryer</i>	<b>66</b>
<b>Tabela 13</b>	Condições operacionais padronizadas para secagem do extrato hidroalcolólico de <i>Cocos nucifera</i> variedade amarelo por <i>spray dryer</i>	<b>72</b>
<b>Tabela 14</b>	Análise da curva de calibração dos padrões catequina, epicatequina e ácido clorogênico, marcadores ativos do extrato de <i>Cocos nucifera</i>	<b>75</b>
<b>Tabela 15</b>	Avaliação do pH das formulações das máscaras faciais branca e à base de extrato seco da fibra de <i>C. nucifera</i>	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
Abs	Absorvância
ACLOR	Ácido clorogênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catequina
CEFAC	Centro de Estudos Cosméticos e Farmacêuticos
CH <sub>4</sub>	Gás metano
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COLIPA	Associação Europeia de Perfumaria, Cosmético e Artigo de Higiene Pessoal
DAD	Detector de arranjo de foto diodos
DEF	Desenho experimental fatorial
DP	Desvio padrão
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPR	Desvio padrão relativo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EHACNA	Extrato hidroalcoólico de <i>Cocos nucifera</i> amarelo
EPI	Epicatequina
EPM	Erro padrão da média
EPR	Erro padrão residual
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESCNA	Extrato seco de <i>Cocos nucifera</i> variedade amarelo
FB	Formulação branca da máscara facial
FDA	Food and Drug Administration
FExt	Formulação da máscara facial a base de extrato
FT	Fenóis totais
H	Hipoxantina
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPPC	Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético
INCI	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Azul de nitrotetrazólio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
·OH	Radical hidroxila
PVC	Policloreto de vinila
PVOH	Álcool polivinílico
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RE	Resolução específica
ST	Sólidos totais
TRISS	Tris (hidroximetil) amino metano
UV	Ultravioleta
VIT C	Ácido ascórbico
XOD	Xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 Cosméticos .....	18
1.2 Pele: estresse oxidativo e antioxidantes .....	20
1.3 Tecnologia cosmética .....	24
1.4 Coco.....	25
1.5 Justificativa .....	29
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>31</b>
2.1 Geral .....	31
2.2 Específicos .....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Materiais.....	32
3.1.1 <i>Material Vegetal</i> .....	32
3.1.2 <i>Reagentes e substâncias químicas</i> .....	32
3.1.3 <i>Local de execução</i> .....	32
3.2 Métodos.....	33
3.2.1 <i>Planejamento do estudo</i> .....	33
3.2.2 <i>Análise e otimização de método analítico para quantificação de fenóis totais no extrato de Cocos nucifera por espectrofotometria no UV/visível</i> .....	33
3.2.2.1 <i>Avaliação da influência dos volumes dos reagentes na reação do ácido gálico com reagente de Folin-Ciocalteu</i> .....	34
3.2.2.2 <i>Definição do comprimento de onda máximo para determinação da absorbância dos produtos da reação com reagente de Folin-Ciocalteu</i> .....	34
3.2.2.3 <i>Avaliação da influência do tempo e da luz na análise do ácido gálico (padrão) e de fenóis no EHACNA através do método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria no UV/visível</i> .....	35
3.2.3 <i>Validação de método analítico para a determinação de fenóis totais no extrato de Cocos nucifera por espectrofotometria no UV/visível</i> .....	35
3.2.3.1 <i>Especificidade</i> .....	36
3.2.3.2 <i>Linearidade</i> .....	36
3.2.3.3 <i>Precisão</i> .....	36
3.2.3.4 <i>Exatidão</i> .....	37
3.2.3.5 <i>Robustez</i> .....	38
3.2.4 <i>Otimização do processo extrativo da fibra de Cocos nucifera:</i> .....	38
3.2.5 <i>Desenvolvimento de método para secagem do extrato da fibra de Cocos nucifera por spray dryer</i> .....	39

3.2.6 Caracterização do extrato seco padronizado da fibra de <i>Cocos nucifera</i> .....	41
3.2.6.1 Identificação e quantificação de marcadores no extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
3.2.6.2. Análise morfológica das partículas do extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
3.2.7 Avaliação da atividade antioxidante do extrato seco padronizado da fibra de <i>Cocos nucifera</i> .....	43
3.2.7.1 Ensaio do DPPH .....	43
3.2.7.2 Avaliação do efeito sequestrador do radical ânion superóxido: .....	44
3.2.8 Desenvolvimento de formulação piloto de máscara facial peel off .....	44
3.2.9 Análise estatística .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Análise da otimização do método para quantificação de fenóis totais no extrato da fibra de <i>Cocos nucifera</i> por espectrofotometria no UV/visível.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Validação de método analítico para a determinação do teor de fenóis totais no extrato da fibra de <i>Cocos nucifera</i> por espectrofotometria no UV/visível. ....</b>	<b>51</b>
4.2.1 Especificidade.....	51
4.2.2 Linearidade.....	52
4.2.3 Precisão.....	55
4.2.4 Exatidão.....	56
4.2.5 Robustez.....	57
<b>4.3 Análise da otimização do processo extrativo da fibra de <i>Cocos nucifera</i>:.....</b>	<b>59</b>
<b>4.4 Análise do método para secagem do extrato por spray dryer: .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5 Caracterização do extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> .....</b>	<b>72</b>
4.5.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para identificação e quantificação de marcadores no extrato da fibra de <i>Cocos nucifera</i> : .....	72
4.5.2 Análise morfológica das partículas do extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	76
<b>4.6 Desenvolvimento de formulação piloto de máscara facial peel off a base de extrato seco da fibra de <i>Cocos nucifera</i> variedade amarelo.....</b>	<b>77</b>
4.6.1 Estudo de estabilidade preliminar .....	78
4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante .....	79
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Cosméticos

Há pelo menos duas décadas, os setores envolvidos com a indústria da beleza e especialmente dos segmentos de produtos cosméticos e de perfumaria demonstram expressivo crescimento em âmbito global, sendo um reflexo da participação mais ativa e estável dos consumidores (MIGUEL, 2012; EUROMONITOR 2012).

Nesse contexto, o mercado europeu apresenta-se como o maior do mundo, valorizado em cerca de € 77 bilhões em 2015, sendo os produtos de cuidados com a pele e artigos de higiene pessoal os detentores deste mercado (€ 19,9 bilhões) (COLIPA, 2017). No âmbito nacional, a indústria do setor de higiene pessoal, perfume e cosmético (HPPC) tem apresentado forte crescimento nos últimos dez anos, bem mais até que o próprio crescimento do País (9,2 % ao ano no ramo de HPPC contra 2,8 % do PIB total), destacando-se, também, os produtos para pele com maior potencial de crescimento. Conforme dados do Euromonitor de 2014, o Brasil ocupa a terceira posição no consumo mundial de artigos do setor. (ABHIPEC, 2015).

A Cosmiatria é o ramo da ciência voltada ao cuidado e melhora das características estéticas da pele sadia. Trata-se de um segmento muito utilizado pelos dermatologistas, já que além de tratar as patologias da pele também voltam seu olhar à manutenção da pele sadia do paciente. Há uma tendência atual na cosmética médica de utilizar fórmulas que são capazes de interagir cada vez mais com as estruturas da pele, promovendo mudanças na sua fisiologia, corrigindo as desordens e tratando um ou mais componentes cutâneos (BRENNER, 2007).

Segundo o FDA, cosméticos são produtos destinados a limpar, embelezar e promover atratividade. Já no Brasil, os produtos de higiene pessoal, perfumes e cosméticos (HPPC) são definidos pela ANVISA como sendo preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, como, por exemplo, pele, sistema capilar, unhas e lábios com o objetivo de limpá-los, perfuma-los, alterar sua aparência ou mantê-los em bom estado (ANVISA, RDC 211/2005).

No mercado atual, há uma variedade de produtos cosméticos para uso tópico que possui desde fins de limpeza, estimulação do metabolismo, tonificação, preservação da umidade natural até proteção do tecido cutâneo contra danos causados por radiação ultravioleta

(MITSUI, 1997; MIGUEL, 2012). As formulações para uso tópico mais utilizadas são géis, cremes, emulgéis, loções e máscaras faciais. Dentre as máscaras, destacam-se as máscaras faciais do tipo *peel-off* que são conhecidas por suas características únicas, intrínsecas ao uso de polímeros formadores de filme que, após a secagem completa, criam uma película aderente e uniforme, promovendo fácil desprendimento sem deixar nenhum resíduo na pele (DENAVERRÉ, 1975; VELASCO *et al.*, 2004). O álcool polivinílico (PVOH) é um dos excipientes mais empregados nas formulações dessa natureza e são responsáveis pela formação do filme. Após a aplicação do produto, a secagem ocorre por volta de 30 minutos, para permitir que a água evapore e que a película seja formada (TOIDA *et al.*, 1978; WILKINSON; MOORE, 1990).

Ao longo dos anos, as indústrias cosméticas vêm investindo numa linha diferenciada de produtos que são conhecidos como cosmecêuticos, cosméticos funcionais, entre outras definições. O termo cosmecêutico, criado por Dr Albert M. Klingman, apesar de não possuir uma definição oficial, abrange as preparações que produzirão efeitos cosméticos com um significativo grau de ação fisiológica, possuindo ativos que oferecerão maiores benefícios ao tratamento (CORRÊA, 2012; KLINGMAN, 2002). Como definido por Costa (2012), o cosmecêutico pode ser entendido como um produto de uso tópico que, em contato com a pele, anexos cutâneos e mucosas, pode ocasionar mudanças estruturais e/ou funcionais ao órgão em questão, sem a pretensão terapêutica, mas com a possibilidade preventiva, não restrito exclusivamente ao embelezamento (COSTA, 2012). Existe uma grande variedade de ativos considerados cosmecêuticos, como agentes clareadores, vitaminas, filtros solares, antioxidantes, minerais, hidroxiácidos, proteínas e hidratantes (BERLINCK, 2015).

Tempo, saúde e beleza constituem três categorias que sempre andaram juntas. Nos últimos anos, o cuidado com a aparência física e a busca por uma maior jovialidade estão deixando de serem consideradas atividades supérfluas, sendo, cada vez mais, procuradas por homens e mulheres (ZUCCO, 2014). Para suprir a demanda crescente por novas opções de produtos e contemplar as carências emergentes e tendências do mercado, o segmento industrial da beleza vive a necessidade contínua de pesquisas para desenvolvimento de novos insumos e inovação em toda cadeia produtiva, agregando alta tecnologia nos modelos de produção.

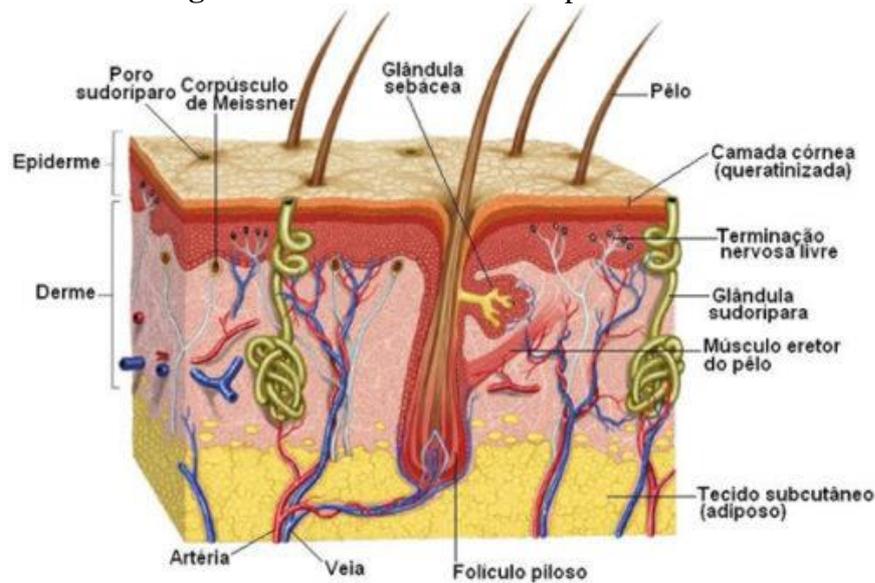
A fim de atrair os novos e exigentes consumidores, a indústria está lançando mão de ativos inovadores, naturais e sustentáveis que facilitam o dia-a-dia e, em pouco tempo, podem apresentar bons resultados, a exemplo tem-se os cosméticos anti-idade e os produtos multifuncionais que trazem vários benefícios em um só.

## 1.2 Pele: estresse oxidativo e antioxidantes

A pele é um órgão dinâmico que contém tecidos, tipos celulares e estruturas especializadas. É o maior órgão do corpo humano e possui extrema importância, não somente por representar uma barreira entre o corpo e o ambiente externo, mas também por desempenhar diversas funções necessárias a manutenção da homeostase corporal. Como principais funções exercidas pela pele, pode-se destacar: proteção contra agentes químicos, físicos e biológicos externos, absorção de substâncias, termorregulação, sensorial à estímulos externos, excreção e participação nos processos metabólicos (SIMON, 2013; TORTORA; DERRICKSON, 2017; TOFETTI; OLIVEIRA, 2010).

A estrutura da pele humana é composta por duas camadas (derme e epiderme) e por uma tela subcutânea (**Figura 1**). A epiderme origina-se na ectoderme e é a camada mais externa da pele. Apesar de não ser vascularizada, apresenta boa taxa de renovação, renovando-se constantemente a cada quatro semanas. Suas células se diferenciam para cumprir funções protetoras, como a síntese de queratina e de melanina. A derme é a segunda porção mais interna da pele e é formada principalmente por tecido conectivo contendo fibras de colágeno, elastina e reticulina. Células adiposas, folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas são encontradas nesta camada. A hipoderme ou a tela subcutânea é formada por tecido gorduroso que, por sua disposição, possui propriedades protetoras contra traumatismos e variações térmicas. A rede vascular profunda encontra-se na hipoderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; TORTORA; DERRICKSON, 2017).

**Figura 1:** Visão transversal da pele humana



Fonte: (<http://www.opet.com.br/faculdade/revista-estetica-cosmetica/index.php/2016/11/16/sistema-tegumentar>  
Acesso em: 20 set. 2017).

Por ser a barreira mais externa do corpo, a pele é cronicamente exposta a estímulos endógenos e ambientais. É constantemente afetada por vários agentes nocivos, como por exemplo, radiação ultravioleta, compostos orgânicos voláteis, fumaça do cigarro, poluição atmosférica que acabam promovendo o envelhecimento cutâneo extrínseco (BICKERS; ATHAR, 2006; DZIALO *et al.*, 2016). Além disso, alguns autores citam a influência do estilo de vida, a dieta carente em nutrientes e o estresse emocional como fatores que possam contribuir para o envelhecimento mais rápido da pele (SCHALKA *et al.*, 2016; CHEN; LYGA, 2014).

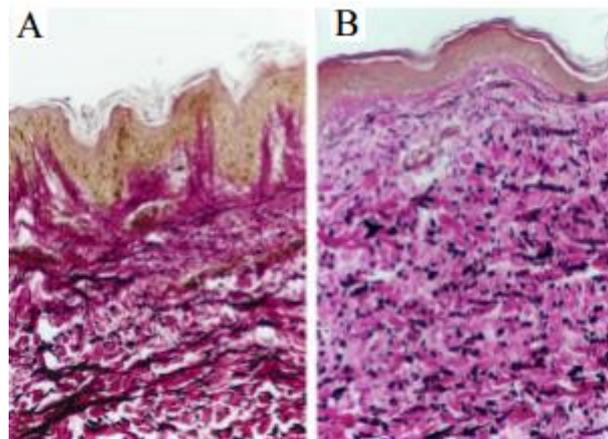
O envelhecimento cutâneo é um processo complexo que envolve alterações estruturais, celulares e relacionadas à matriz extracelular. O envelhecimento intrínseco, ou envelhecimento cronológico, envolve a diminuição da proliferação celular, alterações relacionadas a modificações do material genético e alterações proteicas, sendo a atrofia cutânea, causada pela redução da atividade metabólica das células (queratinócitos, melanócitos, fibroblastos e células de Langerhans), umas das principais manifestações visualizadas (ZOUBOULIS MAKRANTONAKI, 2011; RABE *et al.*, 2006).

Além do envelhecimento intrínseco, resultante das modificações metabólicas e estruturais decorrentes do tempo, a pele está suscetível ao envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento como consequência dos danos ambientais a que é exposta constantemente (TSOURELI-NIKITA *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ, 2008).

O fotoenvelhecimento consiste nos efeitos da radiação solar somados ao envelhecimento intrínseco da pele. Assim, as alterações bioquímicas resultantes da exposição à radiação ultravioleta manifestam-se na pele como rugas finas e profundas, flacidez, fragilidade, rugosidade, alteração no padrão de pigmentação, cicatrização prejudicada e telangiectasia (TSOURELI-NIKITA *et al.*, 2006). A longo prazo, a exposição excessiva à radiação UV também pode desenvolver neoplasias malignas como os melanomas (KIM; ARMSTRONG, 2012).

As alterações cutâneas decorrentes do envelhecimento se dão a nível de epiderme, derme e hipoderme. O adelgaçamento da pele, geralmente é a primeira manifestação do processo de envelhecimento cutâneo (BAUMANN, 2004). Podem ser observadas descamações, fissuras e ressecamento na epiderme e alterações na síntese do colágeno e elastina na derme (**Figura 2**). Já na hipoderme observa-se redução da camada adiposa, favorecendo o enrugamento e o risco de lesões (MORASTONI *et al.*, 2010).

**Figura 2:** Corte histológico de pele jovem (A) e senil (B)



Fonte: Oriá *et al.*, 2003

As lâminas foram coradas por tricômio de Van Gieson-elastina no qual as fibras elásticas são coradas em preto. Nota-se a fragmentação das fibras elásticas ao longo da derme com o envelhecimento. Na derme superficial, o aparelho elástico perdeu quase completamente sua disposição vertical na pele senil.

Diante das sucessivas exposições que a pele é submetida, há um estímulo contínuo para a produção nociva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que sobrecarregam os sistemas de defesa antioxidantes, gerando um desequilíbrio entre os sistemas do organismo. Conseqüentemente, configura-se um quadro de estresse oxidativo que resulta em severos danos celulares e teciduais. Radicais oxigênio e outras espécies derivadas de oxigênio como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são exemplos de

EROs presentes nessas configuração de estresse (BARREIROS; DAVID, 2006; HALLIWELL, 2006; SANTOS, 2007; BALOGH, 2011). Estudos apontam que o estresse oxidativo gerado por exposições excessivas à radiação UV induz a iniciação, promoção e progressão do envelhecimento cutâneo. (SVOBODOVÁ, 2003).

Em condições normais, as EROs são mantidas em baixas concentrações pelo sistema de defesa antioxidante corporal. Este pode ser enzimático endógeno como, por exemplo, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase; não enzimático endógeno, como a glutathione, o NADPH e a coenzima Q (DUTHIE; BROWN, 1994) ou exógeno como, por exemplo,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos que podem ser adquiridos a partir da dieta (MACHLIN, 1992; PIETTA, 2000; BARREIROS; DAVID, 2006).

Os compostos fenólicos possuem como núcleo principal um anel aromático ligado a uma hidroxila e, na maioria dos casos, demais grupos funcionais ligados ao anel. As propriedades biológicas variáveis dos fenóis resultam do padrão e grau desses substituintes (DEL RIO *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2010; DAI *et al.*, 2010; BALASUNDRAMA *et al.*, 2006).

Os fenóis são metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas conhecidos como uma das principais classes de produtos naturais em termos de suas propriedades funcionais, pois tratam-se de compostos bastante versáteis exibindo características anti-inflamatória, anticarcinogênica e de especial interesse, antioxidante, atuando no bloqueio da oxidação lipídica, na inibição do crescimento microbiológico e na prevenção de doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, doença de Parkinson e Alzheimer (MAZZA, 1998; ZOUMPANIOTI *et al.*, 2010; VALKO *et al.*, 2007; SIES *et al.*, 2010). Os fenóis como também o ácido ascórbico, a vitamina E, a glutathione e outras enzimas antioxidantes são produzidos em resposta aos danos gerados em condições oxidativas (DREHER; THIELE, 2010).

O mercado oferece uma grande variedade de produtos cosméticos que contém agentes antioxidantes. As substâncias ativas nestas formulações podem ser compostos isolados, como as vitaminas, ou misturas, como extratos vegetais ricos em polifenóis, flavonoides, triterpenos entre outros (RATZ-LYKO *et al.*, 2012).

A aplicação tópica de ácidos fenólicos como agentes antioxidantes é de suma importância no setor industrial cosmético, já que estes compostos atuam tanto na redução dos danos gerados pelo estresse oxidativo, tornando-se ingredientes chave em formulações

cosméticas, quanto na proteção da decomposição oxidativa dos componentes da formulação, prolongando seu prazo de validade (BARREIROS; DAVID, 2006).

Ácidos fenólicos como ácido cinâmico, cafeico e ferúlico apresentam atividade fotoprotetora, anti-envelhecimento, anti-inflamatória e anticancerígena (SRINIVASAN *et al.*, 2006; ALIAS *et al.*, 2009). Outros estudos apontam também características antioxidantes para os ácidos clorogênico e gálico, bem como para os flavonoides quercetina e catequina (KASIOTIS *et al.*, 2017; MATSUBARA *et al.*, 2017).

### 1.3 Tecnologia cosmética

O mercado da beleza para cosméticos a base de produtos naturais, os conhecidos fitocosméticos, segue crescimento inquestionável no mundo todo e vem ganhando cada vez mais o espaço dos cosméticos “sintéticos”.

Nesse contexto, o Brasil destaca-se como um dos países com maior diversidade natural do mundo em função da sua extensão territorial, possuindo a Caatinga, o Cerrado, a Amazônia, a Mata Atlântica além de um território ainda não totalmente explorado (ZUCCO *et al.*, 2014). Alguns das espécies brasileiras mais utilizadas e que despertam o interesse de outros países são *Euterpe oleracea* (açáí), *Paullinia cupana* (guaraná), *Myrciaria dubia* (camu camu), *Bertholetia excelsa* (castanha-do-pará), *Carapa guianensis* (andiroba) e recentemente o *Cocos nucifera* (coco), por possuir, dentre outras propriedades, atividade antioxidante característica muito desejada no universo dos cosméticos. Entre os exemplos de empresas nacionais e internacionais que desenvolveram cosméticos a base de produtos naturais brasileiros estão a Natura®, com a linha Ekos que utiliza produtos com ativos extraídos da região amazônica de maneira sustentável, e L'Occitane au Brésil® um braço brasileiro da empresa francesa L'Occitane® que desenvolveu cosméticos a base de cumaru, jenipapo, mandacaru, entre outros (ABIHPEC, 2013b).

Entretanto, trabalhar com matérias-primas naturais ainda é um desafio, pois necessita-se de um rígido controle de qualidade para padronizar os ativos, por meio do uso de metodologias validadas de análise, e garantir a manutenção de suas propriedades (SANFELICE; TRUITI, 2010). A validação de uma metodologia é o ato que atestará que

qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduzirá aos resultados esperados (ANVISA, RDC 35/2003).

Nesse sentido, para que os compostos naturais possam ser amplamente utilizados como matérias primas cosméticas, estes devem estar em formas padronizadas, garantindo a constância do teor dos ativos, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, definição de marcadores e fornecimento dos requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos pelos órgãos reguladores.

No âmbito tecnológico, a produção de extratos secos padronizados está em ascensão e representa um atrativo para a indústria por apresentar inúmeras vantagens frente à forma fluida convencional. Desde que preparado adequadamente, o extrato na forma de pó proporciona uma maior facilidade de padronização dos princípios ativos, apresenta maior estabilidade e facilidade de manipulação além de uma dosagem mais precisa do ativo. Todas essas características são responsáveis pelo aumento no interesse no uso de pós como forma intermediária para desenvolvimento de produtos cosméticos (SENNA *et al.*, 1997; ARARUNA, 2013).

Para a obtenção de extratos secos, utiliza-se na indústria diversos sistemas de tratamentos de sólidos dentre eles está a secagem por liofilização e a secagem por *spray dryer* ou secagem por atomização (ARARUNA, 2008).

O processo de secagem por *spray dryer* ou atomização consiste na transformação de um fluxo bombeável (solução, suspensão, pasta) em produto seco através de um único processo de secagem (MASTERS, 1985). A vaporização do líquido acontece a partir da formação de uma corrente líquida em pequenas gotas (atomização) que entram em contato com uma quantidade de ar quente suficiente para suprir o calor latente de vaporização. O tempo de residência do material dentro do equipamento geralmente é curto, normalmente de 3 a 30 segundos (DITTMAN; ZEMANSK, 1981).

#### 1.4 Coco

*Cocos nucifera* L. (**Figura 3**) pertence à classe Monocotyledoneae, ordem Palmales, família Arecaceae (antiga família Palmae), subfamília Cocoideae e gênero *Cocos*. Esse gênero é monoespecífico, apresentando apenas a espécie *Cocos nucifera* L., constituída por dois grupos principais: nana (coqueiro anão) e *typica* (coqueiro gigante). Do cruzamento

dessas duas variedades, obtém-se híbridos intervarietais que apresentam características importantes para a exploração do coqueiro no Brasil (ARAGÃO, 2002; LOIOLA, 2009; ARAGÃO 2010).

**Figura 3-** *Cocos nucifera* L., variedades anãs amarela (esquerda) e verde (direita)



Fonte: Autora

A espécie *Cocos nucifera*, conhecida como coco, é uma palmeira originária das ilhas de clima tropical e subtropical do Oceano Pacífico, principalmente do litoral do Sudeste Asiático (Malásia e Indonésia). A literatura reporta que a espécie *C. nucifera* pode ser encontrada em mais de 200 países diferentes (FOALE; HARRIES, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010), no entanto, a exploração comercial do coco se concentra, aproximadamente, em 90 países devido a melhores condições de cultivo como solos arenosos, intensa radiação solar, umidade e boa precipitação (ARAGÃO *et al.*, 2010). No Brasil, o coqueiro é cultivado predominantemente no litoral do Nordeste, região onde se concentra as principais agroindústrias de coco, destacando-se o estado da Bahia como maior produtor do fruto com 629.823 frutos, seguido pelo Ceará e Pernambuco (249.320 e 160.336 frutos, respectivamente) (AGRIANUAL, 2012; MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2011).

O coqueiro é considerado uma das plantas mais importantes do mundo, pois todas as suas partes são utilizáveis na produção de diversos produtos. A utilidade econômica do coco é bastante diversificada, destacando-se a utilização da água (albúmen líquido) que é consumida

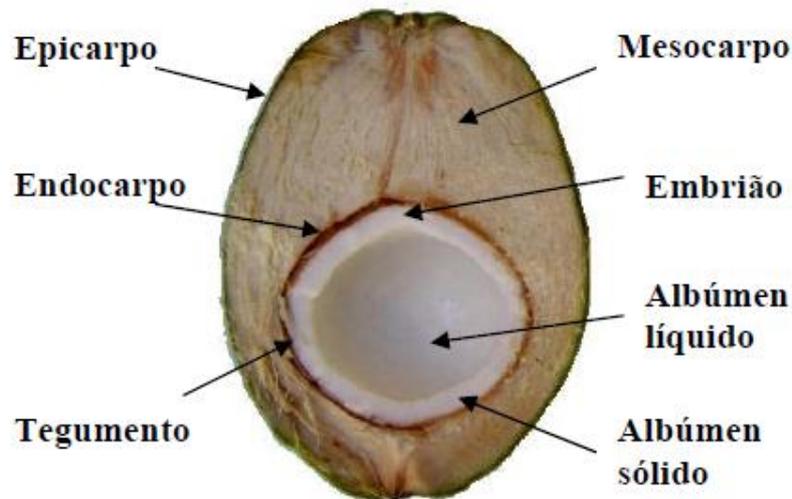
abundantemente e do albúmen sólido do qual podem ser preparados doce e leite de coco, por exemplo. Um produto que vem se destacando nos últimos anos é o óleo de coco, o qual está sendo bastante indicado por nutricionistas como alternativa as manteigas e óleos vegetais, além de sua aplicação na linha cosmética na qual é usado principalmente em cosméticos capilares. Assim, o coqueiro como um todo além de fonte de alimento e bebida também é fonte de fibras podendo servir como material de construção e, até mesmo, objeto de decoração (CARVALHO, 200; FERREIRA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2005; SILVA, 2008).

Nosso grupo tem investido ao longo dos últimos cinco anos em pesquisas com esse material. Anteriormente, desenvolvemos um método para identificar, por cromatografia líquida de alta eficiência, compostos ativos no extrato da casca de coco, além do método para dosagem de fenóis totais. Estas metodologias foram utilizadas em trabalhos de pesquisadores colaboradores (LIMA, 2015; LIMA *et al.*, 2016) que demonstraram que o extrato de coco possui atividades antioxidante, antidepressiva, neurotrófica e neuroprotetora em modelos murinos comportamentais.

O processamento do coco é uma atividade que gera resíduos sólidos, pois após retirar-se o albúmen de interesse, despreza-se as partes fibrosas sem nenhuma forma de reaproveitamento. Este material é de difícil decomposição, levando cerca de 8 anos para sua total degradação na natureza (CARRIJO *et al.*, 2002). Dessa forma, as cacas de coco descartadas acumulam-se no meio ambiente, gerando sérios prejuízos como, por exemplo, a emissão de gás metano (CH<sub>4</sub>) um dos gases que contribui para o efeito estufa (ROCHA *et al.*, 2010).

A casca do coco (epicarpo e mesocarpo – **Figura 4**) é constituída por uma fração de fibra (que corresponde cerca de 85% do peso bruto do fruto) e uma fração de pó que se apresenta agregada às fibras e é composta, principalmente, de lignina e celulose, sendo esta uma rica fonte de substâncias fenólicas (ROSA *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2008).

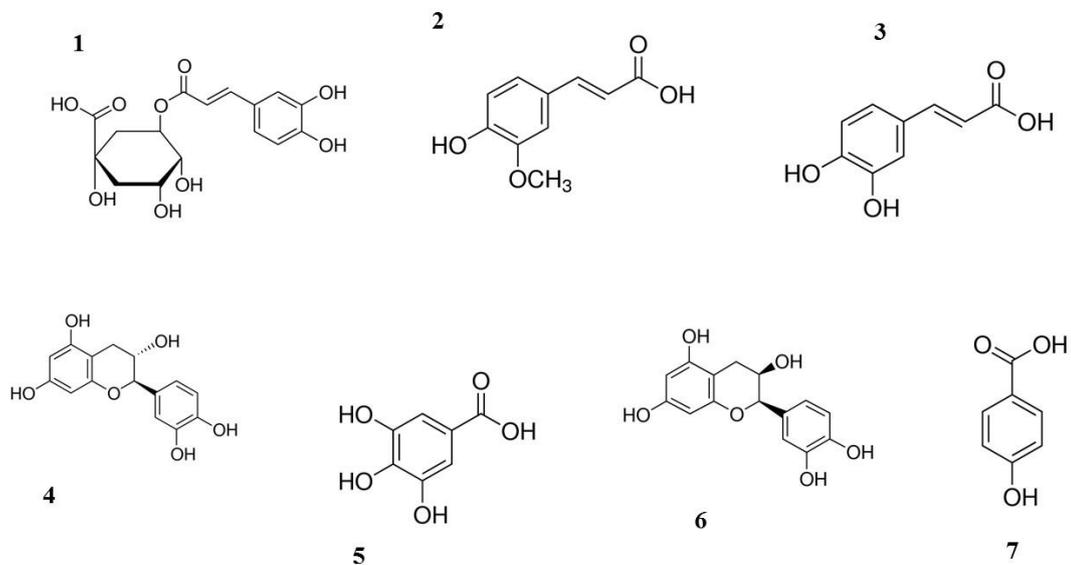
**Figura 4:** Estruturas constituintes do fruto de *Cocos nucifera*



Fonte: BENASSI, 2006

Estudos químicos realizados em extratos da fibra do coco revelaram a presença de polifenóis como catequinas, epicatequinas, taninos condensados, ácido clorogênico e flavonoides, além de  $\alpha$ -celulose, hemicelulose e lignina (CHARKRABORTY; MITRA, 2008; ESQUEZANI *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2007) (**Figura 5**).

**Figura 5** – Representação estrutural das substâncias químicas presentes na espécie *C. nucifera*.



1. Ácido clorogênico; 2. Ácido ferúlico; 3. Ácido cafeico; 4. (+) – Catequina; 5. Ácido gálico; 6. (-) – Epicatequina; 7. Ácido 4-hidroxibenzoico

Já em relação aos efeitos farmacológicos de *Cocos nucifera*, Singla *et al.* (2011) demonstraram forte atividade do extrato do endocarpo contra os microorganismos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, por meio do teste de difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM). Fonseca *et al.* (2009) demonstraram que o óleo essencial, obtido por hidrodestilação, apresentou atividade sequestradora de radicais livres avaliado através da metodologia de sequestro do radical DPPH. Em suas observações, Mendonça-Filho *et al.* (2004) demonstraram que o extrato da casca de *C. nucifera* apresentou excelente efeito leishmanicida *in vitro*. O extrato de acetato de etila produzido a partir da fibra da casca do coco apresentou também atividades antiviral, antimicrobiana (ESQUENAZI *et al.*, 2002), imunomoduladora e pró-inflamatória (SILVA, 2008). Já o extrato aquoso da planta demonstrou possuir atividade anti-neoplásica em células leucêmicas de linhagem K562 (KOSCHEK *et al.*, 2007), antioxidante e efeito antinociceptivo *in vivo* (ALVIANO *et al.*, 2004).

## 1.5 Justificativa

Existe uma tendência atual e grande interesse de aproveitamento da biodiversidade regional, com ênfase no seu uso sustentável. O fortalecimento industrial dos chamados fitoprodutos pode criar condições que permitam, a médio e longo prazo, investir na exploração racional da biodiversidade brasileira para o desenvolvimento de produtos de maior valor agregado, o que pode contribuir para a identificação de oportunidades no âmbito do agronegócio (BARREIROS; DAVID, 2006; ABIHPEC, 2013).

Nesse contexto destaca-se a espécie *Cocos nucifera*, palmeira bastante difundida no litoral do Nordeste brasileiro, onde ocorre as variedades amarela e verde popularmente conhecida como coqueiro (ARAGÃO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2010). O fruto do coqueiro, em especial seu albúmen tem sido extensivamente explorado pela indústria alimentícia, que tem gerado grande quantidade de resíduos, como a fibra do coco. Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados visando o aproveitamento desse material vegetal residual, onde estudos químicos com extratos da fibra de *C. nucifera* evidenciaram a presença de vários compostos fenólicos, como, por exemplo, catequina, ácido ferúlico, epicatequina e ácido clorogênico (RODRIGUES *et al.*, 2007; CHARKRABORTY; MITRA, 2008; ESQUEZANI *et al.*, 2002). Estudos anteriores (FREITAS, 2015; LIMA, 2015; LIMA *et al.*, 2016) realizados por nosso

grupo de pesquisa, mostraram que o extrato hidroalcoólico da fibra do coco apresentou atividades antioxidante, antidepressiva e neuroprotetora. Outros estudos (ESQUENAZI *et al.*, 2002; KOSCHEK *et al.*, 2007; SILVA, 2008; FONSECA *et al.*, 2009; MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2004) também revelaram que extratos com a casca do coco possuem propriedades leishmanicida, antimicrobiana, imunomoduladora, antineoplásica e antinociceptiva. Ainda, nosso laboratório já determinou e caracterizou o método de preparo da droga vegetal a partir da fibra do coco, com determinação de parâmetros de interesse para o controle de qualidade dessa matéria-prima (FREITAS, 2015).

O coqueiro é umas das plantas de maior relevância econômica no mundo, pois todas as suas partes são empregadas na produção de artigos em vários setores industriais, desde alimentício até cosmético (CARVALHO, 2000; FERREIRA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2005; SILVA, 2008).

O uso de cosméticos pela população tem sido cada vez mais extensivo, onde são empregados sob diferentes formas para manter a higiene e aumentar a beleza. Segundo dados do Euromonitor, em 2014 o Brasil ocupou a terceira posição no consumo mundial de cosméticos (ABHIPEC, 2015), e dentre os produtos mais utilizados estão os cosméticos de uso facial, cujo o emprego de ativos vegetais em suas formulações é uma realidade.

Diante das características químicas e biológicas até então determinadas para a fibra de *Cocos nucifera* e considerando que a sua inclusão no horizonte de negócios pode gerar oportunidades de maneira sustentável para a região, é oportuno investir no desenvolvimento de produtos derivados e acabados a partir da planta, visando seu emprego como insumo fitocosmético antioxidante.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral

Desenvolver um insumo fitocosmético padronizado com ação antioxidante para uso facial a partir da fibra de coco (*Cocos nucifera*), empregando uma avaliação comparativa entre as variedades de coco amarelo e verde.

### 2.2 Específicos

- Otimizar e validar metodologia analítica para quantificação de fenóis totais por espectrofotometria;
- Desenvolver extrato líquido das variedades de coco monitorado pela análise de fenóis totais e teor de resíduo sólido;
- Desenvolver extrato seco (*spray dryer*) padronizado de coco a partir do extrato líquido selecionado, empregando como resposta o teor de fenóis totais e teor de umidade;
- Realizar caracterizações adicionais do extrato seco incluindo análises morfológica (microscopia eletrônica de varredura) e cromatográfica (CLAE);
- Investigar o efeito antioxidante/ sequestrador de radicais livres do extrato seco padronizado de coco;
- Desenvolver formulação piloto para a máscara facial *peel off* a partir do extrato seco padronizado do coco.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### ***3.1.1 Material Vegetal***

As cascas de *Cocos nucifera* Linn (Arecaceae), variedades verde e amarela, foram coletadas no município de Pindoretama, Ceará. Exsiccatas das espécies foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

##### ***3.1.2 Reagentes e substâncias químicas***

Carbonato de sódio (Proquimios, Brasil); radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH),  $\alpha$ -tocoferol, brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), Triton X-100, dimetilsulfóxido (DMSO),  $\pm$  catequina, epicatequina, ácido clorogênico, quercetina, hipoxantina, xantina oxidase, azul de nitrotetrazólio (NBT) (Sigma, EUA); TRISS, reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica, Brasil), metanol, etanol (Vetec, Brasil), acetonitrila (Tedia, EUA), álcool etílico comercial absoluto.

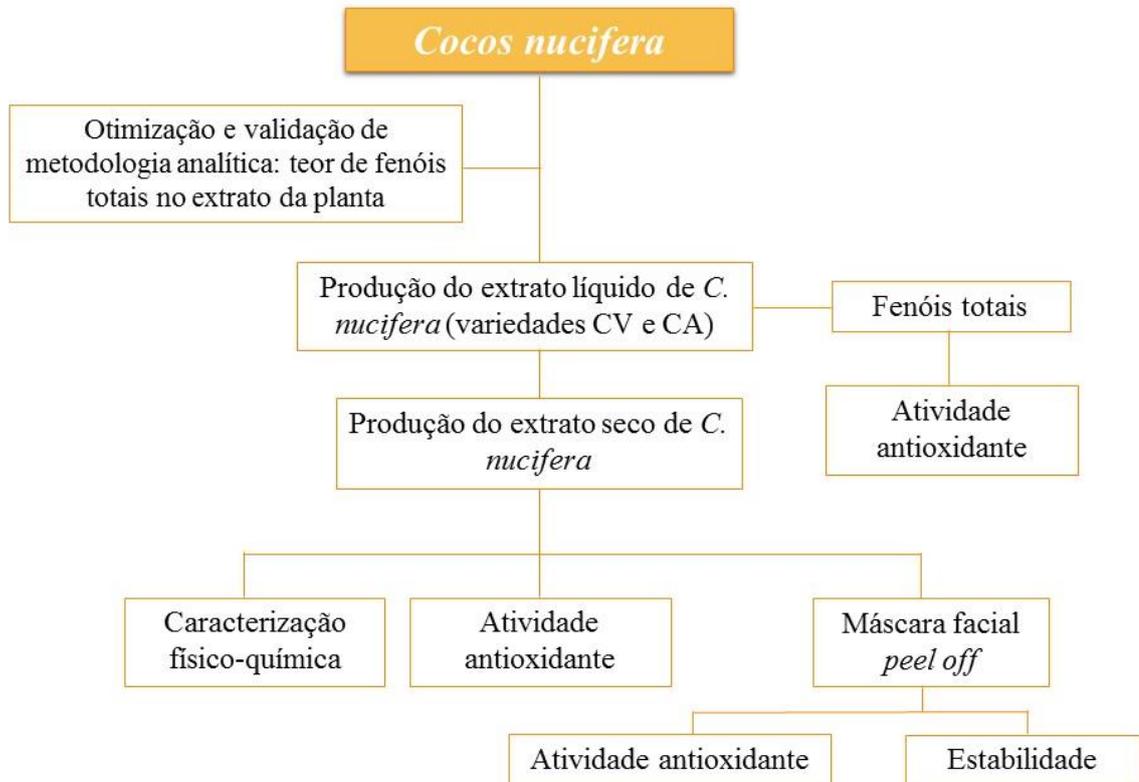
##### ***3.1.3 Local de execução***

Todas as etapas do estudo foram desenvolvidas no laboratório do Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) – Universidade Federal do Ceará.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Planejamento do estudo

**Figura 6** – Fluxograma representativo do planejamento do estudo.



### 3.2.2 Análise e otimização de método analítico para quantificação de fenóis totais no extrato de *Cocos nucifera* por espectrofotometria no UV/visível

A análise foi conduzida através do método de Folin-Ciocalteu, empregando ácido gálico como padrão de trabalho. Foi tomado como ponto de partida a metodologia descrita por MAKAR (2000). Os estudos para otimização do método incluíram a avaliação da influência dos volumes dos reagentes ( $\text{H}_2\text{O}$ , reagente de Folin e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%), do comprimento de onda máximo, do tempo transcorrido entre a adição do carbonato e a determinação da absorvância e

da influência da luz ambiente na reação. Para tanto, foi empregado, em algumas circunstâncias, desenho experimental fatorial (DEF) com ponto central.

### 3.2.2.1 Avaliação da influência dos volumes dos reagentes na reação do ácido gálico com reagente de Folin-Ciocalteu

Na **Tabela 1** estão descritos os fatores e níveis (-1, 0, +1) das variáveis investigadas (volume dos reagentes) empregadas no desenho experimental fatorial.

**Tabela 1.** Fatores e níveis empregados no desenho experimental fatorial  $2^3$  com ponto central para avaliação da influência dos volumes dos reagentes.

<b>Fator</b>	<b>Nível Baixo (-)</b>	<b>Nível Central (0)</b>	<b>Nível Alto (+)</b>
Água (mL)	3,0	4,0	5,0
Folin-Ciocalteu ( $\mu$ L)	200	250	300
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (mL)	2,5	3,0	3,5

A reação ocorreu seguindo os seguintes passos em balão volumétrico de 10 mL:

1. Adição de água;
2. Adição de ácido gálico;
3. Adição do reagente de Folin-Ciocalteu seguida por agitação manual;
4. Adição de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%;
5. Volume do balão completado com água;
6. Após 30 min, ao abrigo da luz, a absorbância será medida em 725 nm.

### 3.2.2.2 Definição do comprimento de onda máximo para determinação da absorbância dos produtos da reação com reagente de Folin-Ciocalteu

Para a definição do comprimento de onda máximo, soluções de ácido gálico e de extrato hidroalcoólico de *Cocos nucifera* (EHACNA) foram submetidas à reação com reagente de Folin-Ciocalteu e os respectivos espectros no visível foram obtidos na faixa de 400-900 nm.

### ***3.2.2.3 Avaliação da influência do tempo e da luz na análise do ácido gálico (padrão) e de fenóis no EHACNA através do método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria no UV/visível***

Para avaliar a influência do tempo na reação, após 2,0 min da adição do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a absorbância das soluções foi medida em 785 nm em intervalos de 1 min durante 60 min (modo cinético do programa Visione® do espectrofotômetro).

Na avaliação da influência da luz no método analítico foram registradas as absorvâncias das soluções de ácido gálico (3 ou 4 µg/mL) após a incubação do sistema na presença de luz ou ao abrigo da luz. Os resultados foram expressos como média ± DP.

### ***3.2.3 Validação de método analítico para a determinação de fenóis totais no extrato de Cocos nucifera por espectrofotometria no UV/visível***

Para a determinação do teor de fenóis totais nos extratos de *C. nucifera* foi validada metodologia analítica por espectrofotometria no UV/visível, conforme preconizado na resolução RE n° 899 – categoria I da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). Foram avaliados os parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos de *C. nucifera* foi determinado empregando-se o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que utiliza ácido gálico como droga padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é composto por uma solução de íons poliméricos complexos, formados a partir dos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdídico (coloração amarelada), que promove a oxidação de compostos fenólicos, em meio básico, produzindo uma solução de coloração azul (SINGLETON, 1965; EVERETTE *et al.*, 2010; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009).

Alíquotas do extrato foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL contendo 4 mL de água ultra-pura e 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Em seguida, o meio foi alcalinizado com 3,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10% e o volume do balão foi ajustado com água ultra-pura. Decorridos 20 minutos após adição do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a temperatura ambiente, a absorbância da solução foi medida em 785 nm (MAKKAR, 2000; SOUSA *et al.*, 2007). O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da amostra contra uma curva de calibração construída com o padrão ácido gálico (1-6 µg/mL).

### 3.2.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos espectros, na faixa de 400 – 900 nm, de soluções de ácido gálico (padrão - 4,0 µg/mL), glicose (8,0 µg/mL), ácido cítrico (8,0 µg/mL), EHACNA com e sem o reativo de Folin-Ciocalteu. As soluções analíticas do EHACNA foram preparadas como descrito no item Precisão, exceto para a solução de EHACNA sem reativo o qual não foi adicionado o reagente de Folin- Ciocalteu.

### 3.2.3.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade, foram preparadas 3 soluções de ácido gálico que deram origem a três curvas padrão com seis concentrações cada (1; 2; 3; 4; 5; 6 µg/mL). As soluções foram preparadas transferindo-se 4 mL de água ultra-pura para balão volumétrico de 10 mL, diferentes alíquotas da solução de ácido gálico (25, 50, 75, 100, 125 e 150 µL), 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%. foi completado o volume com água ultra-pura e 20 minutos após a adição do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a absorvância das soluções foi medida, em duplicata, a 785 nm. A linearidade foi confirmada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, através das absorvâncias médias e das concentrações das soluções de ácido gálico obtidas nas três curvas padrão.

### 3.2.3.3 Precisão

Na determinação da precisão, as amostras foram preparadas transferindo-se 1 mL do EHACNA para balão volumétrico de 25 mL (solução 1) e completando-se o volume com água. Em balão volumétrico de 10 mL foi adicionado 4 mL de água ultra-pura, transferido 100 µL da solução 1 e adicionado sequencialmente 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%, completando-se o volume com água ultra-pura. 20 minutos após a adição do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a absorvância das soluções foi medida, em duplicata, a 785 nm. A concentração de fenóis totais no EHACNA foi calculada com auxílio de curva padrão de ácido gálico preparada conforme descrito no item Linearidade.

A repetibilidade do método foi determinada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) obtido na análise de 7 réplicas das soluções analíticas obtidas a partir do EHACNA. A precisão intermediária foi avaliada através da determinação do DPR dos ensaios

de repetibilidade realizados em três dias por dois analistas diferentes ( $n = 21$ ). Além disso, os resultados das variâncias dos dias de repetibilidade foram comparados pelo teste *de Bartlett*.

### 3.2.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através da avaliação da taxa de recuperação de concentrações conhecidas de solução de ácido gálico adicionadas à solução de EHACNA. A amostra foi preparada transferindo-se 1 mL do EHACNA para balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água ultra-pura. A **Tabela 2** apresenta os volumes da solução de EHACNA e da solução de ácido gálico a serem adicionados para os diferentes níveis do ensaio de exatidão. Posteriormente, foi dado prosseguimento a reação com adição sequencial de 250  $\mu$ L de reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%. O volume do balão volumétrico de 10 mL foi completado com água ultra-pura. 20 minutos após a adição do  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a absorvância das soluções foi medida, em duplicata, a 785 nm.

**Tabela 2.** Volumes das amostras empregadas no ensaio de exatidão e número de réplicas preparadas.

Amostra	Solução EHACNA ( $\mu$ L)	Solução de ácido gálico ( $\mu$ L)	Nº réplicas
Nível Baixo	50,0	75	3
Nível Médio	50,0	100	3
Nível Alto	50,0	125	3
EHACNA	50,0	0	2
Padrão	0,0	100	2

EHACNA: extrato hidroalcoólico de *Cocos nucifera* variedade amarela

A recuperação foi calculada conforme **Equação 1**.

$$R (\%) = \frac{C_{T+P} - C_T}{C_P} \times F \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: R (%) é o percentual de recuperação do ácido gálico;  $C_{T+P}$  é a concentração das soluções nos diferentes níveis;  $C_T$  é a concentração da solução analítica contendo EHACNA;  $C_P$  é a concentração da solução analítica de ácido gálico;  $F$  é um fator de correção obtido pela razão

do volume de solução de ácido gálico adicionado na solução padrão e nas soluções de diferentes níveis.

### 3.2.3.5 Robustez

Para a avaliação da robustez foram realizadas variações deliberadas em fatores considerados críticos para a metodologia (volume de água, Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%). Foi empregado desenho experimental fatorial (2<sup>3</sup>– dois níveis e três fatores), incluindo o ponto central. A variação nos volumes dos reagentes (água, Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%) foi determinada com auxílio dos certificados de calibração das pipetas automáticas utilizadas na validação do método analítico. Os limites estabelecidos consideraram o erro de medida de cada pipeta ao qual foi multiplicado um fator de 3. Além disso, por conveniência, os valores serão ampliados para obtenção dos volumes descritos na **Tabela 3**. As amostras foram preparadas como descrito no item Precisão, exceto pelas variações estabelecidas na **Tabela 3**. Cada preparação foi realizada em duplicata. A robustez foi avaliada pela medida do DPR dos resultados obtidos experimentalmente. Além disso, análise fatorial foi realizada para determinação da influência dos fatores avaliados (volume de água, Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%).

**Tabela 3** - Fatores considerados críticos no ensaio de robustez e seus respectivos níveis.

Fatores	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Volume de água (mL)	3,97	4,00	4,03
Volume de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (mL)	2,97	3,00	3,03
Volume de reagente Folin-Ciocalteu (µL)	245	250	255

### 3.2.4 Otimização do processo extrativo da fibra de *Cocos nucifera*:

Foram avaliadas diferentes condições de extração da fibra de *Cocos nucifera* variedades amarelo e verde, a fim de maximizar o teor de fenóis totais no extrato. Para tanto,

as cascas (epicarpo e mesocarpo) dos cocos passaram por tratamento prévio para produção da droga vegetal. As cascas foram cortadas em tiras de cerca de 1,0 cm e submetidas à secagem em estufa com renovação e circulação de ar a 60 °C durante 20 horas.

Foi avaliada a influência do método extrativo sob o teor de fenóis totais nos extratos de coco verde e amarelo, empregando-se técnicas extrativas de menor custo. Foram produzidos extratos por maceração (6h), maceração (24h) e maceração (24h) associada a turbólise (10, 20 ou 30 min).

A condição extrativa que proporcionar um extrato da fibra de *C. nucifera* com maior teor de fenóis em um menor tempo e custo possíveis compôs o método extrativo de escolha para produção do extrato líquido de coco. Em seguida, foi dado prosseguimento ao estudo, realizando a secagem deste extrato por *spray dryer*.

### ***3.2.5 Desenvolvimento de método para secagem do extrato da fibra de Cocos nucifera por spray dryer***

O processo de secagem por atomização consiste na transformação de um fluxo bombeável (solução, suspensão, pasta ou lama) em produto seco por um único processo de secagem (MASTERS, 1985). A vaporização do líquido acontece a partir da formação de uma corrente líquida em pequenas gotas (atomização) que entram em contato com uma quantidade de ar quente suficiente para suprir o calor latente de vaporização. O tempo de residência do material dentro do equipamento geralmente é curto, normalmente de 3 a 30 segundos (DITTMAN; ZEMANSK, 1981).

Inicialmente foi realizada uma avaliação preliminar de secagem do extrato em estufa convencional, avaliando o comportamento de diferentes composições de adjuvantes de secagem. Para tanto foram utilizadas substâncias comumente empregadas no processo de secagem por *spray dryer*: dióxido de silício coloidal ou aerosil (10, 20 ou 30 %), celulose microcristalina (10, 20 ou 30 %), goma xantana (10, 20 ou 30 %), aerosil + celulose (10/20 ou 15/5 %) e aerosil + goma xantana (10/20 ou 15/5 %). As dispersões foram agitadas e transferidas para placas de Petri, de modo a formar uma fina camada sob a superfície da mesma, e foram mantidas em estufa a 105°C por 1 hora (FONSECA, 2009). Os materiais secos foram avaliados quanto ao aspecto e aderência à superfície da placa.

Ao término do ensaio preliminar de secagem do extrato líquido de coco, foi selecionada uma composição de adjuvante para dar prosseguimento ao estudo de desenvolvimento do extrato seco, o qual foi realizado no equipamento modelo MSD 1.0 fabricado pela LABMAQ do Brasil.

No processo de secagem do extrato líquido por *spray dryer*, parâmetros como fluxo de alimentação, fluxo de ar e temperatura foram avaliados. Esta etapa foi conduzida por um desenho experimental fatorial  $2^3$  com ponto central (**Tabelas 4 e 5**). Os extratos secos obtidos foram avaliados quanto ao aspecto visual, teor de umidade, rendimento e teor de fenóis totais. Foi selecionada a condição que proporcionou um pó com melhor relação entre teor de fenol e umidade.

O pó selecionado foi incorporado, posteriormente, na formulação de máscara facial *peel off*.

**Tabela 4** – Delineamento fatorial empregado na secagem do extrato por *spray dryer*.

Fatores	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Fluxo de ar (L/min)	30	40	50
Temperatura (°C)	110	120	140
Fluxo de alimentação (L/h)	0,65	0,8	1,0

**Tabela 5** – Planejamento fatorial para produção do extrato seco da fibra de *C. nucifera*

Condição n°	Fluxo de ar (L/min)	Temperatura (°C)	Fluxo de Alimentação (L/h)
1	(+)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(-)
3	(+)	(-)	(-)
4	(+)	(-)	(+)
5	0	0	0
6	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(+)
8	(-)	(+)	(-)
9	(-)	(+)	(+)

### 3.2.6 Caracterização do extrato seco padronizado da fibra de *Cocos nucifera*

#### 3.2.6.1 Identificação e quantificação de marcadores no extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, utilizaram como ponto de partida o método desenvolvido em nosso laboratório (LIMA *et al.*, 2016). O aparelho utilizado foi Waters modelo Alliance 2695 com detector de arranjo de foto diodos (DAD) modelo 2690 e detector por fluorescência modelo 2475, nas seguintes condições: fluxo 1,2 mL/min, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna 25°C. Utilizou-se coluna modelo Zorbax Eclipse Agilent® C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) além de uma pré-coluna XTerra RP18. Toda a análise foi feita em modo gradiente utilizando como fase móvel acetonitrila: metanol: ácido trifluoracético a 0,05% com pH ajustado a 2,30 com NaOH 1 mol · L<sup>-1</sup> (**Tabela 6**).

**Tabela 6:** Condição cromatográfica utilizada no desenvolvimento do método por CLAE

<b>Tempo (min)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>	<b>Metanol (%)</b>	<b>Ácido trifluoracético (%)</b>
0 – 10	2	4,0	94
10 – 20	3	4,5	92,5
20 – 35	3,5	6	90,5
35 - 50	4	8,5	87,5
50 – 54	4	8,5	87,5
54 – 56	8	16	76
56 – 58	10	20	70
58 – 60	2	4	94

Para a construção da curva analítica, foram preparadas 5 soluções de concentrações diferentes de catequina, epicatequina e ácido clorogênico, com faixa de trabalho entre 1,5 – 13,5 µg/mL, preparadas por meio de diluições de alíquotas das soluções estoques dos padrões (1 mg/mL). A solução teste do extrato seco de *Cocos nucifera* foi preparada pesando 40 mg de extrato e transferindo para balão volumétrico de 10 mL com água ultrapura.

As soluções analisadas foram previamente filtradas por filtro PTFE de 0,45 µm. Os sistemas de detecção foram utilizados em diferentes comprimentos de onda para quantificação dos diferentes componentes: 324 nm - detector de arranjo de foto diodos (DAD); 278 nm – detector por fluorescência ( $\lambda_{excitação} = 278$ ,  $\lambda_{emissão} = 310$ ).

### 3.2.6.2. Análise morfológica das partículas do extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia do pó obtido pelo método de secagem em *spray dryer* foi avaliado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em peças de alumínio com fita dupla face e revestidas de ouro por pulverização. Foram examinadas através de um microscópio Tescan (Modelo XMU, VEGA II) utilizando uma tensão de aceleração de 30 kV a uma distância de trabalho de 15 mm.

### 3.2.7 Avaliação da atividade antioxidante do extrato seco padronizado da fibra de *Cocos nucifera*

#### 3.2.7.1 Ensaio do DPPH

Dentre os modelos experimentais *in vitro* que podem ser empregados na pesquisa de produtos antioxidantes pode-se relacionar o teste de redução do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), cuja técnica independe de qualquer atividade enzimática. O DPPH possui coloração púrpura e, na presença de substâncias antioxidantes, é reduzido ao composto difenil-picril-hidrazina com coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 520 nm que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado pela substância antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001). A partir dos resultados, pode-se determinar o percentual de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres ou ainda a porcentagem de DPPH que não foi consumida no meio reacional.

Alíquotas de 50 µL de soluções com concentrações crescentes dos extratos hidroalcoólicos de coco verde, amarelo e extrato seco (12,5, 25, 50 e 100 µg/mL), catequina, ácido clorogênico (50 µg/mL, marcadores antioxidantes do extrato), vitamina C (ácido ascórbico, 50 µg/mL, droga padrão) ou controle (solução de DPPH) foram adicionados a 250 µL de solução de DPPH (0,05 mg/mL numa solução de metanol/tampão acetato de sódio (pH 5,4 - 8:2 v/v) em placas com 96 poços. As soluções foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorridos 30 min, a leitura foi realizada em leitora de Elisa a 520 nm.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a **Equação 3**:

$$\% \text{ inibição} = \left[ \left( \frac{A_0 - A_c}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

A<sub>0</sub>= absorbância do controle

A<sub>c</sub>= absorbância da solução na presença da droga teste

### 3.2.7.2 Avaliação do efeito sequestrador do radical ânion superóxido:

O sistema enzimático hipoxantina-xantina oxidase gera o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ). No pH 7,4 esse radical reduz o nitroblue-tetrazólio (NBT) a um produto de coloração azul (formazan) a qual é lido em 560 nm. Na presença de agentes sequestradores de radicais, a exemplo os compostos fenólicos, a formação do produto final formazan é reduzida proporcionalmente. Assim, a absorvância obtida em 560 nm é proporcional à produção do radical ( $O_2^-$ ).

Para a execução do ensaio, o NBT foi preparado método descrito por Hodgson & Fridovich (1976) que utiliza tampão de TRISS ( $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH = 7,4), bem como as soluções de hipoxantina (H) e xantina oxidase (XOD) ( $5 \times 10^{-3}$  e  $1,67 \text{ u/mL}$ , respectivamente). Foram divididos três grupos: Grupo 1 – controle negativo (2,4 mL tampão TRISS, 100  $\mu\text{L}$  NBT e 500  $\mu\text{L}$  solução H); Grupo 2 – controle positivo (2,3 mL tampão TRISS, 100  $\mu\text{L}$  NBT, 500  $\mu\text{L}$  solução H e 100  $\mu\text{L}$  solução XOD) e Grupo 3 – teste (2,2 mL tampão TRISS, 100  $\mu\text{L}$  NBT, 500  $\mu\text{L}$  solução H, 100  $\mu\text{L}$  solução XOD e 100  $\mu\text{L}$  extrato seco de *C. nucifera*). O decaimento na formação do formazan foi medido a cada minuto durante 10 min. A quantidade de ânion superóxido residual foi calculada pela **Equação 4**:

$$O_2^- \text{ residual} = \frac{(P_2 - P_0)}{(P_1 - P_0)} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde,  $P_0$  = efeito na absorvância quando não há produção de ânion  $O_2^-$ ;  $P_1$  = é o efeito máximo do ânion  $O_2^-$ ;  $P_2$  = é o efeito do ânion  $O_2^-$  após a adição de substâncias sequestradoras de radicais livres.

### 3.2.8 Desenvolvimento de formulação piloto de máscara facial peel off

Foi desenvolvida uma fórmula piloto para a máscara facial *peel off* com base nos excipientes mais utilizados encontrados na literatura. Na **Tabela 7**, encontram-se listados todos os excipientes que foram utilizados bem como suas proporções e funções na formulação.

**Tabela 7** – Formulação da máscara facial *pell off* produzida com extrato seco da fibra de *Cocos nucifera*

<b>Componentes (INCI)</b>	<b>Função</b>	<b>Proporção na formulação (%)</b>
Álcool polivinílico (Polyvinyl Alcohol)	Espessante/formador de filme	40
Álcool de cereais (Alcohol)	Veículo	10
Glicerina (Glycerin)	Umectante	5
Propilenoglicol (Propylene Glycol)	Umectante	5
Poliquaternium 7 (Polyquaternium-7)	Plasticidade, suavidade, umectante	3
Extrato seco de <i>Cocos nucifera</i>	Ativo	3,5
EDTA dissódico (Disodium EDTA)	Conservante sequestrante	0,2
Benzoato de sódio (Sodium Benzoate)	Conservante antimicrobiano	0,2
Água purificada	Veículo	q.s.p. 100 mL

Para o preparo das formulações, inicialmente, o álcool polivinílico foi triturado, com auxílio de grau e pistilo, e levado ao aquecimento (80 °C) em chapa aquecedora adicionado a metade da água. Após completa dissolução do álcool polivinílico, foram adicionados os demais ingredientes na seguinte ordem: glicerina, propilenoglicol, benzoato de sódio (dissolvido em água q.s.), poliquaternium 7, extrato seco de *C. nucifera* (dissolvido em água q.s.) e álcool de cereais. Por último foi ajustado o peso da formulação e esta foi acondicionada em bisnagas de PVC flexíveis. A formulação branca seguiu os mesmos passos de produção e excipientes, exceto para o extrato seco de coco que não foi adicionado. O EDTA é um agente quelante, ou seja, é capaz de formar complexos hidrossolúveis com metais, impedindo, assim, a oxidação da formulação e, conseqüentemente, contribuindo para a conservação do produto. Por isso, apesar de estar na lista de excipientes, o EDTA não foi adicionado às formulações para que não houvesse interferência nos ensaios com a avaliação da atividade antioxidante.

As máscaras produzidas foram avaliadas quanto a estabilidade física (cor, odor, aspecto e pH) e potencial antioxidante (ensaio com o radical DPPH e sequestro do ânion  $O_2^-$ ). O ensaio de estabilidade preliminar foi conduzido com base no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004). As amostras, formulação branca (FB) e formulação à base de extrato seco de coco (FExt), foram submetidas a condições extremas de temperatura, a fim de acelerar o aparecimento de possíveis sinais de instabilidade, ficando armazenadas em temperatura ambiente ( $\sim 27 \pm 2$  °C) ou estufa ( $45 \pm 2$  °C). A avaliação física foi feita, inicialmente, no dia seguinte em que as formulações foram produzidas ou tempo zero ( $T_0$ ) e prosseguiu com avaliação semanal ( $T_0$ ,  $T_7$ ,  $T_{14}$ ,  $T_{21}$ ), totalizando um ensaio de 21 dias. Para a avaliação do pH, foram preparadas soluções a 10% de amostra em água destilada.

Já o ensaio com o radical DPPH foi realizado no início do estudo de estabilidade ( $T_0$ ) e no final ( $T_{21}$ ) a fim de comparar se o produto sofreu alguma alteração ao longo do tempo ou se o armazenamento a temperaturas mais elevadas afetou suas propriedades farmacológicas. Em ambos os ensaios para análise do potencial antioxidante, foram avaliadas as concentrações da formulação de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ .

### ***3.2.9 Análise estatística***

Os resultados relacionados à caracterização do extrato da fibra de *C. nucifera* foram analisados utilizando o programa Excel<sup>®</sup> 2003 (EUA). As análises estatísticas dos ensaios biológicos foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Para comparações múltiplas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da otimização do método para quantificação de fenóis totais no extrato da fibra de *Cocos nucifera* por espectrofotometria no UV/visível

Em estudo anterior (FREITAS, 2015) realizado pelo nosso laboratório, foi determinado o teor de fenóis totais no extrato de *C. nucifera* com emprego do método de Folin-Ciocalteu descrito por Makkar (2000). No presente estudo, avaliamos a influência de alguns fatores sobre esse método, visando otimizá-lo, ou seja, obter as condições ideais para o ensaio, se possível, em um menor tempo e custo. Para tanto, avaliamos o efeito dos volumes dos reagentes e da luz ambiente sob os produtos da reação, com auxílio de desenho experimental fatorial (DEF), empregando como resposta a medidas das absorvâncias obtidas. Além disso, também definimos o comprimento de onda máximo e o tempo ideal que a reação deve-se proceder.

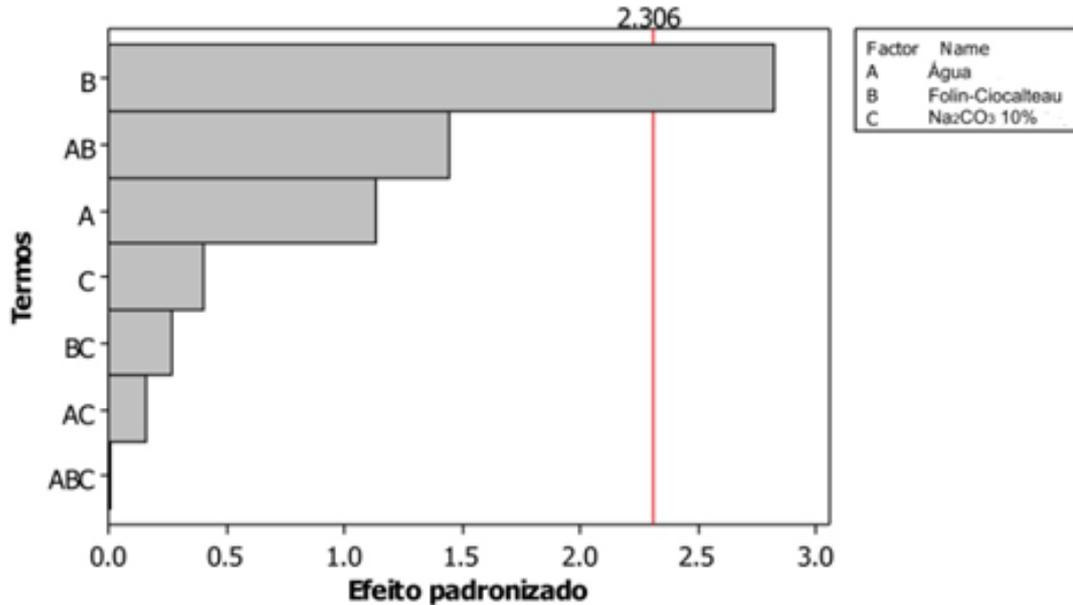
As variáveis investigadas foram selecionadas após revisão comparativa dos métodos de dosagem de fenóis totais com emprego do reagente de Folin-Ciocalteu descritos na literatura (SINGLETON *et al.*, 1999; FORREST & BENDALL, 1969; MAKKAR, 2000; ESCARPA & GONZÁLEZ, 2001; STRATIL *et al.*, 2006), que revelou variações quanto ao volume de reagente, tempo para análise após adição do reagente e comprimento de onda.

Na análise da influência dos volumes dos reagentes (água, reagente de Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%) observou-se que apenas as variações nos volumes de 200 e 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu influenciaram discretamente, mas de maneira significativa ( $p = 0,017$ ) a análise espectrofotométrica do ácido gálico (200 µL - Abs =  $0,64 \pm 0,014$ ; 250 µL - Abs =  $0,66 \pm 0,004$  e em 300 µL Abs =  $0,66 \pm 0,021$ ). Também não foram observadas interações significativas entre os fatores investigados, o que pode ser observado através do gráfico de Pareto (**Figuras 7 e 8**).

Diante dos resultados obtidos, o volume selecionado para a análise de fenóis pelo presente método analítico foi de 250 µL, considerando que esta condição foi a que apresentou maior sinal médio de absorvância em relação aos demais volumes analisados (**Figura 8**). Embora não tenha ocorrido diferença estatística em relação à absorvância obtida com o volume de 300 µL, optou-se por utilizar a menor quantidade efetiva do reagente de Folin-Ciocalteu. Dessa forma, o estudo prosseguiu selecionando a condição central do desenho fatorial para as

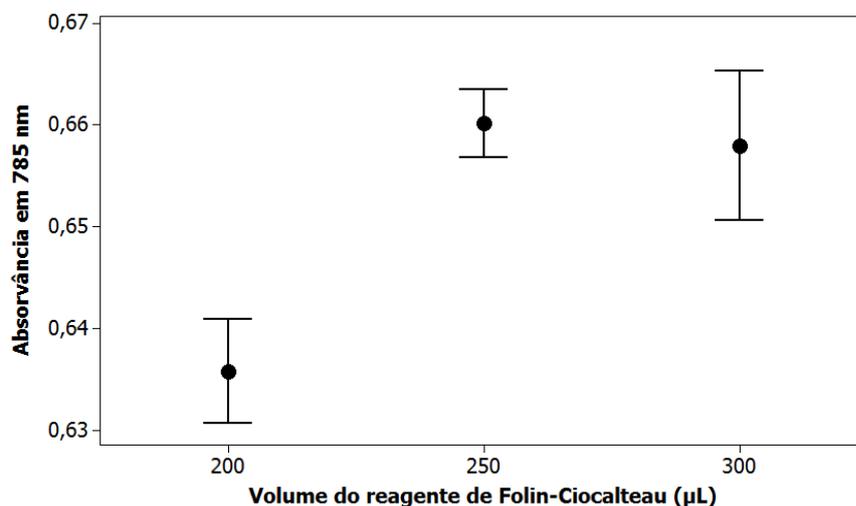
análises futuras. Este resultado corrobora com nosso estudo anterior no qual utilizamos 250  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu, evidenciando assim que o estudo passado foi realizado sem exageros nos volumes dos reagentes.

**Figura 7.** Avaliação da influência dos volumes dos reagentes na análise de fenóis totais através do método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria: Gráfico de Pareto.



Os volumes (mL) investigados foram dos reagentes: água, Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%. Foi empregado como padrão a solução de ácido gálico. O grau de significância do ensaio foi de  $p < 0,05$ .

**Figura 8.** Avaliação da influência do volume de Folin-Ciocalteu na análise do ácido gálico por espectrofotometria

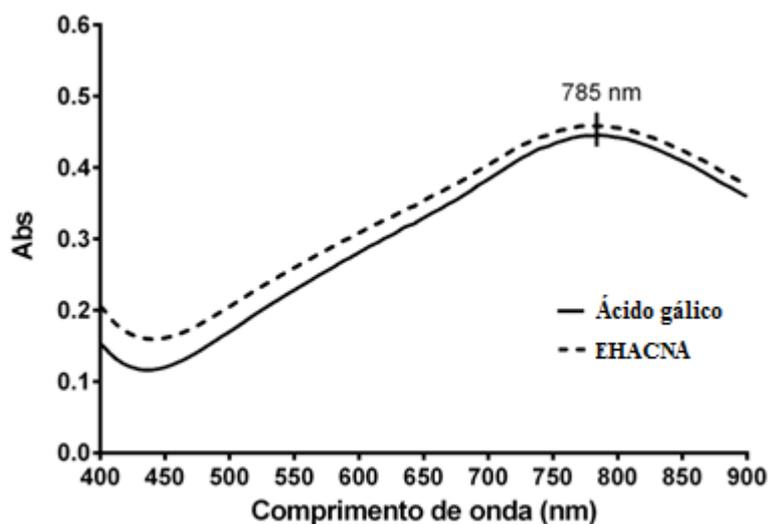


Os resultados das absorvâncias são expressos como média  $\pm$  EPM.

Na pesquisa do comprimento de onda ideal para a análise de fenóis por espectrofotometria, ou seja, o comprimento de onda no qual será obtida máxima absorvância, investigou-se o comportamento das substâncias na faixa de 400 – 900 nm. Na **Figura 9** pode ser observado que a máxima absorvância do ácido gálico (4 µg/mL) bem como do extrato hidroalcoólico de *Cocos nucifera* (EHACNA) foi em 785 nm. Dessa forma, a proximidade ou mesma região de absorção do ácido gálico e a sua cinética comparável em relação ao extrato do coco na presença do reagente de Folin-Ciocalteu, corroboraram para a seleção deste comprimento de onda como padrão de trabalho no presente estudo.

Na literatura (GALLICE, 2010; FORREST & BENDALL, 1969; SINGLETON *et al.*, 1999; VUNDAC *et al.*, 2007) têm sido observadas variações quanto ao comprimento de onda selecionado para a análise espectrofotométrica de fenóis através do método de Folin-Ciocalteu. Isto possivelmente decorre em função das condições experimentais em que são realizados os ensaios bem como da natureza da amostra investigada. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, Blainski e colaboradores (2013), em suas pesquisas com ácido gálico, ácido tânico, catequina, pirogalol e extrato liofilizado de *Limonium brasiliense* L., selecionaram como faixa de trabalho ideal o intervalo de 760-800 nm para quantificação de fenóis através do método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria.

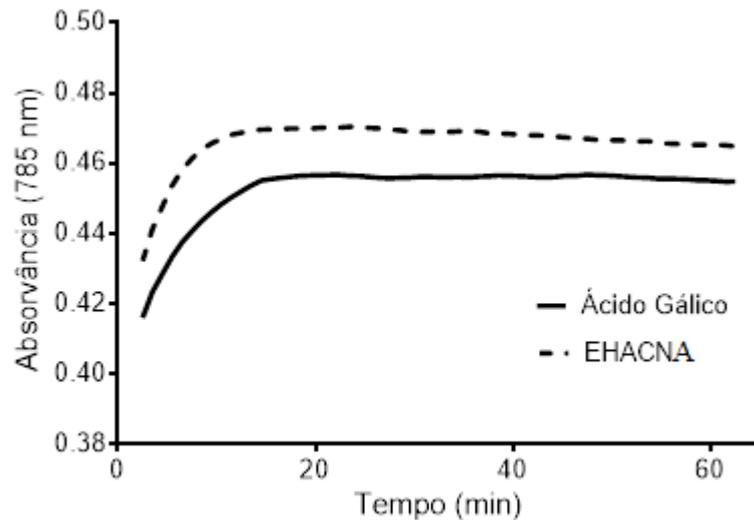
**Figura 9.** Espectro no visível dos produtos da reação do ácido gálico e do extrato hidroalcoólico de *Cocos nucifera* (EHACNA) com o reagente de Folin-Ciocalteu.



Na avaliação da cinética da reação (Abs vs Tempo) observou-se que as absorvâncias obtidas tanto para o padrão (ácido gálico) quanto para o extrato de *C. nucifera* apresentaram-se

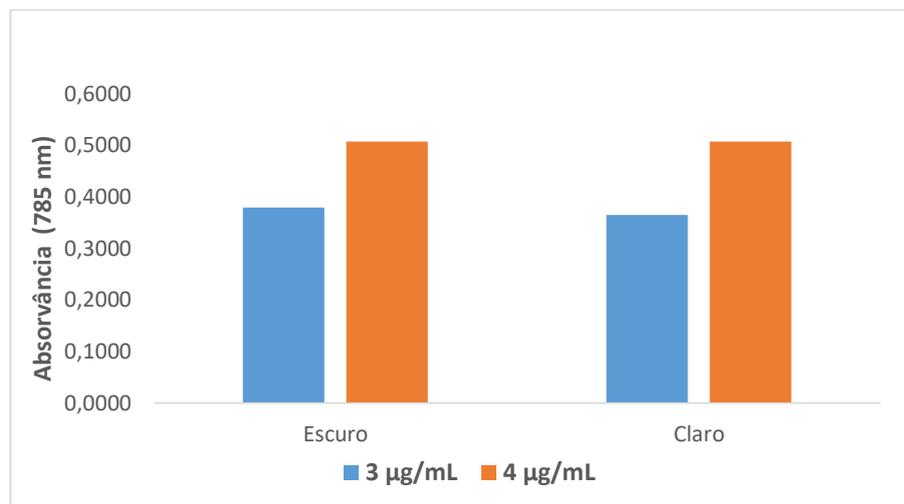
estáveis no intervalo de 20 a 60 min, o que pode ser observado no **Figura 10**. Resultados semelhantes foram obtidos por Everette e colaboradores (2010) o qual notaram que após o período de 15 min as leituras espectrofotométricas realizadas na análise de fenóis totais através do método de Folin-Ciocalteu mantiveram-se inalteradas até o instante de 60 min.

**Figura 10.** Resultados da cinética da reação do reagente de Folin-Ciocalteu e amostras de ácido gálico e EHACNA.



Tem sido observado que alguns estudos realizaram a análise espectrofotométrica de fenóis através do método de Folin-Ciocalteu na presença (SINGLETON *et al.*, 1999; SOUSA *et al.*, 2007; EVERETTE *et al.*, 2010) ou ao abrigo da luz (GALLICE, 2010). Dessa forma, investigamos a influência desta na análise do ácido gálico e foi observado que a absorvância do ácido gálico nas concentrações de 3 e 4  $\mu\text{g/mL}$  na presença da luz (Abs = 0,364 e 0,507, respectivamente) ou ao abrigo da luz (Abs = 0,379 e 0,507, respectivamente) não diferiram significativamente (**Figura 11**). Diante dos resultados obtidos podemos observar que a luz não influenciou na análise de ácido gálico através da reação de Folin-Ciocalteu, mesmo sob diferentes concentrações. Assim, por comodidade experimental, o estudo prosseguiu analisando os fenóis na presença da luz.

**Figura 11.** Resultados da absorvância para as diferentes condições avaliadas no ensaio da influência da luz (Escuro/Claro).



A avaliação da influência dos volumes dos reagentes (água e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%) mostrou que estes não influenciaram significativamente nos resultados dentro da faixa investigada, com exceção para o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos com a análise espectral e da cinética da reação possibilitaram determinar o comprimento de onda ideal num menor intervalo de tempo em relação ao estudo anterior (FREITAS, 2015). Além disso, foi comprovado que a luz não influenciou na análise. Portanto, o presente estudo proporcionou a otimização do método em relação ao estudo anterior (FREITAS, 2015) com redução de custo, tempo, mantendo a eficiência do método.

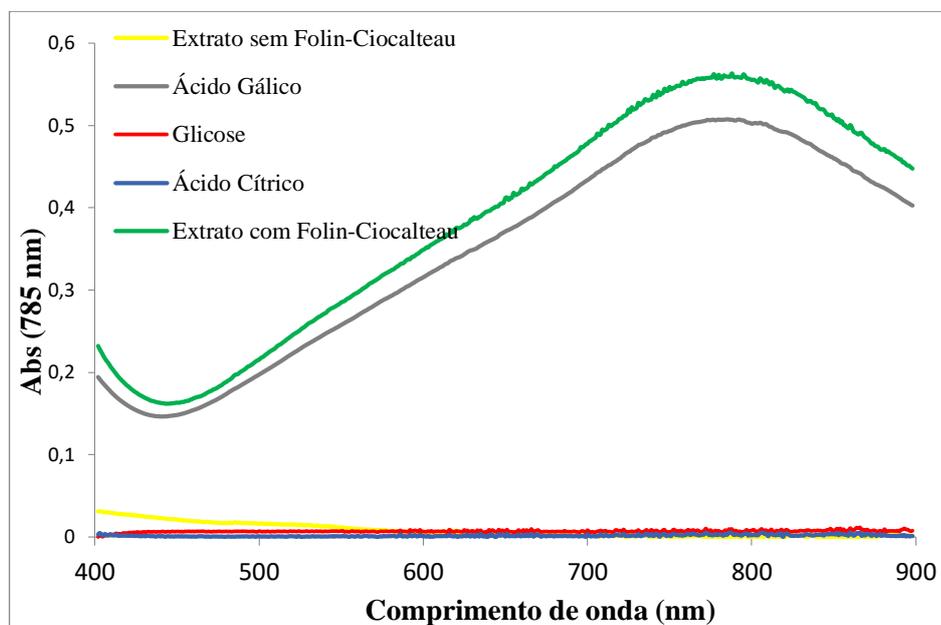
## **4.2 Validação de método analítico para a determinação do teor de fenóis totais no extrato da fibra de *Cocos nucifera* por espectrofotometria no UV/visível.**

### **4.2.1 Especificidade**

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Para tanto foram avaliados os espectros (400 – 900 nm) do ácido gálico, EHACNA e de possíveis interferentes na presença do reagente de Folin-Ciocalteu. Foi observado que o espectro apresentado pelo EHACNA foi semelhante ao obtido

para o ácido gálico, com ambos mostrando uma máxima absorção em torno de 785 nm (**Figura 12**). Ademais, nas condições investigadas a glicose e o ácido cítrico, substâncias normalmente encontradas nos organismos vegetais e que possuem em sua estrutura a presença de hidroxilas alcoólicas e de ácido carboxílico, praticamente não apresentaram absorção no intervalo investigado descartando assim possíveis interferências na análise de fenóis do extrato do coco, cuja literatura relata a presença de monossacarídeos e ácidos (TAN *et al.*, 2014; SANTANA, 2012; AWUA, *et al.*, 2011).

**Figura 12.** Espectro de varredura no visível dos produtos da reação com reagente de Folin-Ciocalteu do: Ácido Gálico (4  $\mu\text{g/mL}$ ), Glicose (8  $\mu\text{g/mL}$ ), Ácido Cítrico (8  $\mu\text{g/mL}$ ), EHACNA com e sem adição do reagente de Folin-Ciocalteu.

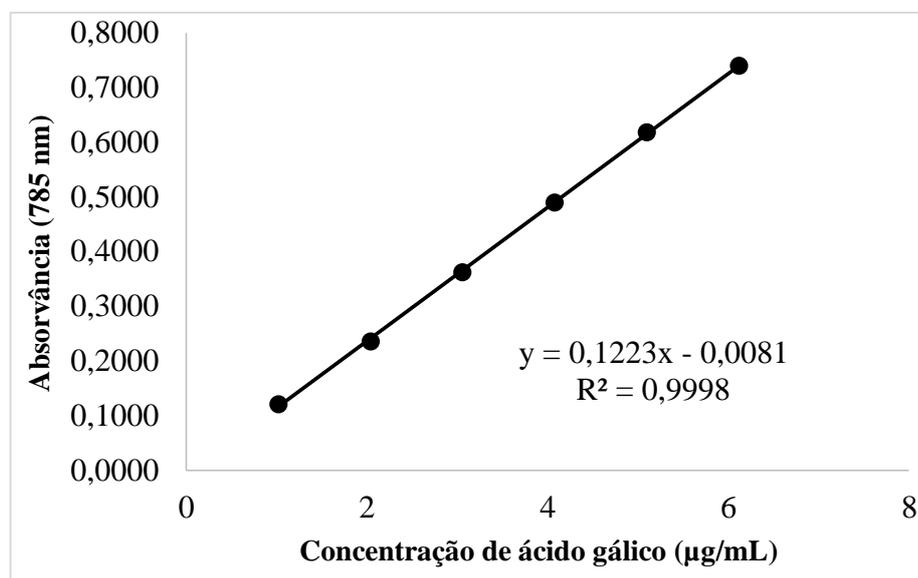


#### 4.2.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. De acordo com RE 899/03, a ANVISA preconiza que a linearidade seja determinada pela análise de pelo menos cinco concentrações diferentes e que tenha coeficiente de correlação linear ( $r$ ) de, no mínimo, 0,99 (BRASIL, 2003).

A análise dos resultados do ensaio de linearidade demonstrou o aumento gradual e proporcional da absorvância em 785 nm com o aumento da concentração de ácido gálico (**Figura 13**). Os resultados da regressão linear encontram-se resumidos na **Tabela 8**.

**Figura 13.** Curva analítica do padrão ácido gálico (1 – 6 µg/mL) obtida por espectrofotometria (785 nm)



Os resultados representam a média de três determinações. A equação da reta e o coeficiente de determinação foram obtidos por regressão linear.

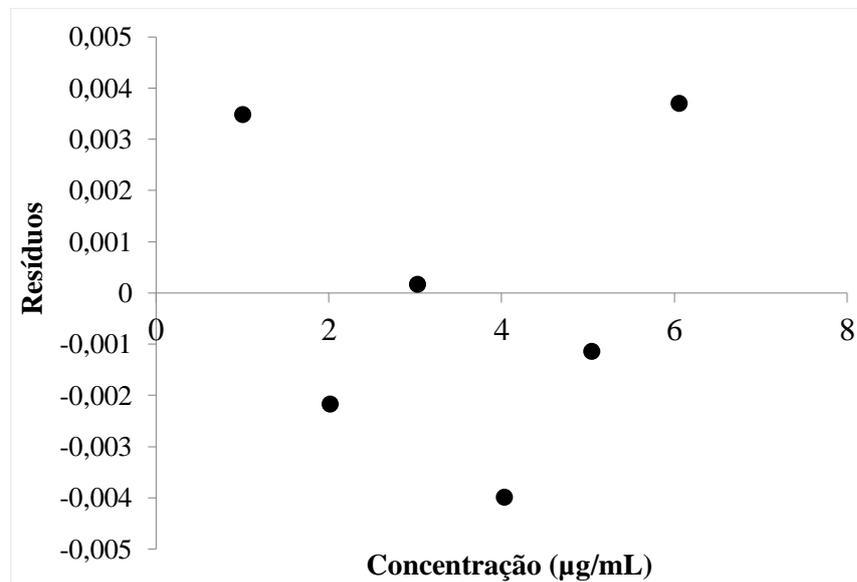
**Tabela 8** – Análise dos parâmetros de regressão linear dos três dias de análise

PARÂMETROS	DIA 1	DIA 2	DIA 3	MÉDIA
Coef. angular	0,1179	0,1211	0,1313	0,1223
Intercepto	-0,0046	-0,0210	0,0014	-0,0081
R	0,9998	0,9997	0,9999	0,9999
DPR <sub>reg</sub>	1,18%	1,47%	0,74%	0,94%
Resíduos (min; máx)	-1,38; 1,16	-1,27; 1,30	-1,29; 1,19	-1,28; 1,42
Gráfico de resíduos	s/ tendência	s/ tendência	s/ tendência	s/ tendência

A análise dos resíduos é uma importante ferramenta para análise visual e identificação de tendências que podem indicar desde a seleção de modelo pouco adequado para

descrição dos resultados até a alteração significativa de parâmetros como coeficiente angular e intercepto (SHABIR, 2003; TAVERNIERS *et al.*, 2004). A análise visual dos resíduos não detectou tendência na distribuição dos resultados e, por isso, os resíduos foram considerados como tendo distribuição normal (**Figura 14**). Este resultado indica a adequabilidade do modelo linear proposto e, assim, tem-se a melhor predição para os valores de coeficiente angular e intercepto. Os resíduos podem ainda ser utilizados para verificação da presença de valores atípicos (*outliers*) que podem afetar os preditores da regressão linear (coeficiente angular e intercepto). Como todos os resíduos padronizados apresentaram valores entre -2,0 e +2,0 pode-se afirmar que não se detectou a presença de *outliers* nas curvas padrão avaliadas (CALLEGARI-JACQUES, 2003; MIRON *et al.*, 2014).

**Figura 14.** Gráfico de resíduos do ensaio de linearidade do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria (785 nm).



O erro padrão residual (*EPR*) da curva padrão é um indicativo da precisão dos resultados da linearidade. A equação 4 descreve a obtenção do parâmetro que avalia a precisão dos resultados da linearidade que pode ser obtido de maneira semelhante ao desvio padrão relativo (*DPR*) calculado nos ensaios de precisão (ERMER & PLOSS, 2005). A precisão da regressão calculada para todos os dias de análise foi menor que 5,0% e, por isso, considerada adequada. Além disso, encontra-se de acordo com os limites estabelecidos para precisão pela RE 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003).

$$DPR_{REG} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}} \times 100\% = \frac{EPR}{b \times \bar{X}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:  $DPR_{REG}$  é o desvio padrão relativo da regressão linear;  $\hat{Y}_i$  é o valor esperado;  $Y_i$  é o valor obtido,  $b$  é o coeficiente angular;  $\bar{X}$  é a média da concentração do analito e  $n$  é o número de análises.

Considerando os resultados obtidos, o método analítico proposto foi considerado linear na faixa de 1,0 a 6,0  $\mu\text{g/mL}$  de ácido gálico.

#### 4.2.3 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea (ICH, 2005). A precisão foi avaliada quanto a repetibilidade e a precisão intermediária. Na **Tabela 9**, pode-se observar que os resultados de repetibilidade (intradia) e de precisão intermediária (interdia) exibiram DPR inferior a 5,0%, tornando o método satisfatório, pois atende ao critério exigido pela RE 899/03, que estabelece que o DPR não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2003). Além disso, o teste de Levene para avaliação da equivalência das variâncias dos três dias de análise e dois analistas foi não significativo (valor-p = 0,85 >  $\alpha$  = 0,05) indicando que as variâncias observadas nestas condições são estatisticamente equivalentes. O teor de fenóis totais encontrado no extrato de *C. nucifera* utilizado no processo de validação do método analítico foi de 11,09 mg/mL.

**Tabela 9** - Avaliação da precisão do método para quantificação de polifenóis no extrato da fibra de *Cocos nucifera*.

Repetição	Polifenóis Totais (mg/mL)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	11,73	11,24	10,77
2	11,32	10,93	10,62
3	11,20	11,10	10,72
4	11,70	11,29	10,89
5	11,72	10,63	9,92
6	11,45	11,41	10,64
7	11,21	11,17	11,24
Média (mg/mL)	11,47	11,11	10,7
DPR	2,09%	2,4%	4,0%
<b>Média Geral (mg/mL)</b>	<b>Repetibilidade Média</b>	<b>Precisão Intermediária</b>	
11,09	2,72%	3,89%	

#### 4.2.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo do valor verdadeiro, podendo também se referir à taxa de recuperação do analito adicionado à matriz do produto (BRASIL, 2003). A recuperação do ácido gálico adicionado ao EHACNA foi investigada em três níveis de concentração com três réplicas cada (**Tabela 10**). Todos os resultados tiveram recuperação entre 95-105% com recuperação média de 98,5%. Assim, o método foi considerado exato. Além disso, o DPR de 0,9% demonstra a precisão dos resultados obtidos experimentalmente.

**Tabela 10** - Resultados do estudo da exatidão para extrato da fibra de *Cocos nucifera*

Níveis de ácido gálico adicionado	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
Nível Baixo	96,9	98	0,9
	98,5		
	98,1		
Nível Médio	98,0	98	0,4
	97,9		
	98,7		
Nível Alto	98,7	99	0,7
	99,2		
	100,1		
<b>Total</b>		<b>98,5</b>	<b>0,9</b>

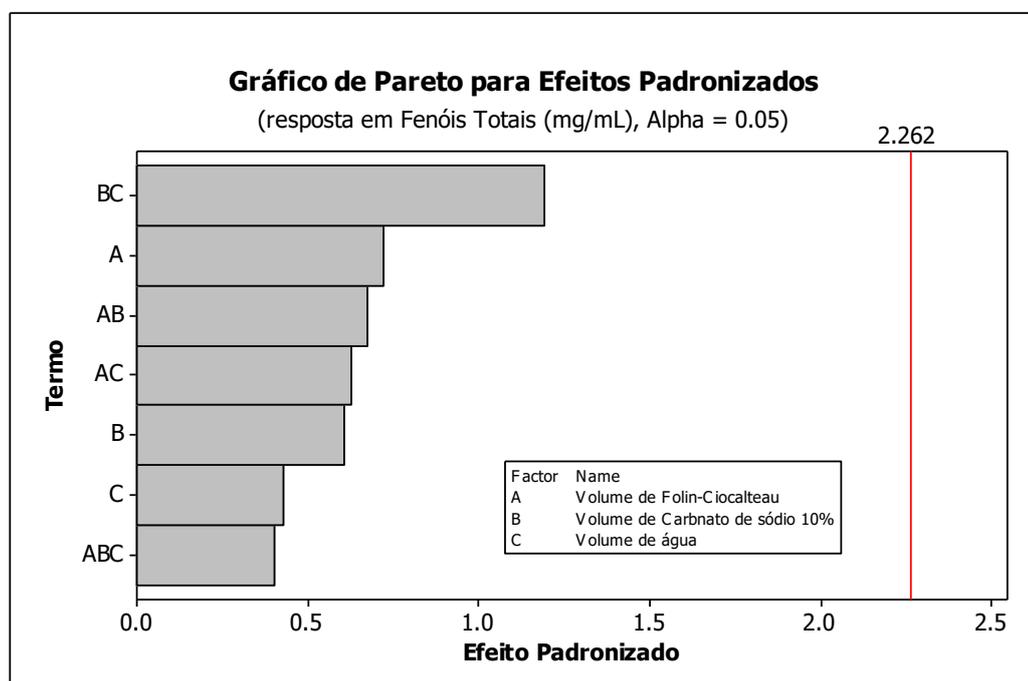
#### 4.2.5 Robustez

Robustez é a medida da capacidade de um método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, logo, serve como indicativo de confiança durante o uso do método (BRASIL, 2003). Os fatores volume de água, de reagente de Folin-Ciocalteu e de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% foram selecionados na avaliação da robustez do método realizada com emprego de desenho experimental fatorial 2<sup>3</sup> com ponto central. A análise dos resultados obtidos mostrou que pequenas variações nos volumes de água, Folin-Ciocalteu e de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% não influenciaram de maneira significativa na concentração de fenóis totais no extrato de *C. nucifera*. (**Tabela 11, Figura 15**). Ainda, o DPR dos ensaios foi menor que 5,0 % ratificando a precisão dos ensaios.

**Tabela 11.** Resultados do estudo de robustez do método para análise de polifenóis totais no extrato da fibra de *C. nucifera*.

Fatores			Polifenóis totais (mg/mL)	
Folin-Ciocalteu ( $\mu$ L)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Repetição 1	Repetição 2
255	3,03	3,03	10,74	10,38
255	2,97	3,03	10,91	10,86
255	3,03	2,97	10,87	10,85
255	2,97	2,97	10,95	10,70
245	3,03	3,03	10,72	10,63
245	2,97	3,03	10,84	10,66
245	3,03	2,97	10,89	10,59
245	2,97	2,97	10,98	10,30
250	3,00	4,00	10,31	10,68
<b>Média geral (mg/mL)</b>			<b>10,71</b>	
<b>DPR</b>			<b>2,0 %</b>	

**Figura 15.** Avaliação da robustez do método para análise de fenóis no extrato da fibra de *C. nucifera*: Gráfico de Pareto.



### 4.3 Análise da otimização do processo extrativo da fibra de *Cocos nucifera*:

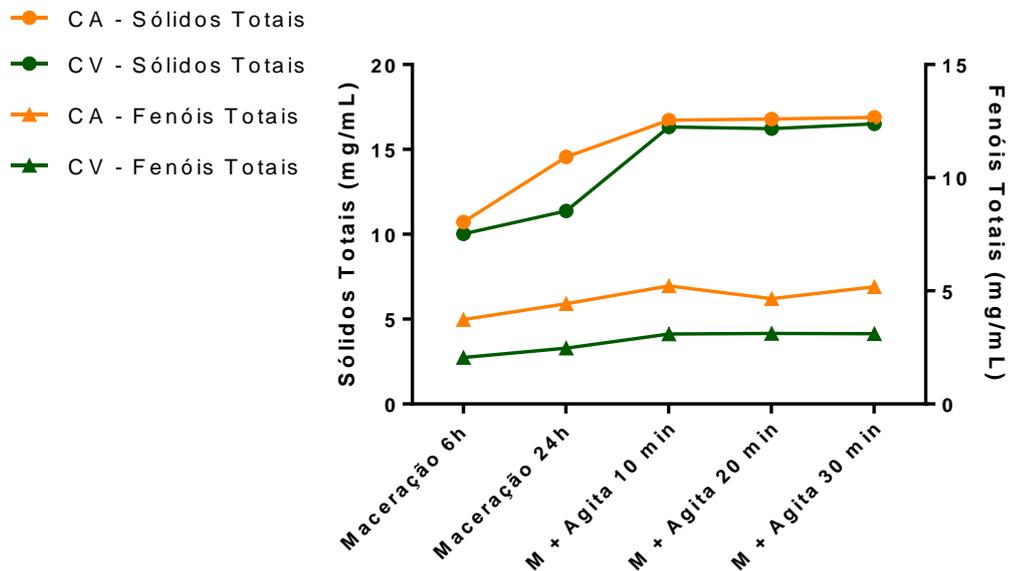
Em estudo anterior realizado pelo nosso laboratório (FREITAS, 2015) determinaram-se as condições de preparo da droga vegetal a partir da fibra do coco amarelo (epicarpo e mesocarpo), que, após caracterizada, foi utilizada (droga vegetal:solvente: 1:1 – m/v) na produção do extrato hidroalcoólico (EtOH:água – 2:1, v/v) com emprego de soxhlet (6 horas). Esse extrato resultou em um produto com  $18,8 \pm 0,1$  mg EAG/mL extrato (DPR: 0,8%) de fenóis totais. Além disso, comprovamos seus efeitos antidepressivo, neuroprotetor e antioxidante (LIMA *et al.*, 2016; LIMA, 2015; FREITAS, 2015).

Diante do exposto, e percebendo o potencial biológico do extrato de coco amarelo, foi planejado o presente estudo visando otimizar esse produto derivado, mantendo seu potencial antioxidante. Ainda, foi acrescentado ao estudo uma outra variedade da planta, coco verde, que à semelhança da variedade amarela é utilizado amplamente em diversos segmentos industriais em todo o País. Para tanto, foram investigados métodos extrativos de menor custo, como a técnica de maceração a temperatura ambiente associada ou não a turbólise, empregando como solvente extrator solução etanol:água (50 %) na proporção droga vegetal: solvente a 7 % (p/v). Para avaliar a influência desses fatores sobre os extratos de coco amarelo ou verde, os extratos obtidos foram avaliados quanto ao teor de sólidos totais, fenóis totais por espectrofotometria e efeito antioxidante (teste DPPH).

Na avaliação dos extratos de coco amarelo obtidos por maceração, foi observado que o aumento no tempo de extração, de 6 para 24 horas, não incrementou significativamente o teor de fenóis totais (3,72 e 4,42 mg EAG/mL, respectivamente). O contrário foi observado em relação ao teor de sólidos totais onde o maior tempo de extração ( $14,55 \pm 0,64$  mg/mL) promoveu um aumento de 36% em relação a extração por 6 horas ( $10,72 \pm 0,18$  mg/mL) (**Figura 16**). A associação da turbólise (tempo agitação: 10 min) à maceração aumentou em 40% e 56% o teor de fenóis totais e sólidos totais, respectivamente. O aumento do tempo de agitação (20 e 30 min) não interferiu significativamente nos parâmetros avaliados. Os extratos do coco verde obtidos sob as mesmas condições mencionadas, mostraram um perfil de rendimento de sólidos totais comparável aos extratos do coco amarelo, contudo em relação ao teor de fenóis, este manteve-se sempre abaixo (maceração 24h + turbólise 10 min.=  $3,01 \pm 0,01$  mg EAG/mL) em relação ao extrato do coco amarelo (maceração 24h + turbólise 10 min.=  $5,21 \pm 0,11$  mg EAG/mL). Além disso, também pode-se perceber que a variedade de coco amarelo

apresentou maior relação fenol/sólidos totais (31%) comparado à variedade de coco verde (19%).

**Figura 16.** Representação gráfica dos resultados obtidos com a determinação dos fenóis totais e dos sólidos totais nos extratos das fibras das variedades de coco amarelo e verde.



Dessa forma, pode ser observado que a agitação não influenciou de forma significativa na concentração de fenóis totais ao passo que contribuiu fortemente para uma maior obtenção de sólidos nos extratos de ambas as variedades de coco. A obtenção de taxas mais altas de sólidos totais é interessante para a viabilização do processo de secagem, pois a determinação desse teor na amostra permite fazer o cálculo do percentual de adjuvantes a ser adicionado na solução extrativa para a produção do extrato seco por *spray dryer*, como observado na produção do extrato seco de cumaru, *Amburana cearensis* A. C. Smith (ARARUNA *et al.*, 2013).

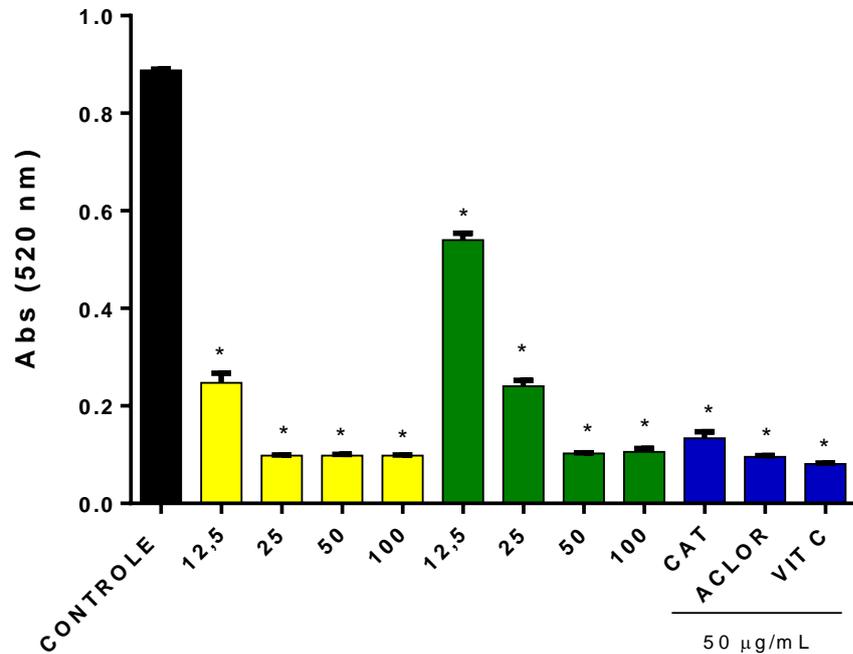
Diante dos resultados obtidos, pode ser verificado que o método de extração atual da fibra de *C. nucifera* variedade amarela proporcionou uma otimização em termos de custo quando comparado com o método anterior (FREITAS, 2015). Essa redução nos custos é expressa pela redução na quantidade de droga vegetal bem como no percentual de etanol em relação ao solvente extrator. Isso, com emprego de um método extrativo de fácil execução, e possivelmente de menor custo como a maceração e a turbólise.

No extrato de coco amarelo anterior (FREITAS, 2015) produzido por soxhlet foi utilizada uma proporção de droga vegetal: solvente de 1:1, ou seja 100 %, que proporcionou um teor de FT de 1,8 g % (m/v). No extrato atual foi empregado apenas 7 % de droga vegetal em relação ao solvente extrator, que resultou num teor de FT de 0,4 g % (m/v) (coco amarelo). Isso significa que no método atual a cada 1g de droga vegetal esta rendeu 0,05 g % de FT, enquanto que no método anterior obteve-se um rendimento de apenas 0,018 g % de FT/g de droga vegetal (coco amarelo). É interessante registrar que possivelmente a transposição do atual método (maceração + turbólise) para escala industrial irá requerer menor investimento em relação ao emprego da extração por soxhlet. Ainda, em todas as condições extrativas analisadas, a concentração de fenóis totais do coco amarelo foi superior em relação ao coco verde.

Importante ressaltar, que além do exposto acima, a meta do presente estudo é desenvolver um extrato de coco amarelo ou verde que proporcione um efeito antioxidante comparável ou superior ao anteriormente desenvolvido (extrato do coco amarelo por soxhlet). Assim, foi então avaliado o potencial antioxidante dos extratos das duas variedades de coco, amarelo e verde, produzidos por maceração (24h) sucedida de turbólise (10 min), utilizando 7% de droga vegetal em relação ao solvente extrator (50% EtOH em água). Vários extratos de espécies de plantas que têm mostrado características biológicas de interesse industrial, como a cajazeira (*Spondias monbim*) e o açafrão (*Curcuma longa*) têm sido produzidos empregando como método extrativo a maceração sucedida pela turbólise (SILVA, 2016; AMARAL *et al.*, 2005; FILHO & YUNES, 1997).

Na avaliação do efeito antioxidante dos extratos de coco amarelo e verde através do teste do DPPH foi observado que estes em todas as concentrações investigadas (12,5 a 100 µg/mL) mostraram atividade antioxidante/sequestradora do radical DPPH (**Figura 17**). Contudo, o extrato de coco amarelo nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL apresentou um efeito antioxidante superior (% redução do DPPH: 72 e 89 %, respectivamente) e significativo ( $p < 0,05$ ; ANOVA Tukey) em relação ao extrato do coco verde nas mesmas concentrações (% redução do DPPH: 38,6 e 72 %, respectivamente). Porém, ambos os extratos nas concentrações a partir de 50 µg/mL apresentaram efeitos antioxidantes similares (% inibição do DPPH: 88,8 % (coco amarelo) e 88,6 % (coco verde)) e muito próximos aos efeitos de antioxidantes de referência, como a catequina, ácido clorogênico e vitamina C que reduziram o DPPH em 84,8; 89,2 e 90,8 %, respectivamente.

**Figura 17:** Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres dos extratos das fibras de coco verde e amarelo obtidos por maceração associado a turbólise determinado pelo ensaio do DPPH.

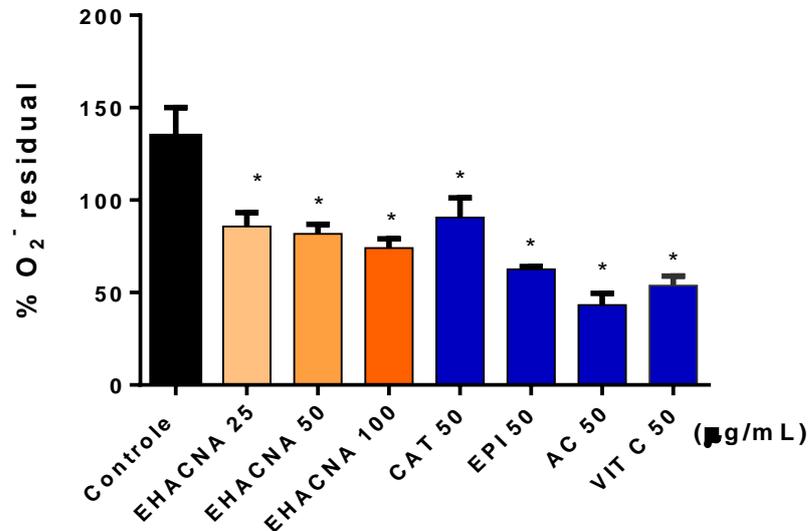


Grupo amarelo: extrato hidroalcoólico de coco amarelo (EHACNA). Grupo verde: extrato hidroalcoólico de coco verde (EHACNV). Controle: solução de DPPH; CAT: catequina; ACLOR: ácido clorogênico; VIT C: ácido ascórbico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* vs Controle ( $p < 0,05$  – ANOVA e Teste de Tukey).

Os resultados obtidos mostraram que os extratos das duas variedades de coco (amarelo e verde) possuem efeito antioxidante, salientando que ambas as variedades têm potencial para o desenvolvimento de produtos aplicados à diferentes segmentos industriais, incluindo cosméticos. Entretanto, diante dos resultados expostos, no qual a variedade de coco amarela manteve-se superior (fenóis totais e DPPH) a de coco verde, foi priorizado dar seguimento a pesquisa com o extrato de coco amarelo.

Prosseguindo o estudo, foi investigado o possível efeito sequestrador do ânion superóxido do extrato de coco amarelo (**Figura 18**). O EHACNA em todas as concentrações investigadas (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ; ANOVA Tukey) o percentual de ânion superóxido no meio (36,3 %, 39,2 % e 44,8 %). O EHACNA – 50  $\mu\text{g/mL}$  mostrou a seguinte relação com os antioxidantes padrões (50  $\mu\text{g/mL}$ ): catequina < EHACNA < vitamina C < ácido clorogênico.

**Figura 18:** Avaliação do potencial antioxidante do extrato líquido da fibra de coco amarelo obtido por maceração associado a turbólise determinado pelo ensaio do sequestro do radical  $O_2^-$



Controle: solução sem xantina oxidase/nenhuma produção do ânion  $O_2^-$ ; EHACNA: extrato hidroalcoólico de coco amarelo (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ); CAT: catequina; AC: ácido clorogênico; EPI: epicatequina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M ( $p < 0,05$  – ANOVA e Teste de Tukey).

Sabe-se que os radicais livres e as demais espécies reativas de oxigênio (ROS) são agentes tóxicos, principalmente devido aos danos diretos em alvos sensíveis e biologicamente significativos. O processo de envelhecimento é, pelo menos em parte, devido ao dano acumulado causado por essas espécies reativas (LIOCHEV, 2013).

Nesse contexto, o radical ânion superóxido é uma das primeiras espécies produzidas em condições de estresse oxidativo, ocorrendo também nos processos de reparação celular, transporte de elétrons e ação enzimática (xantina oxidase) (PIETTA, 2000). Sua ação como oxidante direto não é muito expressiva, contudo, os efeitos nocivos envolvendo o radical são bastante pronunciados já que ele é precursor de outros radicais, como por exemplo,  $H_2O_2$  (por dismutação pela enzima superóxido dismutase), oxigênio singlete –  $^1O_2$  (reação com radical hidroxila – HO) e perixinitrito –  $ONOO^-$  (reação com óxido nítrico) (BARREIROS; DAVID, 2006).

O mercado tem investido em pesquisa e tecnologia em busca de novos princípios ativos e formulações inovadoras com ações antioxidantes. Os compostos fenólicos, como por exemplo os padrões utilizados nos ensaios (catequina, epicatequina e ácido clorogênico), possuem comprovada ação antioxidante determinada em modelos químicos e biológicos

bastante difundidos na literatura (CAI *et al.*, 2002; LEUNG *et al.*, 2001; ALAM *et al.*, 2010; YOKOZAWA *et al.*, 2000; PASCUAL *et al.*, 1994; STANOJEVIC *et al.*, 2009). Além disso, ainda no contexto de produtos rejuvenescedores outros ativos com propriedades antioxidantes são utilizados destacando-se o ácido ascórbico ou, como é mais conhecido, vitamina C (SCOTTI; VELASCO, 2003; GONÇALVES, 2002; CAMPOS *et al.*, 1999).

A vitamina C tornou-se um aditivo popular presente em muitos produtos, devido as suas características despigmentantes, fotorrejuvenecedoras e antioxidantes, nessa última parece interferir com as espécies reativas de oxigênio, em especial ânion superóxido e radical hidroxila, induzidos pela exposição aos raios ultravioleta (DRAELOS *et al.*, 2009; PINNELL, 1995). Em uma pesquisa de mercado, contataram-se alguns exemplos de produtos cosméticos que contém vitamina C em sua formulação, entre eles estão: Derma Complex (ADCOS); Improve C 20 (Dermage); Ivy C (Mantecorp), Serum Facial Nutralift Intensive (ADCOS) e Active C [10] (La Roche-Posay).

Diante dos resultados obtidos, o EHACNA mostrou um efeito antioxidante promissor ao sequestrar radicais livres, como o ânion superóxido que tem um papel importante no estresse oxidativo já abordado anteriormente. Além disso, apresenta-se como um produto competitivo a vitamina C considerada, atualmente, como ativo de escolha em formulações antioxidantes. Possivelmente, parte do efeito antioxidante mostrado pelo EHACNA está relacionado, a presença de fenóis na planta, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos, cuja presença foi determinada em estudo anterior no nosso laboratório (FREITAS, 2015; LIMA *et al.*, 2016).

#### **4.4 Análise do método para secagem do extrato por *spray dryer*:**

Inicialmente foram investigados alguns adjuvantes de secagem a serem incorporados ao extrato do coco amarelo. Dentre os adjuvantes isolados ou associados avaliados (aerosil, goma xantana e celulose microcristalina) em diferentes proporções (adjuvante:extrato do coco amarelo) no ensaio da placa de petri, somente os extratos secos obtidos com pelo menos 20% de adjuvante (20% aerosil; 15/5% aerosil + goma xantana) apresentaram um aspecto de pó seco, facilmente removível da placa. Todos os extratos com concentrações de adjuvantes menores que 20% apresentaram tendência a formar aglomerados, incluindo o grupo que utilizou

aerosil + celulose (15:5%) que apresentou-se como um pó úmido de difícil remoção da placa (dados não mostrados).

A mistura de aerosil e goma xantana (15/5%) adicionada ao EHACNA proporcionou ao pó boa característica macroscópica, mantendo o aspecto de pó homogêneo, partículas pequenas e soltas. Apesar de o pó obtido com aerosil 30% também apresentar aspecto comparável ao extrato seco com 20 % de adjuvante, utilizar a menor proporção possível de adjuvante de secagem favorece uma maior concentração do ativo no extrato, com potencial uso no desenvolvimento de cosmético. Além disso, por se tratar de um tipo de sílica, o aerosil apresenta sensorial “arenoso” o que poderia contribuir negativamente ao sensorial desejado na formulação da máscara facial. Por estes motivos, optou-se por eleger a composição aerosil + goma xantana (15/5%) como adjuvantes que auxiliarão na secagem do extrato da fibra de *Cocos nucifera* variedade amarelo.

O emprego da goma xantana na produção do extrato seco do coco amarelo, deu-se por serem as gomas conhecidas como espessantes hidrofílicos, que podem alterar a plasticidade e as características de aplicação do produto final, além de serem úteis na estabilização da dispersão de sólidos e, conseqüente, prevenção da separação gradual de fases (GAFFHEY, 1992; ZAGUE *et al.*, 2007). Corroborando o presente estudo, Parente *et al.*, (2015) utilizaram a goma xantana como excipiente na produção de cosméticos hidrogéis a base de cafeína.

Numa revisão acerca das máscaras faciais disponíveis no mercado atual, foi observado que empresas de renome internacional e nacional que desenvolvem e comercializam produtos cosméticos têm empregado a goma xantana em suas formulações, como Clinique (produto: Acne Solutions Oil Control Cleansing Mask Acne Medication All Skin Types), Lancome (produto: Pure Empreinte Masque) e O Boticário (produto: Máscara Facial Nativa Spa). Ademais, muitas possuem formulações associadas à ativos vegetais, como, cumaru, jenipapo (L'Occitane), castanha do Pará (Natura), açaí (O Boticário) e outros. Nesse contexto, vale ressaltar que não há descrição na literatura de fitocosméticos a base da fibra do coco amarelo, tornando assim inédito o presente estudo e o produto em desenvolvimento.

Para o desenvolvimento do extrato seco a partir do extrato hidroalcoólico das fibras do coco amarelo foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central, avaliando assim a influência de três variáveis no processo (X1: fluxo de ar; X2: temperatura; X3: fluxo de alimentação) em dois níveis e empregando como resposta o teor de fenóis totais e teor de umidade. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 12**. A análise estatística revelou que

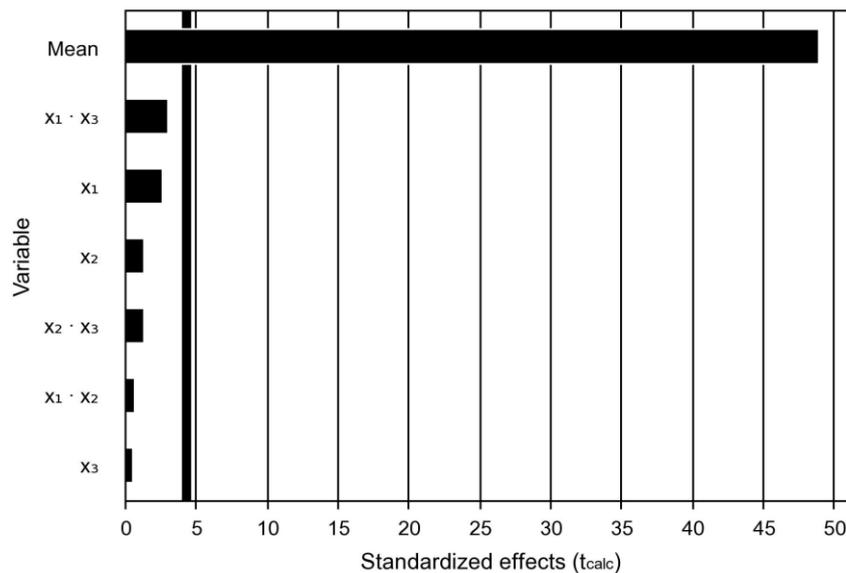
nenhuma das variáveis investigadas influenciaram significativamente ( $-4,3 \leq T_{cal} \leq 4,3$ ;  $p < 0,05$ , Teste t Student) no teor de fenóis totais do extrato seco de *C. nucifera*, e não foram observadas também interações significativas entre as variáveis (**Figura 19**). Esses resultados mostram que o método permite ainda ajustes no sentido de obter-se máxima produção de extrato seco num menor tempo e custo possíveis, com observância à qualidade.

**Tabela 12:** Planejamento fatorial  $2^3$ : teor de fenóis totais e teor umidade no extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* segundo fluxo de ar, temperatura e fluxo de alimentação no processo de secagem por *spray dryer*.

Ensaio	Fluxo de ar (L/min)	Temperatura (°C)	Fluxo de alimentação (L/hora)	Fenóis totais ± DP	Umidade ± DP
1	50	140	1,00	27,24 ± 0,49	6,80 ± 0,30
2	50	140	0,65	31,72 ± 0,21	7,60 ± 0,71
3	50	110	0,65	21,66 ± 0,10	8,00 ± 0,14
4	50	110	1,00	30,98 ± 0,57	7,50 ± 0,27
5	40	120	0,80	28,46 ± 0,11	9,80 ± 0,01
6	30	110	0,65	28,83 ± 0,03	10,60 ± 0,15
7	30	110	1,00	29,21 ± 0,09	9,60 ± 1,12
8	30	140	0,65	27,80 ± 0,53	9,80 ± 0,32
9	30	140	1,00	29,05 ± 0,78	9,94 ± 0,14

Os resultados de fenóis totais e umidade estão expressos como percentual ± DP (desvio padrão).

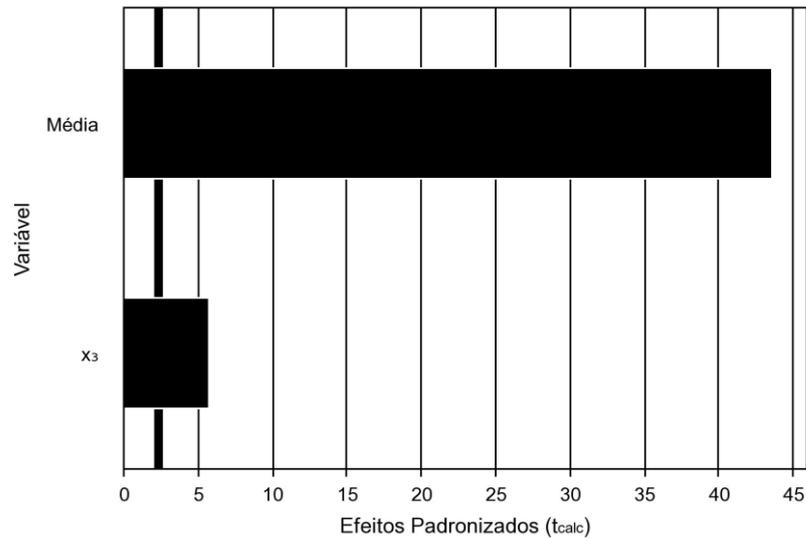
**Figura 19:** Diagrama de Pareto: efeito das variáveis (fluxo de ar, temperatura e fluxo de alimentação) sobre o teor de fenóis totais no extrato seco da fibra de *C. nucifera*.



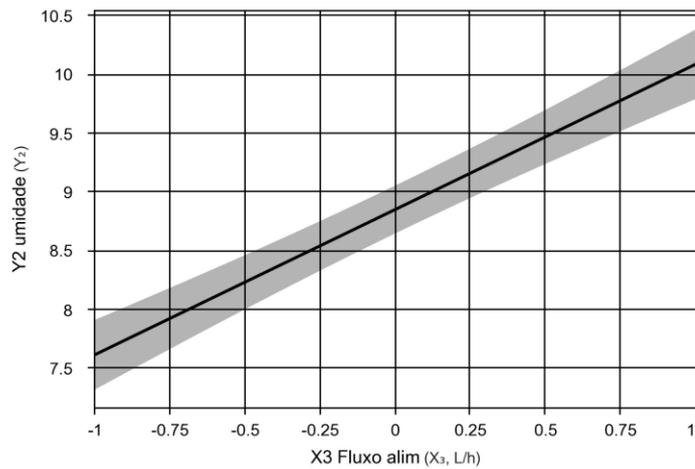
X1: fluxo de ar. X2: temperatura. X3: fluxo de alimentação

O teor de umidade constitui num parâmetro crítico para a estabilidade de um extrato seco vegetal. Nesse sentido, foi então investigado o percentual de umidade nos extratos secos de *C. nucifera* obtidos sob diferentes condições experimentais (n=9). Todos os extratos obtidos (teor de umidade: 6,8 – 10,6 %) (**Tabela 12**) apresentaram um teor de umidade acima do recomendado, ou seja, de 2 a 5 % (PRISTA, 1996). A análise estatística mostrou que dentre as variáveis investigadas, apenas o fluxo de alimentação ( $X_3$ ) mostrou efeito significativo ( $X_3-t_{calc}$ : 5,75;  $t_{tab}$ : 2,37;  $p < 0,05$ , Teste t Student) sobre o teor de umidade do extrato da planta (**Figura 20**) e não foram observadas interações significativas entre as variáveis (dados não mostrados). Na **Figura 21** pode ser observado que quanto maior o fluxo de alimentação, maior o teor de umidade no extrato do coco.

**Figura 20:** Diagrama de Pareto: efeito do fluxo de alimentação sobre o teor de umidade no extrato seco da fibra de *C. nucifera*.



**Figura 21:** Fluxo de alimentação versus teor de umidade no extrato seco da fibra de *C. nucifera*.



Diante dos resultados obtidos, e objetivando reduzir o teor de umidade no extrato de *C. nucifera*, foi então realizado um novo ensaio de secagem sob temperaturas mais elevadas, 160 °C e 180 °C, mantendo os outros parâmetros de acordo com o ponto central realizado no delineamento fatorial.

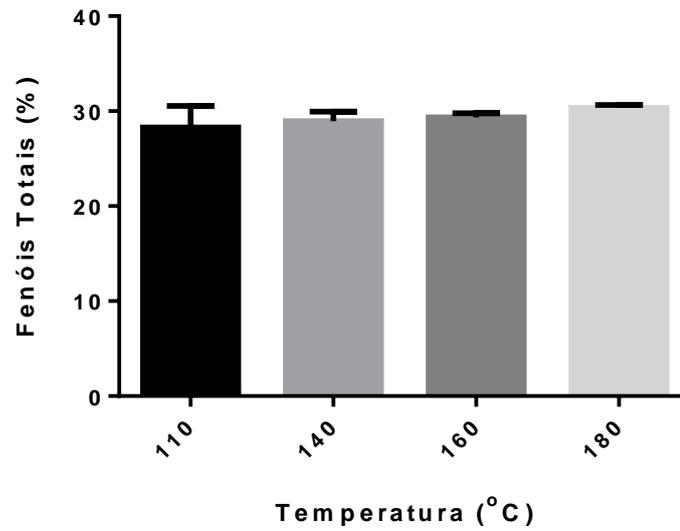
Na **Figura 22**, pode ser verificado que o teor de fenóis totais no novo extrato seco da planta (secagem 160 °C:  $29,36 \pm 0,75\%$  ; 180 °C:  $30,33 \pm 0,53\%$ ) não reduziu

significativamente em relação àquele obtido nos ensaios 2 e 4 (**Tabela 12**), que apresentaram máxima concentração de fenóis totais. Zokti e colaboradores (2016) evidenciaram que temperatura de secagem acima de 150 °C afetou consideravelmente a concentração de catequina nos extratos de chá verde (*Camellia sinensis* L.), enquanto Leach *et al.*, (1998) relataram uma elevada recuperação de carotenoides após secagem da *Dunaliella salina* sob temperaturas entre 150 – 175 °C. CARDOSO (2013) também mostrou que a produção do extrato seco a temperaturas mais elevadas não afetou o perfil cromatográfico de *Lafoensia pacari* A. St. - Hill (Lythraceae). Dessa forma, durante o processo de desenvolvimento de um extrato seco a manutenção da sua qualidade quanto ao teor de marcadores parece ser dependente da natureza desses, o que torna sempre necessário um monitoramento criterioso.

A secagem do extrato do coco variedade amarelo a 160 °C, proporcionou a obtenção de um pó (**Figura 23**) com teor de umidade muito próximo ao recomendado ( $5,82 \pm 0,49$  %) em relação as demais temperaturas investigadas (**Figura 24**).

Importante destacar que o teor de FT encontrado no ESCNA torna esse extrato obtido a partir de produto residual do comércio do coco, bastante competitivo se observarmos outros extratos secos comercializados como o extrato seco de chá verde (*Camelia sinensis*) que possui em torno de 32% de FT (PINTO *et al.*, 2015) e constitui-se como um dos produtos naturais mais comercializados por vários segmentos industriais. Ademais, inúmeros estudos (PINTO *et al.*, 2015; NISHIYAMA, *et al.*, 2010; PASCUAL, *et al.*, 1994; STANOJEVIC, *et al.*, 2009; ALAM *et al.*, 2010) têm mostrado que as propriedades biológicas da espécie estão relacionadas pelo menos em parte a presença de fenóis na planta.

**Figura 22:** Resultado do teor de fenóis totais dos pós sob as diferentes condições de temperatura avaliadas



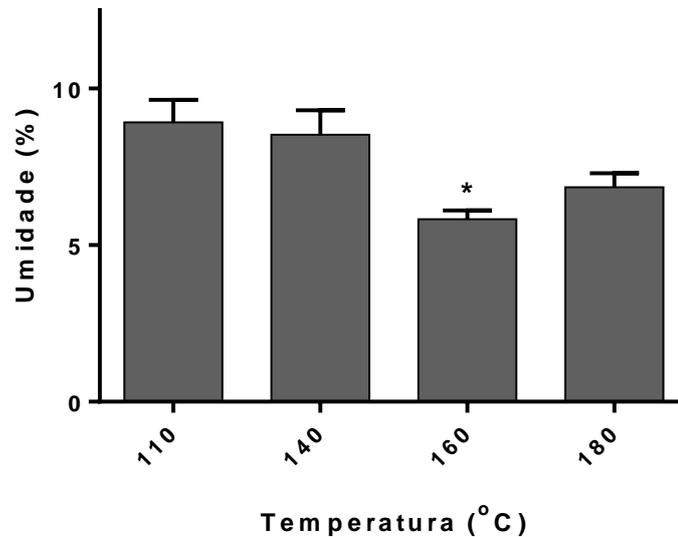
Resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (ANOVA com pós-teste de Tuckey –  $\alpha = 0,05$ )

**Figura 23:** Extrato seco da fibra de *C. nucifera* obtido por secagem em *spray dryer*



Condições de secagem: Temperatura = 160 °C; Fluxo de alimentação = 0,8 L/hora; Fluxo de ar = 40 L/min

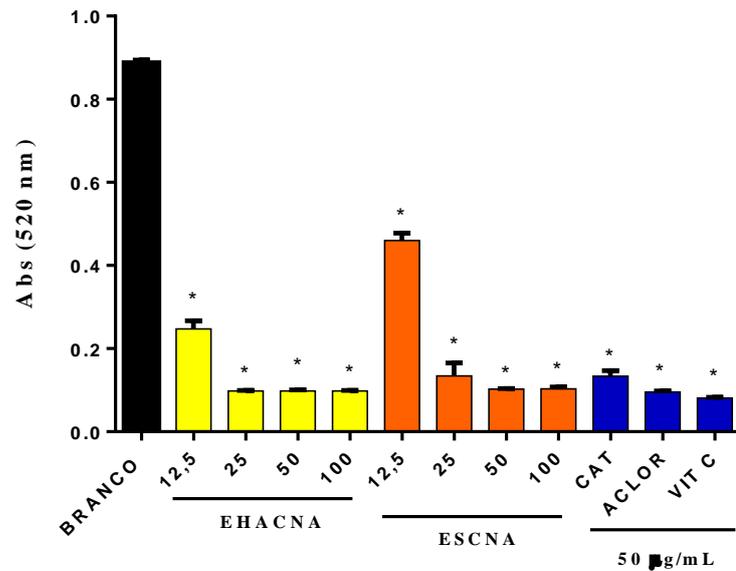
**Figura 24:** Resultado do percentual de umidade dos pós sob as diferentes condições de temperatura avaliadas



Resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* vs T 110 °C (p < 0,05, ANOVA Tukey)

A fim de avaliar se o processo de secagem afetou o potencial sequestrador de radicais livres encontrado no extrato hidroalcoólico de coco amarelo (**Item 4.3 - Figura 16**). Na **Figura 25** pode ser observado que a secagem do extrato de coco amarelo não afetou o efeito antioxidante/sequestrador do radical DPPH da planta (EHACNA), em especial nas concentrações de 25 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $0,134 \pm 0,11$ ) o extrato seco de *C. nucifera* (ESCNA) apresentou resposta comparável a catequina ( $0,134 \pm 0,005$ ) e na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  não apresentou diferença estatística em relação ao padrão ácido clorogênico, exibindo 88,5 % de inibição do radical DPPH. Nesse contexto, pode-se perceber que o processo de produção do extrato seco do coco amarelo não comprometeu o potencial antioxidante deste, mantendo, assim, seu perfil promissor como antioxidante. Dessa forma, diante dos resultados obtidos, na **Tabela 13** estão descritas as condições de secagem do EHACNA selecionadas para a produção do ESCNA.

**Figura 25:** Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres do extrato hidroalcoólico e extrato seco da fibra de *C. nucifera* variedade amarelo determinado pelo ensaio do DPPH.



Grupo amarelo: extrato hidroalcoólico de coco amarelo (EHACNA). Grupo laranja: extrato seco de coco amarelo (ESCNA). Controle: solução de DPPH; CAT: catequina; ACLOR: ácido clorogênico; VIT C: ácido ascórbico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* vs Controle ( $p < 0,05$  – ANOVA e Teste de Tukey).

**Tabela 13:** Condições operacionais padronizadas para secagem do extrato hidroalcoólico de *Cocos nucifera* variedade amarelo por *spray dryer*

Parâmetros	Dados experimentais
Temperatura de entrada do ar de secagem ( $^{\circ}\text{C}$ )	160
Fluxo de alimentação (L/hora)	0,8
Fluxo de ar (L/min)	40

#### 4.5 Caracterização do extrato seco da fibra de *Cocos nucifera*

A análise do ESCNA foi realizada afim de determinar quais fenóis seriam possivelmente responsáveis pelo efeito antioxidante do extrato.

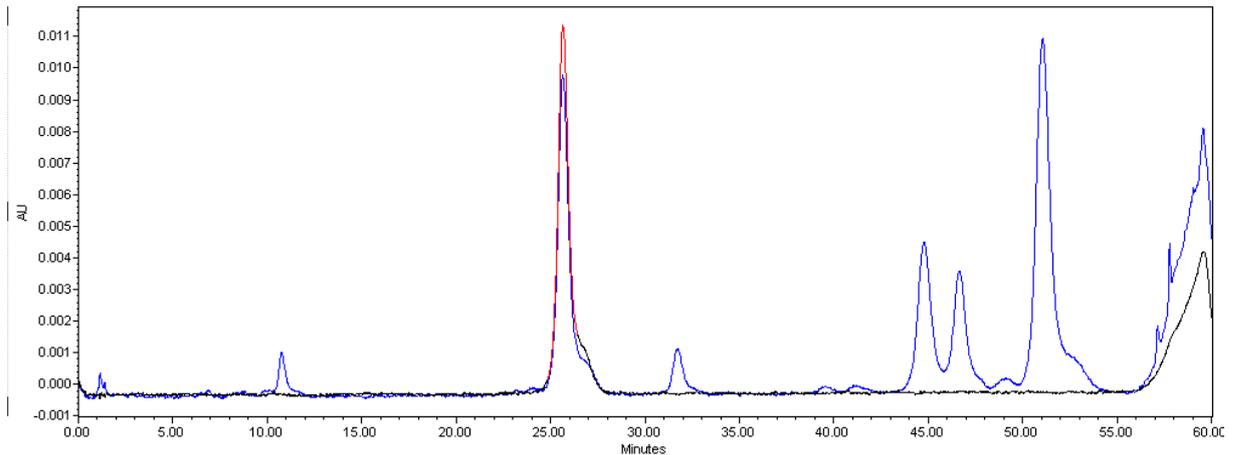
##### 4.5.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para identificação e quantificação de marcadores no extrato da fibra de *Cocos nucifera*:

O controle de qualidade é considerado uma das etapas essenciais no desenvolvimento de produtos para fins farmacêuticos, alimentício ou cosméticos, por viabilizar a padronização de matérias-primas e produtos acabados. Diversos métodos cromatográficos que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal têm sido empregados tanto para o conhecimento da composição química, do princípio ativo e de compostos tóxicos de uma planta, como também para a determinação de uma substância ou grupo de substâncias que sirvam como marcador (es) daquela espécie (DRASAR; MORAVCOVA, 2004; LIU *et al.*, 2007). Dentre os métodos analíticos mais utilizados com essa finalidade, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (ZHAO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência associada à detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) é uma técnica amplamente utilizada para identificação e quantificação de fármacos em extratos vegetais e, tem sido uma das técnicas de escolha para análise de polifenóis (ZIMMER *et al.* 2012; COSTA *et al.*, 2015; PESCHEL, POLITI, 2015). Como exemplo, podemos relacionar a análise de catequina por CLAE-DAD realizada em fase reversa por métodos isocrático ou em gradiente que são capazes de separar os quatro isômeros ópticos (2R, 3S)-2,3-*trans*-(+)-catequina e (2S, 3R)-2,3-*trans*-(-)-catequina, (2R, 3R)-2,3-*cis*-(+)-epicatequina e (2S, 3S)-2,3-*cis*-(-)-epicatequina (WANG *et al.*, 2000; ZUO *et al.*, 2002; ZU *et al.*, 2006). Além disso, também pode ser analisada por CLAE acoplado a detector de fluorescência (DIAS *et al.*, 2010).

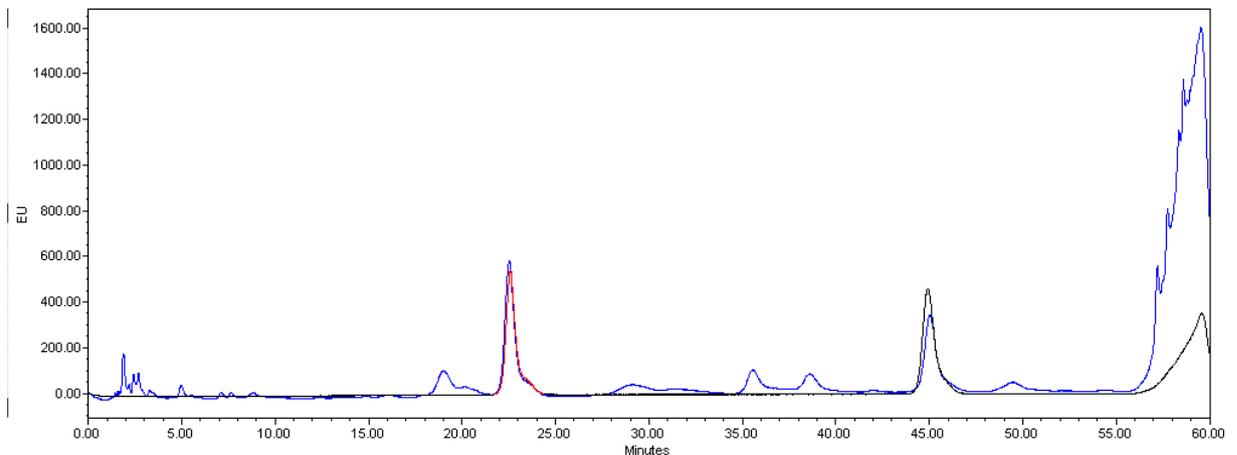
Com base em estudos químicos anteriores de *C. nucifera*, foi investigado a presença de três fenóis, catequina, epicatequina e ácido clorogênico no ESCNA. Nas **Figuras 26 e 27**, podem ser observados os cromatogramas dos padrões (catequina, epicatequina e ácido clorogênico) bem como do ESCNA. O perfil cromatográfico do ESCNA mostrou a presença de vários picos, e parte desses compreendem o ácido clorogênico (Tr: 25,6 min) (**Figura 26**), catequina (Tr: 22,5 min) e epicatequina (Tr: 44,9 min) (**Figura 27**).

**Figura 26:** Cromatograma do extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* variedade amarela por CLAE-DAD: análise do ácido clorogênico



Ácido clorogênico – linha vermelha (T.R. = 25,65 min) e extrato seco – pico do ácido clorogênico (T.R. = 25,63 min).

**Figura 27:** Cromatograma do extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* variedade amarela por CLAE acoplado a detector de fluorescência: análise da catequina e epicatequina



Catequina – linha vermelha (T.R. = 22,56 min) e epicatequina – linha preta (T.R. = 44,95 min) e do extrato seco (Pico catequina = 22,52 min; Pico epicatequina = 45,03 min).

De acordo com os cromatogramas apresentados nas figuras acima, o extrato seco de *C. nucifera* apresentou picos de retenção majoritários em torno de 25,63 min (detector DAD) e 22,52 e 45,03 min (detector fluorescência) próximos aos observados para os marcadores ativos avaliados ácido clorogênico, catequina e epicatequina, respectivamente.

Para a quantificação dos marcadores no extrato seco da fibra de *C. nucifera*, foram construídas curvas de calibração para catequina, epicatequina e ácido clorogênico (**Tabela 14**). Após comprovação da linearidade do método ( $r \geq 0,99$ ), este foi empregado na determinação

do teor dos marcadores no ESCNA. A concentração de catequina encontrada no extrato ESCNA foi de 0,36 %  $\pm$  0,09; epicatequina foi de 0,23 %  $\pm$  0,05 e de ácido clorogênico foi de 0,20 %  $\pm$  0,006.

**Tabela 14** – Análise da curva de calibração dos padrões catequina, epicatequina e ácido clorogênico, marcadores ativos do extrato de *Cocos nucifera*.

Marcador	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Catequina	$Y = 2E+07x - 3E+07$	0,9975
Epicatequina	$Y = 2E+07x - 2E+07$	0,9968
Ácido Clorogênico	$Y = 73939x - 30281$	0,9991

Diante dos resultados, observa-se que as condições cromatográficas obtidas permitiram uma boa separação dos constituintes químicos sem interferências dos demais componentes da matriz/extrato seco das fibras de *C. nucifera*. Além disso, possibilitou a identificação de três compostos fenólicos na composição do extrato seco os quais são responsáveis, pelo menos em parte, seja atuando em sinergismo ou isoladamente, pela atividade antioxidante apresentada pelo extrato do coco. Contudo, estudos adicionais ainda são necessários para que a natureza química dos demais picos seja identificada, contribuindo, assim, para uma melhor descrição do perfil cromatográfico/*fingerprint* da espécie, ferramenta bastante útil e preconizada no controle de qualidade de insumos farmacêuticos e medicamentos de origem vegetal (BRASIL, 2014; ZHANG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos por nosso estudo, corroboram com as pesquisas realizadas por Esquenazi *et al.*, (2002) e Silva *et al.*, (2013) que identificaram, entre outros compostos fenólicos, catequina e epicatequina em frações de acetato de etila da fibra de coco por CLAE. Oliveira (2015) também mostrou a presença do ácido clorogênico em extratos de coco.

Inúmeros estudos têm comprovado os efeitos biológicos de polifenóis, incluindo efeito antioxidante, neuroprotetor, anti-inflamatório e imuno-estimulante (FORMICA; REGELSON, 1995; GAO *et al.*, 2001; AZUL *et al.*, 2016; FREITAS, 2015). Além disso, evidências apontam para a eficácia potencial de compostos fenólicos na prevenção e atenuação de sintomas de distúrbios da pele, como por exemplo o processo de envelhecimento extrínseco

(WITTENAUER, *et al.*, 2015; KARIM *et al.*, 2014; DANCIU *et al.*, 2015; SKORKOWSKA-TELICHOWSKA *et al.*, 2013). Assim, esses estudos ratificam que os polifenóis presentes no ESCNA, tais como catequina, epicatequina e ácido clorogênico, contribuem para o efeito antioxidante apresentado pela planta.

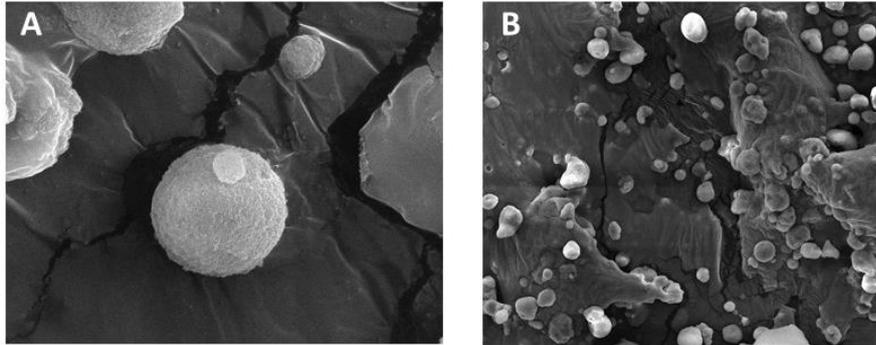
#### ***4.5.2 Análise morfológica das partículas do extrato seco da fibra de Cocos nucifera através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)***

A caracterização morfológica das partículas de produtos bioativos é bastante importante no âmbito da tecnologia farmacêutica. Esse parâmetro consiste em uma característica determinante do comportamento dos sólidos a granel e de sistemas multiparticulados, considerando que muitas das propriedades físicas e químicas desses sistemas dependem da forma da partícula e da geometria da superfície (ARARUNA, 2013).

A compreensão sobre a morfologia das partículas é de grande valia, pois este é um dos parâmetros utilizados na padronização de matérias-primas, por exemplo, além de ser um conhecimento útil e indispensável para o controle de qualidade durante o desenvolvimento de produtos padronizados.

A morfologia das partículas do ESCNA foi investigada empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na **Figura 28** pode ser observado que o pó apresentou, em maior proporção, formato esférico e tamanho uniforme, que são características bastante encontradas em produtos naturais obtidos através de secagem por aspersão (SOUZA, 2003). Muitas das características dos extratos secos, como a distribuição e o tamanho das partículas podem estar relacionados ao tamanho da gotícula formada durante a nebulização, ao fluxo de alimentação, ao conteúdo de sólidos e a tensão superficial do produto fluido a secar (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

**Figura 28:** Fotomicrografias dos grânulos do extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* variedade amarelo por microscopia eletrônica de varredura



A distribuição e o tamanho das partículas podem estar relacionados ao tamanho da gotícula formada pelo processo de aspersão, ao fluxo de alimentação, ao conteúdo de sólidos e a tensão superficial do produto fluido a secar (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

#### **4.6 Desenvolvimento de formulação piloto de máscara facial *pell off* a base de extrato seco da fibra de *Cocos nucifera* variedade amarelo**

O processo de desenvolvimento de produtos cosméticos, nas mais variadas formas de apresentação, necessita de uma rigorosa seleção das matérias-primas envolvidas e avaliação das variáveis tecnológicas aplicadas de modo a assegurar a qualidade físico-química, eficácia, segurança e atração/adeseção do usuário ao produto final (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002; SIMMONS, 2000; MAIA CAMPOS, 2002).

A máscara facial formulada a partir de ESCNA apresentou, após aplicação na pele, flexibilidade, boa capacidade formadora de filme, adequada aderência e desprendimento além de um tempo de secagem por volta de aproximadamente 20 minutos (**Figura 29**).

**Figura 29:** Formulação piloto de máscara facial *peel off* à base de extrato seco da fibra de *C. nucifera*



#### **4.6.1 Estudo de estabilidade preliminar**

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos fornecem informações que indicam o grau de estabilidade relativa, variável com o tempo e em função dos fatores que aceleram ou retardam alterações no produto, nas diversas condições que o produto possa ser exposto desde a sua fabricação até o término do seu prazo de validade (BRASIL, 2004).

Além disso, os dados obtidos com os ensaios de estabilidade contribuem com os estudos de desenvolvimento, gerando informações que auxiliam, por exemplo, na escolha dos componentes da formulação e materiais adequados de acondicionamento (BRASIL, 2004; BABY *et al.*, 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos que contém estudos e recomendações que fornecem subsídios para a realização dos estudos de estabilidade e que orientou o presente estudo.

As formulações branca (FB) e à base de extrato seco de *C. nucifera* (FExt) foram armazenadas em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) e em estufa ( $45 \pm 2$  °C) e avaliadas semanalmente por um período total de 21 dias. Ao longo desse tempo, as características organolépticas (aspecto, cor e odor) das formulações foram mantidas, com exceção da cor da FExt submetida a temperatura de  $45 \pm 2$  °C, que apresentou discreto escurecimento na última semana de análise (T<sub>21</sub>). Esse fato provavelmente está relacionado com a oxidação dos componentes causada pela alta temperatura ou por reações com o oxigênio atmosférico no qual o produto ficou em contato (ZANON, 2010), o que parece ser uma situação não muito incomum para produtos à base de extratos vegetais (OLIVEIRA, 2007; FONSECA, 2007).

Na **Tabela 15** estão descritos os valores de pH obtidos em todos os dias de ensaio. Foi observado que a variação de pH das formulações, em todas as condições analisadas, foi inferior a 10%, apresentando valores de pH compatível ao pH levemente ácido da pele (4,5 – 5,8) (LEONARDI *et al.*, 2002). Nota-se que as formulações à base de extrato seco de coco foram as que apresentaram os menores valores de pH, fato que pode estar relacionado a presença dos compostos fenólicos ácidos do extrato.

**Tabela 15:** Avaliação do pH das formulações das máscaras faciais branca e à base de extrato seco da fibra de *C. nucifera*.

	FB		FExt	
	Temp. Ambiente (27 ± 2°C)	Estufa (45 ± 2°C)	Temp. Ambiente (27 ± 2°C)	Estufa (45 ± 2°C)
<b>T<sub>0</sub></b>	5,31 ± 0,03	5,34 ± 0,02	5,18 ± 0,09	5,17 ± 0,01
<b>T<sub>7</sub></b>	5,60 ± 0,04	5,48 ± 0,01	5,36 ± 0,03	5,26 ± 0,02
<b>T<sub>14</sub></b>	5,38 ± 0,03	5,24 ± 0,01	5,20 ± 0,04	5,07 ± 0,02
<b>T<sub>21</sub></b>	5,26 ± 0,03	5,13 ± 0,02	5,14 ± 0,05	4,96 ± 0,02

FB: formulação de máscara branca. FExt: formulação de máscara à base de extrato seco de *C. nucifera*. Os resultados são expressos como média ± DP.

#### 4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante

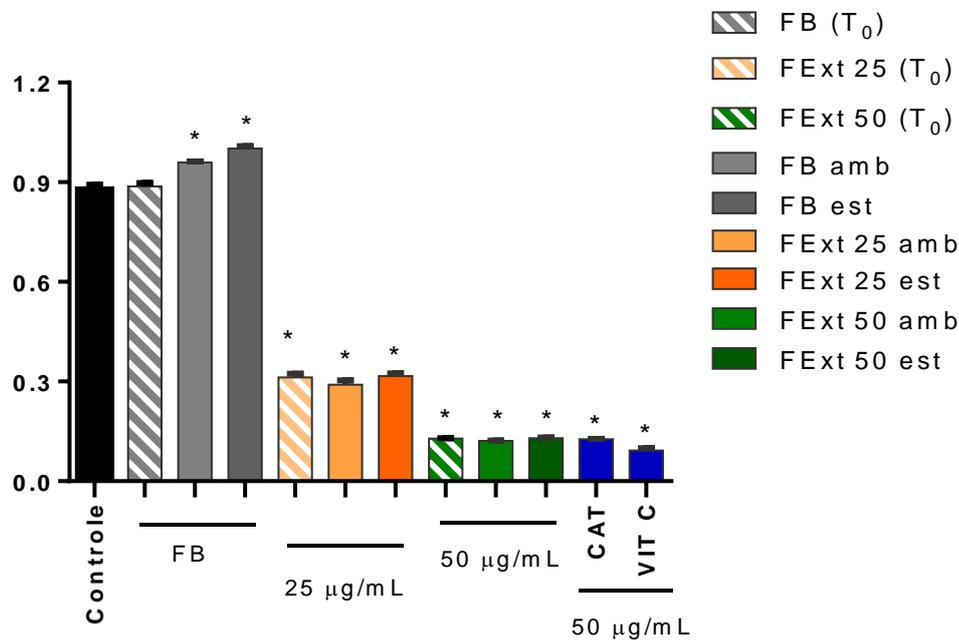
Afim de certificar que a máscara facial desenvolvida à base de ESCNA manteve as características antioxidantes encontradas nos extratos líquido e seco da fibra do coco foi realizado o ensaio do DPPH no dia seguinte em que a formulação foi produzida (T<sub>0</sub>) e ao final do estudo de estabilidade (T<sub>21</sub>), após armazenamento em duas condições extremas de temperatura (27 °C e 45 °C) (**Figura 30**).

Os resultados não mostraram diferença entre os grupos analisados no início e após o ensaio de estabilidade, confirmando que as condições de armazenamento não afetaram as propriedades do produto no período avaliado, com exceção da formulação branca que apresentou resultados superiores ao grupo controle na análise no T<sub>21</sub>. A esse fato sugere-se que os próprios componentes presentes no extrato serviram como “conservantes” da formulação (FExt), já que nem na máscara branca nem na máscara à base de extrato de coco foi adicionado

EDTA (agente quelante) para que não houvesse interferências nos ensaios de atividade antioxidante.

Ainda, observa-se que na menor concentração avaliada (25 µg/mL;  $0,3067 \pm 0,01$ ) da formulação com extrato seco já houve redução significativa da absorvância em relação ao controle ( $0,8786 \pm 0,01$ ). Além disso, a máscara facial de ESCNA a concentração de 50 µg/mL (% de inibição do DPPH 86 %) exibiu efeito antioxidante comparável aos antioxidantes padrões (catequina e vitamina C), que reduziram em 85,6% e 89%, respectivamente o radical livre DPPH.

**Figura 30:** Avaliação do potencial antioxidante da máscara facial de ESCNA determinado pelo ensaio do DPPH

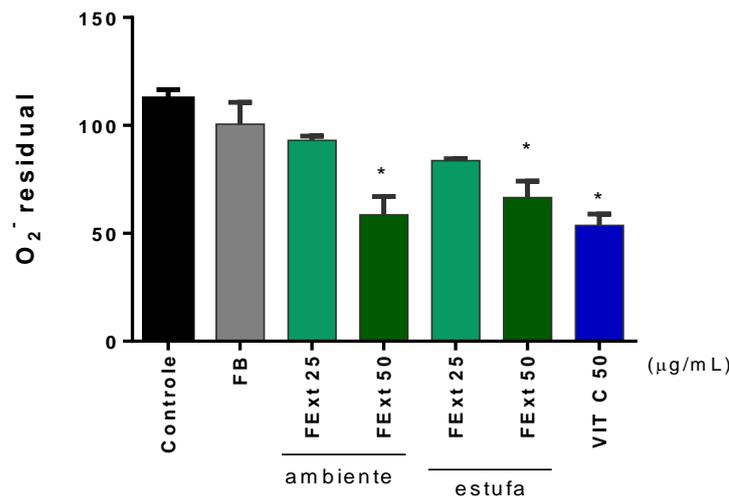


FB amb, est: formulação branca da máscara facial armazenada em temperatura ambiente (27°C) ou estufa (45°C); FExt amb, est: formulação de máscara facial à base de extrato seco de coco armazenada em temperatura ambiente ou estufa (45°C). Controle: solução de DPPH; CAT: catequina; VIT C: ácido ascórbico. Grupo com ranhuras: análise feita no tempo zero (T<sub>0</sub>). Grupo sem ranhuras: análise feita após 21 dias (T<sub>21</sub>). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. \* vs Controle (p < 0,05 – ANOVA e Teste de Tukey).

Prosseguindo os estudos com a máscara facial de ESCNA foi avaliado o seu efeito sequestrador do radical ânion superóxido (**Figura 31**). Foi observado que a máscara facial do

coco mesmo submetida à armazenagem sob condições extremas entre si (27 e 45 °C) manteve seu efeito antioxidante num padrão próximo a vitamina C (referência). A máscara facial de ESCNA na concentração de 50 µg/mL, reduziu em 44,3% o nível do radical superóxido, enquanto que a vitamina C promoveu uma redução da ordem de 52,0 %.

**Figura 31:** Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres da máscara facial branca e à base de extrato seco da fibra de *C. nucifera*: sequestro do ânion superóxido.



FB: formulação branca de máscara facial; FExt: formulação de máscara facial à base de extrato seco de coco (25 ou 50 µg/mL). Controle: solução sem xantina oxidase/nenhuma produção do ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup>; VIT C: ácido ascórbico. Os resultados são expressos como média ± E.P.M (p < 0,05 – ANOVA e Teste de Tukey).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, conclui-se que a formulação piloto da máscara facial *peel off* a base do ESCNA mostrou características físicas e organolépticas de interesse, além de estabilidade e efeito antioxidante comparável a vitamina C, antioxidante extensivamente utilizado na formulação de cosméticos de uso facial por indústrias nacionais e internacionais. Certamente, os fenóis presentes no ESCNA são responsáveis, pelo menos em parte pela ação antioxidante da máscara facial, sejam atuando isoladamente ou de maneira sinérgica.

## 5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo farmacognóstico de *Cocos nucifera* pode-se fazer as seguintes conclusões:

- O estudo de otimização do método analítico para quantificação de fenóis totais por espectrofotometria UV/visível nos extratos de *Cocos nucifera* proporcionou a obtenção de uma metodologia com redução de custos e tempo, mantendo a eficiência método. Além disso, para fins de caracterização e doseamento, o método analítico otimizado foi validado, mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto;
- No estudo de otimização do extrato líquido do coco variedades amarela e verde, a maceração permitiu a obtenção de extratos com maior concentração relativa de fenóis totais (FT) em relação ao método anterior desenvolvido no laboratório, enquanto à associação ao método da turbólise incrementou o teor de resíduo sólido. Nas condições investigadas a variedade de coco amarelo apresentou os melhores resultados, incluindo efeito antioxidante;
- O processo de desenvolvimento do extrato seco de *C. nucifera* variedade amarelo (ESCNA) por *spray dryer*, proporcionou a obtenção de um pó com características físicas, morfológicas e químicas de interesse, comprovado pelo teor de FT totais e de catequina, epicatequina e ácido clorogênico no ESCNA;
- O ESCNA mostrou efeito sequestrador frente aos radicais DPPH e ânion superóxido;
- A máscara facial ESCNA mostrou estabilidade e efeito antioxidante comparável à vitamina C.

Nesse contexto, diante dos resultados obtidos o estudo permitiu a obtenção de um extrato hidroalcoólico de coco otimizado, que resultou no desenvolvimento do ESCNA com características tecnológicas de interesse, conferindo à máscara facial ESCNA uma ação antioxidante promissora, com potencial emprego como cosmético *anti-aging*. Contudo, estudos adicionais são ainda necessários, incluindo avaliações biológicas *in vitro* e *in vivo*, além de análises químicas complementares do fitocosmético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. III Caderno de Tendências 2014-2015 Higiene Pessoal - Perfumaria- Cosméticos. São Paulo: BB Editora. Disponível em [http://www.abihpec.org.br/ABIHPEC\\_Caderno\\_de\\_Tendencias\\_2014\\_2015.pdf](http://www.abihpec.org.br/ABIHPEC_Caderno_de_Tendencias_2014_2015.pdf). Acesso em 02 março de 2017(a).
- ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-jan-2014/>. Acesso em 05 fevereiro de 2017 (b).
- AGRIANUAL 2012: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, 2012.
- ALAM, N.; YOON, K.N.; LEE, K.R.; SHIN, P.G.; CHEONG, J.C.; YOO, Y.B.; SHIM, M.J.; LEE, M.W.; LEE, U.Y.; LEE, T.S. Antioxidant Activities and Tyrosinase Inhibitory Effects of Different Extracts from *Pleurotus ostreatus* Fruiting Bodies. **Mycobiology**. v. 38, n. 4, p. 295-301, 2010.
- ALIAS, L. M.; MANOHARAN, S.; VELLAICHAMY, L.; BALAKRISHNAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R. Protective effect of ferulic acid on 7,12dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, p. 205, 2009.
- ALVIANO, D.S.; RODRIGUES, K.F.; LEITÃO, S.G.; RODRIGUES, M.L.; MATHEUS, M.F.; FERNANDES, P.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, C.S. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 269-273, 2004.
- ARAGÃO, W.M. *Coco: pós-colheita*. Brasília- PE: Embrapa Informação tecnológica, 2002. Série frutas do Brasil.
- ARAGÃO, W.M., TUPINAMBA, E.A., ANGELO, P.C.S., RIBEIRO, F.E. **Seleção de cultivares de coqueiro para diferentes ecossistemas do Brasil**. Brasília: Embrapa - SPI, 2010. Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.
- ARARUNA, S. M. **Desenvolvimento e padronização (HPLC-DAD) do extrato seco por SPRAY-DRYER de *Amburana cearensis* A. C. SMITH (Cumaru)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará. p. 124, 2008.
- ARARUNA, S.M. **Desenvolvimento do extrato seco padronizado por Spray drying de *Amburana cearensis* A. C. Smith (cumaru): otimização, caracterização e avaliação farmacológica**. 2013. 100 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovações Tecnológicas em Medicamentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- ARARUNA, S.M.; SILVA, A.H.; CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.S.; LEAL, L.K.A.M. Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Rev. Brasileira de Farmacog.** v. 23, n 1, p. 132-137, 2013.

AWUA, A.K.; DOE, E.D.; AGYARE, R. Exploring the influence of sterilisation and storage on some physicochemical properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Bio Med Central**. v. 4, n. 451, p. 1-9, 2011.

AZUL, F.V.C.S.; MIRON, D.S.; MACHADO, N.M.J.; LEAL, L.K.A.M. **Atividade antiinflamatória do Amburosideo A, glucosídeo fenólico de *Amburana cearensis*, em células do sistema nervoso central, micróglia bv2**. Encontros Universitário da UFC. v. 1, 2016.

BABY A.R.; MACIEL C.P.M, ZAGUE V; KANEKO T.M.; CONSIGLIERI V.O.; VELASCO M.V.R. Estabilidade de produtos de aplicação tópica: ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados. **Int. J. Pharm. Compd** (Ed Bras). v. 6, p.130 -139, 2004.

BALASUNDRAMA, N.; SUNDRAM, K.; SAMMANA, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chem**. v, 99, p. 191- 203, 2006.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, p.732, 2011.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

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

BERLINCK, N.S. Estudos de Pré-Formulação e Desenvolvimento de Preparações Cosméticas - Formulação de Produtos Dermocosméticos com Aplicação em Procedimentos Estéticos. 2015. 92 p. Trabalho de Conclusão de Curso (**Graduação em Farmácia – Bioquímica**) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

BICKERS, D.R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **J. Investig. Dermatol**. v. 126, p. 2565–2675, 2006.

BLAINSKI, A., LOPES, G.C., MELLO, J.C.P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**. v. 18, p. 6852-6865, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. 45 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 211 de 14 de julho de 2005. Estabelece a Definição e a Classificação

de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 26, de 13 de maio de 2014 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 2014

BRENNER, E. Cuidados com os diferentes tipos de pele. Sabatovich, CARVALHO, R. F. **Dossiê Técnico**, Rede de Tecnologia da Bahia – RETEC/BA, Costeiros. Documentos,164, 2007.

CAI, Y.J; MA, L.P.; HOU, L.F.; ZHOU, B.; YANG, L.; LIU, Z.L. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. **Chemistry and Physics of Lipids, Limerick**. v.120, p.109- 117, 2002.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Artmed. Porto alegre, 2003.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; GONÇALVES, E.M.B.; LEONARDI, G.R. **Formulário dermocosmético**. 1. ed. São Paulo: Tecnopress, 1999.

CARDOSO, N.Q. **Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir de *Lafoensia pacari* A. St. - Hill (Lythraceae)**. 2013, 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

CARRIJO, O.A.; LIZ, R.S.; MAKISHIMA, N. Fibra do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 553-535, 2002.

CHAKRABORTY, M.; MITRA, A. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera* mesocarp. **Food Chemistry**. v. 107, p. 994-999, 2008.

CHEN Y, LYGA J. Brain-Skin Connection: Stress, Inflammation and Skin Aging. **Inflamm Allergy Drug Targets**. v. 13, n. 3, p. 90-177, 2014.

COLIPA. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association. Disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/>. Acesso em 05 de maio de 2017.

CORREA A. T. P. **Nutraceuticos para aplicação cosmética**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

COSTA, Adilson. **Tratado internacional de cosmeceuticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

COSTA, M.F.B.; LIBÓRIO, A.B.; TELES, F.; MARTINS, C. S.; SOARES, P.M.G.; MENESES, G.C.; RODRIGUES, F.A.P.; LEAL, L.K.A.M.; MIRON, D.; SILVA, A. H. Red propolis ameliorates ischemic–reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, 2015.

COSTA, R.S.C.; NASCENTE, A.S., RIBEIRO, G.D., FERREIRA, M.G.R. **Cultivo do Coqueiro em Rondônia**. Porto Velho, Rondônia: EMBRAPA, 2005.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**. v, 15, p. 7313- 7352, 2010.

DANCIU, C.; VLAIA, L.; FETEA, F.; HANCIANU, M.; CORICOVAC, D.E.; CIURLEA, S.A.; SOICA, C.M.; MARINCU, I.; VLAIA, V.; DEHELEAN, C.A.; et al. Evaluation of phenolic profile, antioxidant and anticancer potential of two main representants of Zingiberaceae family against B164A5 murine melanoma cells. **Biol. Res**. v. 48, p. 1–9, 2015.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J.P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability and evidence effects against chronic diseases. **Antioxid. Redox Signal**. v. 18, p. 1818- 1892, 2013.

DENAVERRE MG. The chemistry and manufacture of cosmetics. 2nd ed. Orlando: Continental; 1975.

DITTMAN, R.H., ZEMANSK, M.W. **Heat and thermodynamics**, Mc Graw Hill, p. 543, 1981.

DRAELOS, Z.D.M.D. Cosmecêuticos. 2. ed. – São Paulo: Elsevier Editora Ltda, 2009.

DREHER, F. & THIELE, J. Antioxidants. In: Baran, R. e Maibach, H. I. **Textbook of Cosmetic Dermatology**. London: Informa Healthcare. p. 115-122. 2010.

DUTHIE, G.G.; BROWN, K.M. Reducing the risk of cardiovascular disease. In: GOLDBERG, **Functional foods**. New York: Chapman and Hall, 1994.

DZIALO, M.; MIERZIAK, J.; KORZUN, U.; PREISNER, M.; SZOPA, J.; KULMA, A. The Potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **Int. J. Mol. Sci**. v. 17, p. 160, 2016.

ERMER J & PLOSS HJ. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.37, n. 5. p. 859–870, 2005.

ESCARPA, A., GONZÁLEZ, M.C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 427, p. 119-127, 2001.

ESQUEZANI, D. ; WIGG, M.D. ; MIRANDA, M.M.F.S. ; RODRIGUES, H.M. ; TOSTES, J.B.F. ; ROZENTAL, S. ; SILVA, A.J.R. ; ALVIANO, C.L. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Science Direct**, v. 153, p. 647-652, 2002.

EUROMONITOR. **Euromonitor internacional: business intelligence, company profiles, strategic market analysis**. Disponível em: [www.euromonitor.com](http://www.euromonitor.com). Acesso em 04 de maio de 2017.

EVERETTE, J.D., BRYANT, Q.M., GREEN, A.M., ABBEY, Y.A., WANGILA, G.W., WALKER, R.B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 8139–8144, 2010.

FOALE, M.; HARRIES, H. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). **Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry**. Permanent Agriculture Resources (PAR), 2009.

FONSECA, Y.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. 2007. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FONSECA, F.N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – CHAMBÁ: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE – DAD) e avaliação farmacológica**. 2009, 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.** v. 33, n. 12, p. 1061- 1080, 1995.

FORREST, G.I., BENDALL, D.S. The Distribution of Polyphenols in the Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). **Biochem. J.** v. 113, p. 741-755, 1969.

FREITAS, R.B. **Estudo Farmacognóstico e Avaliação do Potencial Antioxidante de *Cocos nucifera*: uma Fonte Sustentável para o Desenvolvimento de Insumo Farmacêutico**. 2010. 53 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

GAFFHEY, M.D. "**BeautyM asks,**" in **Cosmetics Science and Technology**, S. Balsam, S. D. Gershon, M. M. Rieger, E. Sagarin, and S.J. Strianse, Eds. (Krieger Publishing Company, Florida, p. 307-315, 1992.

GALLICE, W.C. **Caracterização do potencial antioxidante de vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas multivariadas**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GAO, Z.; HUANG, K.; XU, H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. **Pharmacol. Resid.** v. 43, n.2, p. 173-178, 2001.

GUTIÉRREZ, J.M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C.M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science.** v. 13, n. 4, p. 245- 251, 2008.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HODGSON, E.K.; FRIDOVICH, I. the accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase. A requiem for H<sub>2</sub>O<sup>4</sup>. **Biochemical and Biophysica Acta.** v. 430, p. 182-188, 1976.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use cancer prevention. **Nutr. Cancer**. v. 62, p. 1 – 20, 2010.

International Conference on Harmonisation: ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, nov .2005 <http://somatek.com/content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf>. Acesso em 04 de outubro de 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KARIM, A.A.; AZLAN, A.; ISMAIL, A.; HASHIM, P.; ABD GANI, S.S.; ZAINUDIN, B.H.; ABDULLAH, N.A. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. **BMC Complement. Altern. Med**. v. 14, p. 381, 2014.

KASIOTIS, K. M. et al. Revisiting Greek Propolis: Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. **Plos One**, v. 12, n. 1, 2017.

KIM, R.H.; ARMSTRONG, A.W. Nonmenlanoma skin cancer. **Dermatologic Clinics**. v. 30, n. 1, p. 125 139, 2012.

KLINGMAN, A.M. Cosmecêuticos: a terceira categoria. **Cosmetics & Toiletries**. v. 14, 2002.

KOSCHEK, P.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; GATTASS, C.R. The husk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic Activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, p. 1339-1343, 2007.

LEACH, G.; OLIVEIRA, G.; MORAIS, R. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a  $\beta$ -carotene rich powder. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 20, n. 2, p. 82-85, Feb 1998.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 1 -8, 2002.

LEUNG, L.K.; SU, Y.L.; CHEN, R.Y.; ZHANG, Z.H.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. **Journal of Nutrition**. v.131, n. 9, p. 2248- 2251, 2001.

LIMA, E.B.C. **Efeitos Comportamentais e Neuroprotetor do Extrato Aquoso e Hidroalcoólico de *Cocos nucifera* L. em camundongos**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Fortaleza, 2015.

LIMA, E.B.C.; SOUSA, C.N.S.; VASCONCELOS, G.S.; MENESES, L.M.; PEREIRA, Y.F.S.; XIMENES, N.C.; JUNIOR, M.A.S.; MATOS, N.C.B.; FREITAS, R.B.; MIRON, D.; LEAL, L.K.A.M.; MACEDO, D.; VASCONCELOS, S.M.M. Antidepressant, antioxidant and

neurotrophic properties of the standardized extract of *Cocos nucifera* husk fiber in mice. **Journal of Natural Medicine**. v. 70, p. 510-521, 2016.

LIOCHEV, SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biol. Med.** v. 60, p. 1- 4, 2013.

LIU, A.H.; LIN, Y.H.; YANG, M.; GUO, H.; GUAN, S.H.; SUN, J.H.; GUO, D.A. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 32-41, 2007.

LOIOLA, C.M. **Comportamento de cultivares de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em diferentes condições agroecológicas dos tabuleiros costeiros do Nordeste brasileiro**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

MACHLIN, L.J. Introduction. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, v. 669, n.4, p.1-6, 1992.

MAKKAR, H.P.S. **Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual**. Vienna: FAO/IAEA Working Document. IAEA, 2000.

MAIA CAMPOS PMBM. Desenvolvimento de produtos cosméticos. **Cosmetics and Toiletries**. v. 14, p. 56-59, 2002.

MARTINS, C.R.; JESUS JÚNIOR, L.A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2011**. Aracaju: 2011. 30 p. Embrapa Tabuleiros o futuro das organizações. São Paulo, Atlas, 2011.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**, 4<sup>a</sup> ed. Geord Godwin, London, 1985.

MATSUBARA, Y. et al. Oral Administration of the Japanese Traditional Medicine Keishibukuryogan-ka-yokuinin Decreases Reactive Oxygen Metabolites in Rat Plasma: Identification of Chemical Constituents Contributing to Antioxidant Activity. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 256, 2017.

MENDONÇA-FILHO, R.R.; RODRIGUES, I.A.; ALVIANO, D.A.; SANTOS, A.L.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S.; ROSA, M.S.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in Microbiology**, v.155, p. 136-143, 2004.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITAO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE. C.S.; LEITAO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n.2, p. 127-130, 2001.

MIGUEL, L. M. **A biodiversidade na indústria de cosméticos: contexto internacional e mercado brasileiro**. 2012. 259 p. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MIRON et al. HPLC-DAD for the determination of three different classes of antifungals: method characterization, statistical approach, and application to a permeation study. **Biomed. Chromatogr.** V. 28, p. 1728-1737, 2014.

NEVES, L.C., ALENCAR, S.M., CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis melífera*. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 2, n.15, 2009.

NISHIYAMA, M.F.; COSTA, M.A.F.; DA COSTA, A.M.; DE SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G.; BRACHT, C.K.; PERALTA, R.M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30. supl. 1, p. 191-196, 2010.

OLIVEIRA, F.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. 2007. 205 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

OLIVEIRA, M.B.S. **Avaliação da capacidade antioxidante e perfil químico de extratos etanólicos da fibra da casca de coco (*Cocos nucifera* L. (PALMAE))**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

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

ORIÁ, R.B., FERREIRA, F.V.A., SANTANA, E.N., FERNANDES, M.R., BRITO, G.A.C. Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. **An Bras. Dermatol**. v. 78, n. 4, p. 425-434, 2003.

PARENTE, M.E.; ANDRADE, A.O.; ARES, G.; RUSSO, F.; JIMÉNEZ-KAIRUZ, A. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. **Internation Journal of Cosmetic Science**. v. 37, p. 511-518, 2015.

PASCUAL, C.; GONZALEZA, A.R.; TORRICELLA, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 41, p. 9-13, 1994.

PESCHEL, W.; POLITI, M. H.; **NMR and HPLC/DAD for *Cannabis sativa* L. chemotype distinction, extract profiling and specification**, v.140, p. 150-165, 2015.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINNELL, S. R. Vitamina C tópica. **Revista de Cosmiatria e Medicina Estética**, v. 3, n. 4, p. 31, 1995.

PINTO, N.; VIANA, G.S.B; Leal, L.K.A.M.; NEVES, K.R.T.; VIANA, D.U.; PEIXOTO, J.D.; ALENCAR, G.S.C.; ALEXANDRE, B.S.; LUCETTI D.L.; LUCETTI, E.C.P.; MARTIN, A.L.A.R. Neuroprotective properties of the standardized extract from *Camellia sinensis* (green tea) and its main bioactive components, epigallocatechin gallate and epicatechin, in the 6-ohda model of parkinson. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p. 1-12, 2015.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, v. 2, 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

RABE, J.H.; ADAM, J.M.; PATRICK, J.S.; ELGUNN; WARWICK, L.M.; DANIEL, N.S. Photoaging: Mechanisms and repair. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1-19, 2006.

RATZ-LYKO, A., ARCT, J. & PYTKOWSKA, K. Methods for evaluation of cosmetic antioxidant capacity. **Skin Research and Technology**, v.18, n.4, p.421-430. 2012.

RIBEIRO, F.E.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L.J.; BRONDANI, C.; ZUCCHI, M. E.; VENCOSKY, R. Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 696-702, 2010.

ROCHA, F.B.A.; CAMPOS, M.C.; COLOMBO, C.R.; CELESTINO, J.E.M. **Gestão de resíduos como ferramenta aplicada ao beneficiamento do coco verde** – São Paulo: XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 2010.

RODRIGUES, S.; PINTO G.A.S.; FERNANDES, F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolics compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Fortaleza. v. 15, p. 95-100, 2008.

ROSA, M.F.; SANTOS, F.J.S.; MONTENEGRO, A.A.T.; ABREU, F.A.P.; CORREIA, D.; ARAUJO, F.B.S; NORÕES, E.R.V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, n.54, p. 1-6, 2001.

SANFELICE, A. M.; TRUITI, M. D. C. T. Produtos em filme - Inovação na tecnologia de cosméticos. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2010.

SANTANA, I. A. **Avaliação química e funcional de polpa de coco verde e aplicação em gelado comestível**. 2012. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012.

SCHALKA, S.; BECHELLI, L.; BOMBARDA, P.C.M; ABREU, F.F. A new proposal for the evaluation of an antioxidant cosmeceutical in the treatment of the skin affected by the effects of urban life. **Surg. Cosmet. Dermatol.** v. 8, n. 1, p. 46 -54, 2016.

SCHUELLER R.; Romanowski P. **Iniciação à química cosmética**. São Paulo: Tecnopress; 2002. v.1, p. 23-9.

SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção**. 1. ed. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SENNA, E.L.; PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V.L. Preparation and characterization of Spray dried powders from *Achyrocline satureoides* (Lam) DC extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 123-127, 1997.

SHABIR, G. A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation

requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v 987. p. 57–66, 2003.

SIES, H. Polyphenols and health: update and perspectives. **Arch. Biochem. Biophys.** v, 501, p. 2- 5, 2010.

SILVA, L.C.R. **Efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* Linn (Palmae) sobre a resposta inflamatória e sobre a resposta imunológica *in vivo***. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

SILVA, R.R.; SILVA, D.O.; FONTES, H.R.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D.; ALVIANO, D.S. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 107, 2013

SILVA, T.S.J. **Desenvolvimento e otimização do extrato padronizado de *Spondias mombin* (cajazeira): atividades anti-inflamatória e anti-herpes do extrato e da geraniina**. 2016. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SIMMONS JV. **Cosméticos: formulación, preparación y aplicación**. Madri: A. Madrid Vicente; p. 214 – 230, 2000.

SIMON, M. La dermatite atopique, estelle toujours associée à une altération de la barrière épidermique? **Revue Française d'Allergologie**, v. 53, p. 125, 2013.

SINGLA, R.K.; JAISWAL, N.; BHAT, G.V.; JAGANI, H. Antioxidant & antimicrobial activities of *Cocos nucifera* Linn. (Arecaceae) endocarp extracts. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 354-361, 2011.

SINGLETON, V.L; ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152–178, 1999.

SKORKOWSKA-TElichowska, K.; CZEMPLIK, M.; KULMA, A.; SZOPA, J. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 68, e117–e126, 2013.

SOUSA, C.M.M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; da COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e *leito de jorro***. 2003. 180 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; PILLAI, K. R.; KUMAR, P. R.; SUDHAKARAN, P. R.; MENON, V. P. Influence of ferulic acid on  $\gamma$ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 228, p. 249, 2006.

STANOJEVIĆ, L.; STANKOVIĆ, M.; NIKOLIĆ, V.; NIKOLIĆ, L.; RISTIĆ, D.; ČANADANOVIC-BRUNET, J.; TUMBAS, V. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of Hieracium pilosella L. Extracts. **Sensors**. v. 9, p. 5702-5714, 2009.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBÁN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. **J. Agri. Food Chem.** v. 54, p. 607-616, 2006.

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-Induced skin damage. **A review. Biomed. Pap.** v. 147, p. 137–145, 2003.

TAN, T.; CHENG, L.; BHAT, R.; RUSUL, G.; EASA, A.M. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. **Food Chemistry**. v. 142, p. 121-128, 2014.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. analytical method validation and quality assurance. **Trends in analytical chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TOFETTI, M.; OLIVEIRA, V. A importância do uso do filtro solar na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele. **Investigação – Revista Científica da Universidade de Franca**, v. 6, n. 1, p. 59–66, 2010.

TOIDA H, SHINYARKU H, ISHIZAKA T, KOISHI M. Determination of contact angles of polar liquids against fatty acid modified- PVA films. **Cosmetics and Toiletries**. v. 93, p. 32-40, 1978.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano. Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. ArtMed, 10 ed. 2017.

TSOURELI-NIKITA, E.; WATSON, R.E.; GRIFFITHS, C.E. Photoageing: the darker side of the sun. **Photochemistry and Photobiology Sciences**. v. 5, n. 2, p. 160- 164, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v, 39, p. 44 – 84, 2007.

VUNDAC. V.B., BRANTNER, A.H.; PLAZIBAT, M. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. **Food Chemistry**. v. 104, p. 1277-1281, 2007.

YOKOZAWA, T.; CHO, F.J.; HARA, Y.; KITANI, K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, n.10, p. 5068- 5073, 2000.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p.115-121, 2000.

WILKINSON JB, MOORE RJ. **Cosmetologia de Harry**. Madrid: Diaz de Santos. p.10 - 11, 1990.

WITTENAUER, J.; MACKLE, S.; SUSSMANN, D.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; CARLE, R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. **Fitoterapia**. v. 101, p. 179–187, 2015.

ZAGUE, V. et al. Clay facial masks: physicochemical stability at different storage temperatures. **International journal of cosmetic science**, v. 29, n. 6, p. 488–489, 2007.

ZANON, A. B. **Aspecto Teórico e prático sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia**. 2010. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ZHANG, J.L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H.L.; GUO, D. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 1029–1035, 2005.

ZIMMER, A. R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; Schapoval, E.; OLIVEIRA, J.R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Capsicum baccatum: from traditional use to scientific approach. **J Ethnopharmacol**, v.139, n. 1, p. 228-233, 2012.

ZOUBOULIS, C.C.; MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in dermatology**. v. 29, n. 1, p. 3 – 14, 2011.

ZOUMPANIOTI, M.; MERIANOU, E.; KARANDREAS, T.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Esterification of phenolic acids catalyzed by lipases immobilized in organogels. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1457, 2010.

ZU, Y.; LI, C.; FU, Y.; ZHAO, C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.3, p.714-719, 2006.

ZUCCO, A.; SOUSA, F. S.; ROMEIRO, M.C. Cosméticos Naturais: uma opção de inovação sustentável nas empresas. **Encontro Internacional Sobre Gestão Empresarial e o Meio Ambiente – ENGEMA**, São Paulo, 2014.

ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v. 57, n.2, p. 307-316, 2002.