



Gel antiacne com frutos amazônicos

Aryane Maia de Castro ¹, Marcia de Jesus Amazonas da Silva², Emerson Silva Lima³,
Fernanda Guilhon-Simplicio⁴

Resumo

O uso de produtos naturais em cosméticos vem se expandindo devido à importância medicinal, econômica e de agregação de valor e maior segurança. O objetivo deste estudo foi analisar o extrato de frutas e os resíduos amazônicos como ingredientes potenciais para um dermocosmético antiacne. A extração de Soxhlet foi realizada com hexano e etanol e a desreplicação dos extratos foi realizada por testes químicos, análises cromatográficas e espectrométricas. Os extratos foram avaliados quanto à citotoxicidade, atividade anti-inflamatória *in vitro* e atividade antibacteriana contra *P. acnes*. Os extratos mais promissores foram misturados e incorporados em duas formulações farmacopéicas de gel, compostas de carboximetilcelulose e carbopol, as quais foram avaliadas quanto à estabilidade de acordo com os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e reavaliadas quanto ao potencial antibacteriano após exposição a diferentes temperaturas. Foi possível detectar metilxantinas, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos nos extratos. De maneira geral, os extratos apresentaram baixa citotoxicidade e boa atividade anti-inflamatória e antioxidante, diferindo mais na atividade antibacteriana, onde dois extratos etanólicos G1E e TC3E foram os mais ativos e selecionados para compor as formulações em gel. A formulação à base de carboximetilcelulose foi descartada no início dos testes de estabilidade. Por outro lado, a formulação de carbopol não apenas manteve suas características físico-químicas, mas também suas propriedades antibacterianas, mesmo após exposição a condições extremas de armazenamento. Assim, foi demonstrado que as espécies amazônicas estudadas, incluindo seus resíduos, têm potencial para se tornarem ingredientes ativos de produtos antiacne, tornando interessante a continuidade deste estudo.

Palavras-Chave: *P. acnes*, antiacne, inflamação, gel.

Antiacne gel producing with fruits from the Amazon. The use of natural products in cosmetics has been expanding due to the medicinal, economic and value-adding importance, and increased safety. The aim of this study was to analyze the fruit extract and Amazonian residues as potential ingredients for an antiacne dermocosmetic. Soxhlet extraction was performed with hexane and ethanol, and the dereplication of the extracts was performed by chemical tests, chromatographic and spectrometric analyzes. The extracts were evaluated for cytotoxicity, anti-inflammatory *in vitro* and antibacterial activity against *P. acnes*. In the end, the most promising extracts were mixed and incorporated into two pharmacopoeic gel formulations, composed by carboxymethylcellulose and Carbopol, which were evaluated for stability according to the criteria of the National Health Surveillance Agency and reassessed for antibacterial potential after exposure to different temperatures. It was possible to detect methylxanthines, phenolic acids, flavanoids and tannins in the extracts. In general, the

¹ Acadêmica Farmácia, FCF, UFAM, Manaus, Amazonas, Brasil aryane@ufam.edu.br

² Doutoranda Inovação Farmacêutica, FCF, UFAM, Manaus, Amazonas, Brasil marciajas24@gmail.com

³ Prof FCF, UFAM, Manaus, Amazonas, Brasil eslima@ufam.edu.br

⁴ Profa FCF, UFAM, Manaus, Amazonas, Brasil guilhon_simplicio@ufam.edu.br

Ciências da Saúde

extracts showed low cytotoxicity and good anti-inflammatory and antioxidant activity, differing more in antibacterial activity, where two ethanolic extracts G1E and TC3E were the most active and selected to compose the gel formulations. The carboxymethylcellulose-based formulation was discarded early in the stability tests. On the other hand, carbopol formulation not only retained its physicochemical characteristics but also its antibacterial properties even after exposure to extreme storage conditions. Thus, it was demonstrated that the studied Amazonian species, including their residues, have the potential to become active ingredients of antiacne products, making the continuity of this study interesting.

Keywords: *P. acnes*, antiacne, inflammation, gel.

1. Introdução

A acne é considerada uma doença crônica e não apenas uma afecção limitada à adolescência, embora seja bastante comum nessa fase da vida (MONTAGNER; COSTA, 2010). De 85 a 100 % dos indivíduos são afetados por acne em algum momento da sua adolescência (FIGUEIREDO, 2011). Ela afeta indivíduos de ambos os sexos, sendo geralmente mais grave nos homens e mais persistente nas mulheres. A incidência da doença é de cerca de 80 % na faixa etária de 12 a 25 anos, caindo para 8 % na faixa etária de 25 a 34 anos, e para 3 % na faixa de 35 a 44 anos (VAZ, 2003). É uma doença menos frequente em orientais e negros, mas pode ocorrer em todas as raças (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT., 2008).

A patogênese da acne vulgar é multifatorial e envolve processos inflamatórios, infecções bacterianas, distúrbios hormonais e de queratinização da pele em uma combinação ainda não totalmente conhecida. Contudo, sabe-se que *Propionibacterium acnes*, uma bactéria anaeróbia gram-positiva presente na flora normal da pele, está diretamente relacionada à resposta inflamatória da doença, por produzir muitos mediadores pró-inflamatórios extracelulares ao colonizar folículos pilosos previamente sensibilizados por hormônios andrógenos produzidos no período pré-puberal (KIM et al., 2002; LORCA, 2007).

As lesões da acne podem ser classificadas como não inflamatórias e inflamatórias. No segundo caso, essas lesões podem resultar em cicatrizes permanentes, agregando fatores emocionais à doença, devido ao abalo da autoestima ocasionado por essas cicatrizes (FABBROCINI et al. 2010). Quase sempre a acne tem seu desenvolvimento na face, que por sua vez é a área mais visível e a mais utilizada para a comunicação, aumentando assim a revolta e estranheza que o adolescente tem sobre as mudanças no seu corpo. Estudos mostram que 70% dos adolescentes com acne afirmam serem vítimas da rejeição no convívio social (FIGUEIREDO, 2011).

Desse modo, a acne vulgar é a doença crônica que mais leva pacientes aos consultórios dermatológicos (KIM; ARMSTRONG, 2011), tendo reflexos psicossociais, graças às alterações que promove na aparência física do indivíduo, de forma que tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças como a depressão e aumento de taxas de suicídio, principalmente entre mulheres (KOKANDI, 2010).

A acne é classificada clinicamente em quatro níveis: grau I, a forma mais leve de acne, não inflamatória ou comedoniana, caracterizada pela presença de comedões (cravos) fechados e comedões abertos; grau II, acne inflamatória ou pápulo-pustulosa, onde, aos comedões, se associam as pápulas (lesões sólidas) e pústulas (lesões

Ciências da Saúde

líquidas de conteúdo purulento); grau III, acne nódulo-abscedante, quando se somam os nódulos (lesões sólidas mais exuberantes); e grau IV, acne conglobata, na qual há formação de abscessos e fístulas (SAMPAIO, 2006).

A doença pode ser controlada com tratamento tópico e sistêmico associados aos recursos físicos como extração de comedões e drenagem de cistos, luz ultravioleta, crioterapia, infiltração intralesional, dermo-abrasão cirúrgica ou esfoliação química. Geralmente os graus I e II podem ser tratados apenas com preparações tópicas. Os graus III e IV necessitam de terapêutica tópica e sistêmica. Entre os tratamentos tópicos inclui-se o uso de sabonetes sulfurosos, ou com ácido salicílico, peróxido de benzoíla ou irgasan; géis, loções ou cremes contendo peróxido de benzoíla, ácido retinóico (tretinoína), ácido salicílico, e outros queranolíticos como o enxofre precipitado, além de risorcina e antibióticos tópicos. Como tratamentos sistêmicos tem-se antibióticos orais, como a tetraciclina, minociclina, eritromicina e sulfas, retinóides orais (isotertionoína) e vitamina A (CUCÉ; NETO 2015).

Entretanto, os tratamentos mais eficazes, uso de antimicrobianos e retinoides, são acompanhados de uma série de efeitos indesejados. Uso antimicrobianos de forma tópica pode causar irritações, descamação, ressecamento, prurido, eritema e queima. Além disso, o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana sempre deve ser considerado na utilização de antimicrobianos orais (KIM; ARMSTRONG, 2011). Por sua vez, o uso derivado do ácido retinóico por via oral pode causar secura e fragilização da pele, pancreatite, mialgias e dor óssea, além de serem teratogênicos. Além disso, são tratamentos longos que requerem constante acompanhamento médico, que podem ser um fator de

desistência por parte dos pacientes (BRITO et al., 2010).

Dessa forma, apesar dos tratamentos existentes serem considerados eficazes, é importante que haja pesquisas que busquem melhorar os esquemas terapêuticos, tornando os tratamentos mais acessíveis e seguros, onde pesquisas com plantas sempre ganham destaque. Ademais, é consensual que a exploração sustentável dos recursos naturais da Amazônia Brasileira é um ponto crítico para o desenvolvimento econômico do país, especialmente dos Estados que contém porções significativas dessa biodiversidade, como o Amazonas (RIBAS; SMITH, 2009). Nesse sentido, o desenvolvimento de dermocosméticos locais que agreguem valor aos insumos vegetais da Amazônia são estratégicas para esse desenvolvimento econômico, uma vez que podem ser obtidos e certificados em um tempo muito mais curto e a custos muito menores que fitoterápicos e fitomedicamentos (ARRUDA, 2008). Assim, nesta pesquisa buscou-se desenvolver um protótipo de dermocosmético contra acne, utilizando matérias-primas amazônicas que apresentassem atividade contra *P. acnes* e anti-inflamatória.

2. Material e Método

2.1 Obtenção e preparação do material botânico

As matérias primas foram compradas na Feira Manaus Moderna, localizada no Centro da cidade de Manaus, Amazonas e guardadas sob refrigeração a 5°C até a secagem para evitar hidrólise enzimática das moléculas, pausando os processos metabólicos das células e para evitar a contaminação e proliferação microbológica. Para que ocorresse uma estabilização permanente das amostras, elas foram colocadas em estufa de circulação de à 45°C ± 2°C por 2 dias para a secagem e depois foram processadas e guardadas em

Ciências da Saúde

temperatura ambiente e ao abrigo de luz e calor. Neste estudo foram utilizadas 3 drogas vegetais codificadas como G1, TP2 e TC3 entre elas um resíduo de processamento para fins alimentícios.

2.2 Preparação e secagem dos extratos

Para todas as amostras utilizou-se a massa de 138,6909 g e 600 mL de solventes para cada extração que foi feita de dois modos: com desengorduramento prévio com hexano (H) seguido de extração com etanol 99,5% (E), e extração direta com etanol 96% (OH) para comparação. Todos os extratos foram obtidos por Soxhlet, e o ponto final da extração foi determinado visualmente, por observação da descoloração do solvente no sistema. Os extratos então foram filtrados e concentrados em rotaevaporador (IKA® HB10 basic).

Os extratos concentrados foram recolhidos em frascos previamente pesados e identificados, e colocados em capela de exaustão para eliminação do solvente residual. Ao final, os foram envoltos por papel alumínio e guardados em refrigerador na temperatura de 10°C até a utilização.

2.3 Desrepliação dos extratos

2.3.1 Prospecção de alcaloides

A literatura técnico-científica cita a grande quantidade de alcaloides na família de G1, então resolveu-se fazer a prospecção de alcaloides de acordo com Simões et. al (2017). Para isso foi utilizado 5g da droga G1 e 50 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1% e posto para decocção 2 por minutos e depois filtrado. O decocto foi resfriado e dividido em duas porções: A, para teste direto e B, teste confirmatório. Para o teste direto foi transferido cerca de 2 mL do filtrado para cada tubo de ensaio (total de quatro) e gotejou-se cuidadosamente os reagentes gerais de para identificação de alcaloides (Dragendorff, Mayer, Bertrand e Hager).

Para teste confirmatório alcalinizou-se a porção B com hidróxido de amônio até pH 8-9 verificado com fita de pH, neste momento foi observado mudança da cor do extrato e certa precipitação. Esse extrato alcalinizado foi transferido para um funil de separação e acrescentou-se 10 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). Agitou-se cuidadosamente e abrindo a torneira para que ocorresse a saída dos gases. Recolhida a fase orgânica em um béquer, esperou-se a evaporação completa do solvente, após isso acrescentou-se 15 mL de H₂SO₄ 1% e foi agitado. Ocorreu-se a distribuição de 2 mL da solução para cada tubo de ensaio e repetiu-se os testes.

2.3.2. Cromatografia em camada delgada

Procedeu-se a uma análise por cromatografia em camada delgada (CCD) com o padrão de cafeína, um dos principais alcaloides encontrados na família de G1. Para isso, foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel com indicador de fluorescência (254 nm) e a fase móvel diclorometano: ácido acético (12:1 v/v).

2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a identificação de ácido caféico e o estabelecimento do perfil químico de TP2 e TC3, foi utilizado o Cromatógrafo Líquido Shimadzu modelo Lc-20AT prominence; desgasificador DGU-20AS, injetor automático de amostras SIL-20A HT, comunicador de módulos CBM-20^o, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software LCsolutions. Empregou-se uma coluna Luna 5u C18(2) 100 A 250x4,6 mm (Phenomenex), e acetonitrila (B) e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) como fase móvel, a 0,8 mL/min em corrida de 25 minutos, no seguinte gradiente: de 60 a 100 % de B em 10 minutos, mantendo por 2 minutos; de 100 a 60 % de B em oito minutos, mantendo por mais 5 minutos e encerrando a

Ciências da Saúde

corrida (Sistema S1). A corrida foi monitorada a 254 nm e, nessas condições, o ácido caféico apresentou tempo de retenção de 3,16 minutos.

Para identificação da cafeína e o estabelecimento do perfil químico de G1, foi utilizado o mesmo Cromatógrafo Líquido, com o acréscimo de um detector de fluorescência RF – 10AxL e um forno de coluna CTO – 10 ASVP à 40°C. Empregou-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus 5u C18(2) 100 A 250x4,6 mm (Agilent), e metanol (B) e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) como fase móvel, a 1,0 mL/min em corrida de 20 minutos, no seguinte gradiente: de 5 a 30 % de B em 5 minutos, mantendo por 10 minutos; de 30 a 5 % de B em 2 minutos, mantendo por mais 3 minutos e encerrando a corrida (Sistema S2). A corrida foi monitorada a 272 nm e, nessas condições, a cafeína apresentou tempo de retenção de 13,59 minutos.

2.3.4. Espectrometria de Massas por eletrospray (ESI/EM)

A espectrometria de massas (EM) para a identificação as principais substâncias contidas nos extratos (COLLINS et al., 2006) foi realizada em Espectrômetro de Massas Quattro LC-MICROMASS®, triplo-quadrupolo, com fonte de ionização por eletrospray (ESI), modo negativo [M-H]⁻, na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas, onde 10 mg de cada extrato foi solubilizado em metanol grau HPLC e cada solução foi injetada de forma direta. Usando a fonte de ionização química à pressão atmosférica (IQPA), fonte de tensão de 4,00 kV, tensão no capilar 35,00 V, a tensão da lente do tubo 85,00 V, temperatura capilar de 240 °C, O fluxo de gás na bainha (He) 35 e o fluxo de gás auxiliar (N₂) 10 (unidades arbitrárias). Espectros MS foram adquiridos pela aquisição completa em gama 100-1000 m/z. A aquisição de

dados foi realizada com o software Xcalibur 2.07®.

2.4 Viabilidade celular/ citotoxicidade

O ensaio do Alamar Blue® foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed et al. (1994), em microplaca de 96 poços, utilizando as linhagens não-tumorais (MRC-5) disponíveis no Banco de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM. As células foram transferidas para microplacas de 96 poços na densidade 0,5 x 10⁴ células por poço, e permaneceram em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as células receberam o tratamento com as substâncias na concentração de 50 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) (0,1%), e como controle positivo a Doxorrubicina na concentração de 5,0 µM. Por 72 horas foi realizado o período de tratamento, com a placa mantida em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período foi adicionado 10 µL do Alamar blue (0,02%), posteriormente sendo feita a leitura das placas em leitor de microplaca, nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm. Inicialmente os compostos foram testados na concentração única de 50 µg/mL e posteriormente abrindo a curva para os extratos escolhidos para a formulação nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,6 µg/mL. Para expressar o número de células viáveis, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{(\text{ABS das Células das Amostras} - \text{ABS do Branco})}{(\text{ABS de Células Controle Positivo} - \text{ABS do Branco})} \times 100$$

2.5 Atividade anti-inflamatória in vitro

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram plaqueados na densidade 1 x 10⁶ células/mL em placas de 6 poços seguindo-se adesão por 24 h a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após

Ciências da Saúde

aderência, o meio foi retirado e adicionado meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB com volume de 1000 μ L/poço. As células serão estimuladas pela adição de lipopolissacarídeo - LPS (concentração final 1 μ g/mL) e tratadas juntamente com os compostos na concentração única de 50 μ g/mL e posteriormente abrindo a curva para os extratos escolhidos para a formulação nas concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 e 1,6 μ g/mL. Para o experimento controle as células foram cultivadas apenas com meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂, sendo coletado o sobrenadante celular e alíquotas foram congeladas (-20 °C) para posterior análise das citocinas. Para a determinação da produção de NO•, 100 μ L do sobrenadante celular foi submetido a reação com igual volume do reagente de Griess. Após o período de incubação de 10 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de NaNO₃ (VERMA et al., 2012).

2.6 Atividade antibacteriana (*P. acnes*)

A cepa de *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), adquirida da Fundação André Toledo (FAT), foi reativada em caldo tioglicolado e posteriormente estriado em placa de Agar BHI 5% sangue suplementado com 1% glicose sob ambiente de anaerobiose incubando-se a 37°C por 48 horas (Figura 1). Após a ativação, foram realizados ensaios quali e quantitativos em microplaca de 96 poços, de acordo com COS et al. (2006). Após realizado o teste, foi adicionado 10 μ L do Alamar blue® (0,0 2%), posteriormente sendo feito a leitura das placas em leitor de microplaca, nos comprimentos de onda

de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm, para a determinação da viabilidade celular das bactérias frente as diferentes concentrações dos extratos.

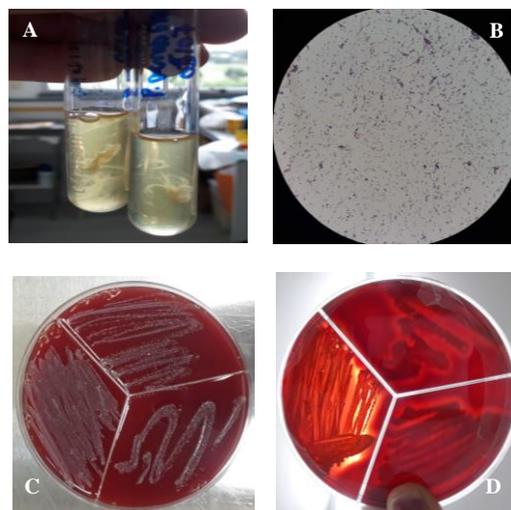


Figura 1. Ativação de *P. acnes* para os testes de atividade antibacteriana. A: cepa *P. acnes* (ATCC 6919) em caldo tioglicolato; B: microscopia da amostra e verificação de bacilos gram-positivos; C: isolamento da bactéria por esgotamento em Ágar BHI 5% sangue suplementado com 1% glicose; D: observação de hemólise característica da cepa nesse meio.

2.7 Preparação do gel antiacne

2.7.1 Produção das formulações

A base de gel contendo o extrato mais ativo foi manipulada de acordo com formulações farmacopeicas (BRASIL, 2012). Para isso foram utilizadas duas bases com polímeros diferentes, carboximetilcelulose (CMC) e carbopol (CARBOMER) e os melhores extratos de acordo com atividade antibacteriana e anti-inflamatória.

2.7.2 Teste de estabilidade acelerada

As formulações foram submetidas inicialmente a centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos, preconizada pelo Guia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004), o que garantiu a estabilidade inicial e pode-se

Ciências da Saúde

proceder para a estabilidade acelerada por 12 dias, onde uma amostra de cada formulação foi armazenada à temperatura ambiente, estufa à 50°C, e no congelador à -4 °C. Outra amostra ficou em um ciclo de estufa e congelador, onde passava 24 h em cada ambiente durante o mesmo período.

2.7.2.1 Avaliação das propriedades químico-farmacológicas

Realizou-se a leitura do pH das formulações a cada 6 dias, ocorrendo a leitura no dia 1, 6 e 12 e no último dia avaliou-se a atividade antibacteriana. A atividade antimicrobiana da formulação mais estável foi realizada pela técnica de difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008). O cultivo do micro-organismo teste foi preparado em Ágar Müller-Hinton, em placa de Petri. Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular de concentração semelhante à escala de McFarland 0,5. De cada formulação foram transferidos 100 µg/mL para poços de 5 mm de diâmetro, incluindo o controle doxíciclina (50 µg/mL). Os cultivos foram incubados a 37°C por 24 h em ambiente anaeróbico. Os halos de inibição foram medidos no verso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

2.8 Análise estatística

Os dados serão apresentados como média ± erro padrão da média e/ou CI₅₀ e seus intervalos de confiança de 95 % (CI 95%) obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais serão comparadas através da análise de variância (ANOVA) *one-way*. Todas as análises estatísticas serão realizadas usando o programa GraphPad Prism 6®.

3. Resultados e Discussão

A extração por soxhlet é conhecida como uma extração por

esgotamento, onde a amostra entrará em contato com o solvente continuamente, solvente este que vindo por evaporação do balão de fundo chato irá se condensar na parte superior do aparelho onde se encontra o condensador, onde passa água refrigerada, e acabará precipitando em gotas sob a droga vegetal e ocorrerá a dispersão das substâncias de mesma ou aproximada polaridade presentes na droga vegetal. Esse sistema de extração ocorre em ciclos até a solubilização total das moléculas com afinidade ao líquido extrator, normalmente caracterizado pela falta de cor do extrato. O cálculo de rendimento de cada extrato foi obtido através da proporção entre massa da amostra e a massa do extrato bruto (Tabela 1).

A cafeína, um alcaloide para alguns autores e uma metilxantina (pseudoalcaloide) para outros, consta como um dos marcadores químicos de umas espécies selecionadas para este estudo (G1). Alcaloides são substâncias nitrogenadas de caráter básico e possui ampla ação farmacológica. Esses compostos são encontrados predominantemente na forma combinada com ácidos orgânicos e em concentração menor na forma livre. Nesta forma, são insolúveis em água e em solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, benzeno e éter; na forma de sal a sua solubilidade é inversa. Alcaloides podem ser detectados por meio dos reativos gerais de alcaloides (RGA), com os quais formam turvação ou precipitação em meio ácido. Em todos os testes realizados houve a formação de precipitado ou turvação dos extratos. Por sua vez, a CCD confirmou a presença de cafeína (Fator de retenção 0,31) nos extratos hexânico e etanólico de G1.

Tabela 1. Rendimento dos extratos.

Extrato	Massa para extração	Massa do extrato	Rendimento (%)
G1H*	138,6909 g	1,9 g	1,3699
G1E**	138,6909 g	9,6266 g	7,0852
G1OH	138,6909 g	43,2635 g	31,1941
TP2H	138,6909 g	67,5645 g	48,7158
TP2E	138,6909 g	31,6437 g	22,8159
TC3H	138,6909 g	31,3083 g	22,5741
TC3E	138,6909 g	5,4683 g	3,9427

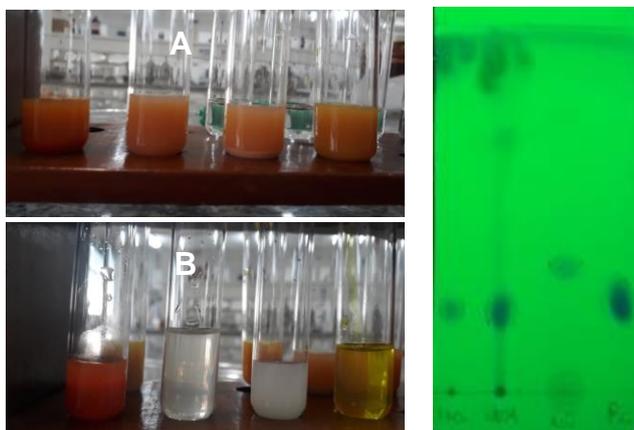


Figura 2. Investigação de alcaloides e cafeína nos extratos de G1. Precipitados formados no teste direto (A) e confirmatório (B) para alcaloides com os reagentes Dragendorff, Mayer, Bertrand e Hager, respectivamente. CCD com G1H, G1E, G1água e cafeína (respectivamente). Fase móvel: diclorometano:ácido acético (12:1 v/v).

Para obter-se um perfil químico mais robusto, empregou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A cromatografia é uma técnica analítica que visa principalmente a separação de misturas, mas ainda pode ser utilizada para purificação e quando acoplados com detectores de massas ou UV/Vis pode-se obter informações acerca da identidade da molécula, como o peso ou absorvância de certas moléculas ou seus grupos funcionais. O método baseia-se nas diferentes propriedades

das substâncias presentes na mistura que irá interagir com duas fases imiscíveis, a fase estacionária que é onde a substância em questão fixa-se em sua superfície, que então deve possuir o mínimo de interação com o analito e a fase móvel, que precisa ter a mesma propriedade e as substâncias que possuem maior afinidade a fase móvel irão ser arrastadas e as que possuem mais afinidade com a fase estacionária ficarão retidas na coluna, ou seja, a velocidade com que uma migra será maior e de outra, será menor.

Esse é o método geral para análises em cromatografia líquida, mas como o tamanho da fase estacionária é reduzido é possível realizar a detecção de substâncias presentes em baixas concentrações e uma separação mais efetiva. O empacotamento das colunas utilizadas em High performance liquid chromatography (HPLC) estão na faixa de μm (micrometros) o que dificulta a passagem do solvente pela coluna cromatográfica, então utiliza-se da pressão para forçar a passagem do mesmo, por isso a técnica é conhecida por alta performance ou alta eficiência, já que também diminui e melhora o tempo de análise. Os cromatogramas obtidos nas análises dos extratos são mostrados na figura 3.

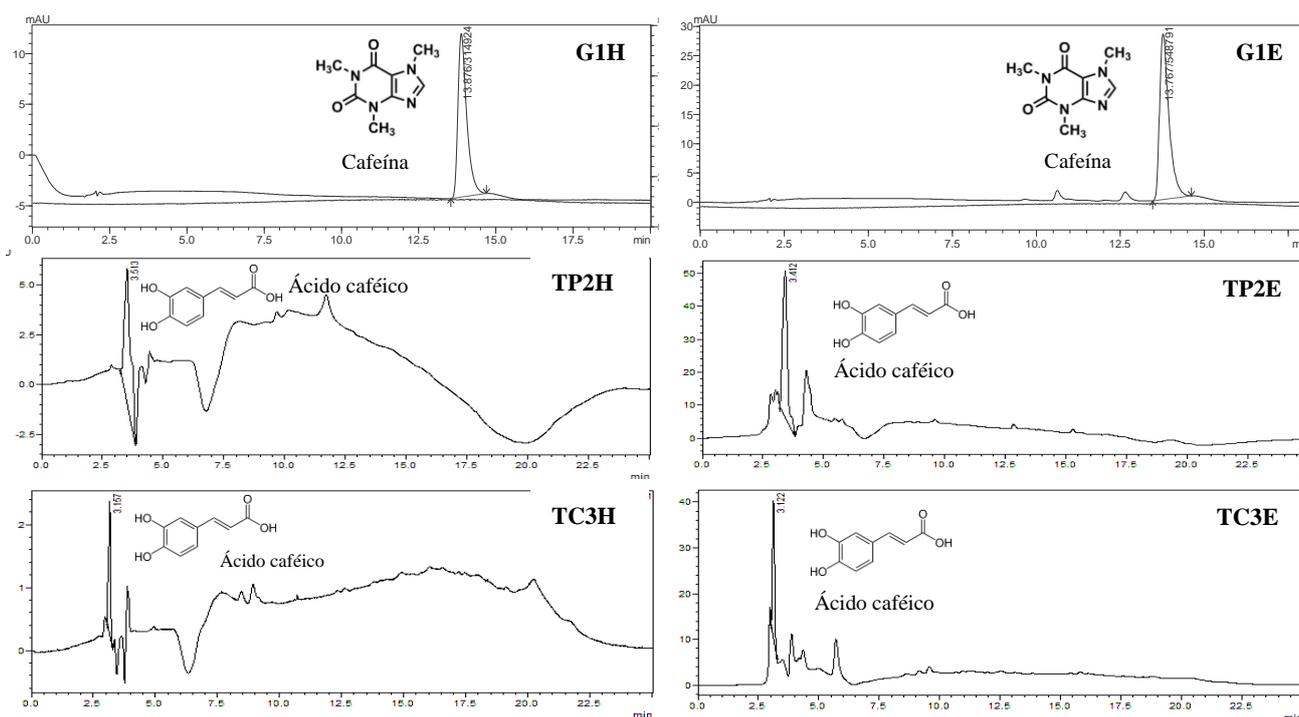


Figura 3. Cromatogramas dos extratos destacando os picos majoritários e as substâncias identificadas.

Considerando que o método empregado para a identificação de substâncias é um método geral utilizado no Laboratório de Fitoquímica e Semissíntese da UFAM para diversas substâncias, foi possível também identificar catequina, epicatequina, teobromina e teofilina nos extratos de G1, além de rutina, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido oleico e kaempferol nos extratos de TP2 e TC3. Contudo, cafeína e ácido caféico foram os picos majoritários e, por esse motivo,

quantificados nos respectivos extratos. Para cada um desses compostos majoritários, realizou-se a preparação de curvas de quantificação com os mesmos sistemas indicados no item 2.3.3. da metodologia, observadas na figura 4. A partir disso, foi feita a quantificação de cada substância em cada extrato a partir da descoberta da equação da reta ($y = 2974x - 104235$; cafeína; $y = 52133x - 35788$; ácido caféico) dos compostos (tabela 2).

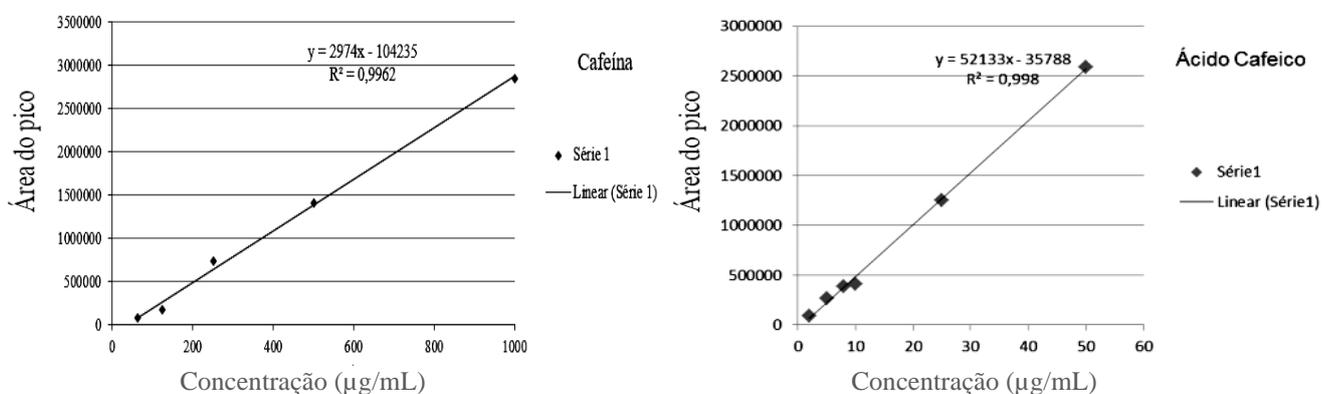


Figura 4. Curva de quantificação do ácido caféico e da cafeína construídas pelos sistemas S1 e S2, respectivamente.

Tabela 2. Quantificação de cafeína e ácido cafeico por CLAE nos diferentes extratos.

Extrato	µg/mL	mg/mL	g/mL	g/100 mL	%
G1H (cafeína)	140,941	0,140941	0,000140941	0,0141941	1,42
G1E (cafeína)	188,034	0,188034	0,000188034	0,0188034	1,89
TP2H (ác. cafeico)	2,961	0,002961	0,000002961	0,0002961	0,03
TP2E (ác. cafeico)	12,169	0,012169	0,000012169	0,0012169	0,122
TC3H (ác. cafeico)	0,901	0,000901	0,000000901	0,0000901	0,009
TC3E (ác. cafeico)	4,851	0,004851	0,000004851	0,0004851	0,05

Considerando que CLAE é uma técnica limitada à disponibilidade de padrões, empregou-se a espectrometria de massas por ionização por *eletrospray* em modo negativo, que permite a identificação de substâncias por comparação com dados da literatura com simplicidade e rapidez de análise. A ionização por *eletrospray*, ocorre devido a aplicação de um potencial elétrico a ponta de um capilar metálico, o que leva a geração de cargas na superfície

do líquido injetado e a deformação da gota. A formação do *spray* eletrostático composto de uma mistura de partículas do solvente utilizado e as do analito ocorre devido a tensão superficial das gotas que se tornam cada vez menores, denominada "explosão coulômbica" (LANÇAS, 2009; CROTTI et al., 2006). Para a identificação dos maiores picos, foram feitas diversas pesquisas na literatura (Quadro 1).

Quadro 1. Substâncias identificadas por ESI/MS [M-H]⁻.

ÍON PRECURSOR [M-M] ⁻ m/z	COMPOSTO	REFERÊNCIA
G1H		
152,89	Ácido protocatecuico	Simirgiotis et.al (2015)
254,99	Ácido palmítico	Simirgiotis et.al (2015)
280,97	Ácido oleico	Cabral, 2010
310,78	Ácido araquidônico	Simirgiotis et.al (2015)
446,87	Kaempferol-3-O-glucosideo	Simirgiotis et.al (2015)
G1E		
152,86	Ácido protocatecuico	Simirgiotis et.al (2015)
255,01	Ácido palmítico	Simirgiotis et.al (2015)
288,71	Catequina	Simirgiotis et.al (2015)
324,84	Ácido p-cumárico	Simirgiotis et.al (2015)
448,85	Heterosídeo de ácido ferúlico	Simirgiotis et.al (2015)
TP2H		
152,83	Ácido protocatecuico	Simirgiotis et.al (2015)
254,98	Ácido palmítico	Simirgiotis et.al (2015)
280,96	Ácido oleico	Cabral, 2010
TP2E		
152,86	Ácido protocatecuico	Simirgiotis et.al (2015)
254,96	Ácido palmítico	Simirgiotis et.al (2015)
TC3H		
152,83	Ácido protocatecuico	Simirgiotis et.al (2015)
281,02	Ácido oleico	Simirgiotis et.al (2015)
254,92	Ácido palmítico	Simirgiotis et.al (2015)
324,89	Ácido p-cumárico	Simirgiotis et.al (2015)
TC3E		
152,89	Ácido protocatecuico	Simirgiotis et.al (2015)
254,92	Ácido palmítico	Simirgiotis et.al (2015)
281,01	Ácido oleico	Simirgiotis et.al (2015)

Concluída a desreplicação dos extratos, era necessário saber se eles ofereciam algum risco de toxicidade, uma vez que não se faz interessante

investir esforços e recursos para desenvolvimento de um produto, que no final pode se revelar inviável para consumo por questões de segurança.

Ciências da Saúde

Para caracterizar previamente a toxicidade dos extratos foi a análise da citotoxicidade em células humanas pelo método do Alamar Blue®. A resazurina, ingrediente ativo do Alamar Blue®, um corante azul não fluorescente que é reduzido à resorufina que é fluorescente e de cor rosa, o qual monitora o ambiente redutor da célula viva, possibilitando saber se existem células viáveis na cultura depois de serem tratadas com as amostras G1H, G1E, TP2H, TPE, TC3H e TC3E. A mudança de cor se dar pela característica do corante ser indicador acepção de elétrons (intermediário na cadeia de transporte de elétrons) e quando ocorre a mudança de seu estado oxidado para reduzido, é o momento de emissão de fluorescência e transformação de cor. Por possuir um potencial de oxido-

redução de +380mV a pH 7,0, 25°C, o Alamar Blue® pode ser reduzido por redutase mitocondriais com: NADPH, NADH, citocromos (RAMPERSAD, 2012).

Verificou-se a diminuição do número de células em relação ao controle negativo, indicativo da toxicidade do extrato, na concentração de 50 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata dos quais foram tirados a média e calculado o erro padrão da média (Tabela 3). É interessante notar também que em alguns casos, observou-se um aumento no número de células em relação ao controle (0), o que pode remeter a proliferação celular, sendo um indicativo de atividade cicatrizante, bastante relevância em casos de acne. De modo geral, todas as amostras apresentaram baixa citotoxicidade.

Tabela 3. Viabilidade de células MRC-5 expostas aos extratos.

AMOSTRA	V1 (%)	V2 (%)	V3 (%)	MÉDIA±EPM*
Linagem (0)	123,2302	124,9258	118,6265	122,26 ± 1,08
G1H	98,00442	85,34891	83,36912	88,90 ± 2,64
G1E	128,5557	126,8211	129,1151	128,16 ± 0,39
TP2H	124,2817	111,4746	108,5759	114,78 ± 7,78
TP2E	85,0079	120,1705	109,9305	105,04 ± 6,02
TC3H	97,08557	90,19893	82,04295	89,78 ± 2,04
TC3E	78,48121	80,11999	79,41901	79,34 ± 0,27

*EPM: Erro Padrão da Média.

A inflamação é conhecida com uma resposta biológica à estímulos danosos ao organismo, como a entrada e proliferações de patógenos, células danificadas ou irritadas por vias físicas e químicas (Maldini et al., 2009). Essa resposta participa de diversas vias da resposta inata imune, a qual ativam células como leucócitos (ex: macrófagos e linfócitos), mastócitos e células dendríticas. As citocinas secretadas pelas células lesadas ou infectadas, como no caso da acne, secretam IL-11a, TNF-a e IL-6 (podendo secretar também IL 1, 2 e 7) induzem quimosinas que atraem essas células imunes. Está envolvida na fisiopatologia de diversas

doenças, incluindo a acne (REINKE et al, 2012).

Para avaliar o efeito anti-inflamatório dos extratos foi realizado um teste *in vitro* onde foi calculado a concentração de óxido nítrico, molécula sinalizadora que desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação, em cultura de macrófagos ativados por LPS, e expostos aos extratos. Os extratos foram avaliados na concentração de 50 µg/mL em triplicata (Tabela 4).

De forma geral os extratos reduziram em cerca de 50 % a quantidade de óxido nítrico detectável no ensaio. Essa atividade está

Ciências da Saúde

relacionada provavelmente com a grande quantidade de compostos fenólicos nas amostras, que são compostos de alta relevância

terapêutica, com capacidade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, hormonal, dentre outras (SANTOS e RODRIGUES, 2017).

Tabela 4. Concentração de óxido nítrico em culturas de macrófagos ativadas por LPS e expostos aos extratos.

AMOSTRA	A1 (µmol/mL)	A2 (µmol/mL)	A3 (µmol/mL)	MÉDIA ± EPM*
Anti-inflamatório (0)	3,782189	3,68026	1,241416	2,90 ± 0,48
Citocina (LPS)	106,0622	90,12875	103,809	99,99 ± 2,87
G1H	47,96137	47,47854	45,38626	46,94 ± 0,46
G1E	48,04185	53,27253	49,00751	50,11 ± 0,93
TP2H	51,58262	55,20386	52,06545	52,95 ± 0,66
TP2E	43,8573	45,8691	45,22532	44,98 ± 0,34
TC3H	46,83476	48,92704	47,63948	47,80 ± 0,35
TC3E	49,08798	50,29506	48,44421	49,28 ± 0,31

*EPM: Erro Padrão da Média.

Para avaliar a atividade antibacteriana contra *P. acnes*, as amostras foram solubilizadas com DMSO 99 %, inicialmente na concentração de 10%. Após o primeiro ensaio, foram feitas diluições seriadas dos dois extratos mais ativos, G1E e TC3E nas concentrações de 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,312% e 0,156%.

Foram adicionados 100µL em triplicata de cada diluição nos poços. Como controle negativo, foi utilizado um antimicrobiano muito empregado na clínica para o tratamento sistêmico da acne, a doxiciclina (200µg/mL). Após 24 h, foi adicionado o corante Alamar blue® (Tabela 5 e figura 5).

Tabela 5. Viabilidade celular da cepa de *P. acnes* (ATCC 6919) frente a concentração de 10% dos extratos.

AMOSTRA	V1 (%)	V2 (%)	V3 (%)	MÉDIA±EPM*
Bactéria (+)	100,3623	98,8462	100,7913	99,99 ± 0,34
Antibacteriano (-)	3,7107	3,783	3,8763	3,79 ± 0,03
G1H	4,46	4,45	4,53	4,48 ± 0,01
G1E	3,18	3,1804	3,2386	3,20 ± 0,01
TP2H	4,2981	4,3341	4,124	4,25 ± 0,04
TP2E	4,4761	4,3527	4,3414	4,39 ± 0,02
TC3H	4,2068	4,0531	4,122	4,13 ± 0,03
TC3E	3,64	3,7286	3,5845	3,65 ± 0,02

*EPM: Erro Padrão da Média.

De forma geral os extratos reduziram em cerca de 50 % a quantidade de óxido nítrico detectável no ensaio. Essa atividade está relacionada provavelmente com a grande quantidade de compostos

fenólicos nas amostras, que são compostos de alta relevância terapêutica, com capacidade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, hormonal, dentre outras (SANTOS e RODRIGUES, 2017).

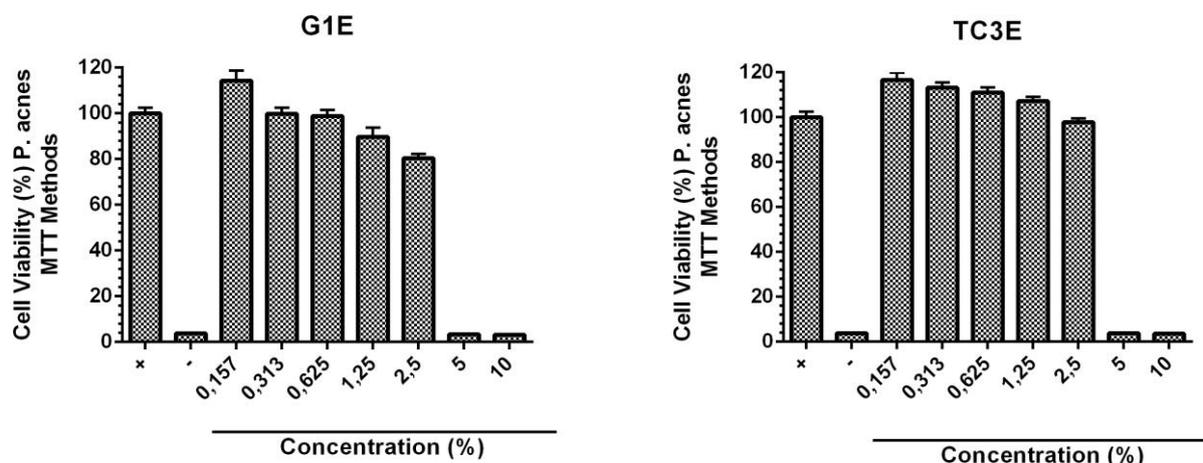


Figura 5. Curva de viabilidade celular da cepa *P. acnes* (ATCC 6919) com diluições de 1:2 dos extratos G1E e TC3E, respectivamente.

Verificou-se que extratos com melhores atividades antibacteriana, anti-inflamatória, e baixa toxicidade foram G1E e TC3E, os quais foram selecionados para comporem a formulação do protótipo de gel antiacne. Preferiu-se as formulações a base gel devido ao seu caráter polar, onde teriam boas interações com os extratos e evitariam um dos principais problemas associados a acne, a oleosidade da pele. A acne se relaciona com a hiperplasia sebácea sob a influência de diversos hormônios, em destaque a testosterona, que é

reduzida nos receptores da glândula sebácea, pela 5 α -redutase tipo I, em dihidrotestosterona (DHT), substância responsável pelas alterações sebáceas (PAWIN et al, 2004). As bases utilizadas foram adaptadas da Farmacopéia Brasileira, livre de conservantes, sendo comparados um gel base de carboximetilcelulose (F1) e um gel base de carbopol (F2), ambas contendo uma mistura dos dois extratos selecionados (Figura 6).



Figura 6. Formulação 1 (A) e Formulação 2 (B) incorporadas com os extratos, logo após o preparo.

Após a preparação das amostras foram medidos os pH, que resultou em 5,8 para F1 e 5,0 para F2, não sendo necessária a correção, já que para a pele os valores ideais estão situados entre 4,5 à 5,5. A densidade também foi medida inicialmente em um picnômetro e constatou-se densidade de 1,8 g/mL e 1,2 g/mL para F1 e F2, respectivamente.

F1 apresentou-se menos estável visto a alteração de cor em todos os ciclos do teste de estabilidade acelerada, formação de duas fases em temperatura ambiente, duas fases no ciclo e três fases em estufa, além de tornar-se líquida. Percebeu-se ainda que a solubilidade dos ativos na base de CMC não foi boa, visto a observação de

Ciências da Saúde

precipitados em todas as amostras. Em F2 não ocorreram alterações visuais

drásticas (Figura 7).

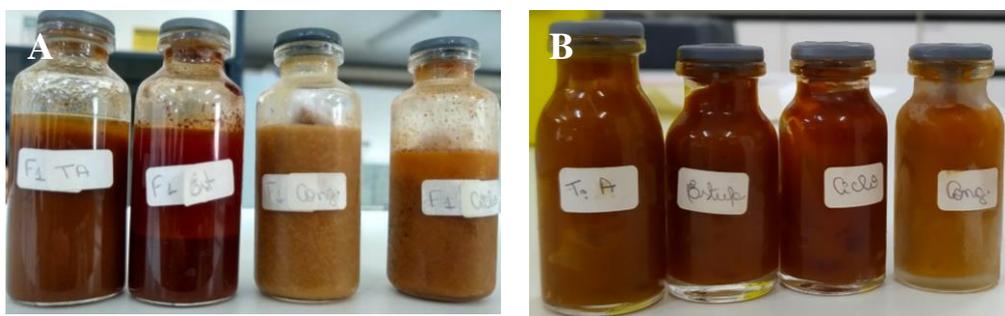


Figura 7. Aspecto das amostras após avaliação da estabilidade acelerada. A: Formulação 1. B: Formulação 2.

Inicialmente as características organolépticas de F1 como cor e cheiro eram de marrom “cor de castor” e aroma fortemente amadeirado. Para F2 a cor era marrom “umber queimado” e aroma de mel. As mudanças de cor e cheiro em F1 quando submetidos ao teste estabilidade acelerada foram perceptíveis e de certa forma desagradável, o que nos levou a descartar essa formulação. Em F2 foi

possível notar sutil mudança de cor nas amostras que foram levadas a estufa, e clareamento da amostra do congelador, o que pode levantar suspeitas de reação de caramelização, devido à grande quantidade de açúcar que os extratos polares de plantas. Contudo, o aroma agradável de mel permaneceu. Então, foi monitorado apenas o pH no restante da análise (Figura 8).

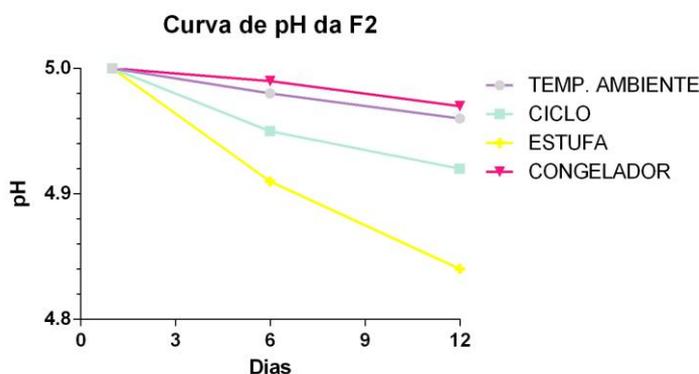


Figura 8. Análise do pH da Formulação 2 ao longo ao teste estabilidade acelerada,

As amostras da F2 foram testadas frente à *P. acnes* pela técnica de difusão em ágar, em Ágar Muller Hilton (Tabela 6). O resultado da inibição foi satisfatório, visto que os halos confirmados alcançaram valores acima de 1 mm. De acordo com Pollani (2011), os halos formados que possuem valores acima de 1 mm são considerados bons (Figura 9). O teste de difusão em ágar possibilitou a visualização da continuação da atividade biológica

principal do produto gerado, a antibacteriana. Sendo assim, a formulação 2 é a mais estável e segura, mantendo suas características organolépticas e farmacológicas em diferentes ambientes

4. Conclusão

A melhor formulação se caracteriza como um gel não-iônico, estável, anti-inflamatório, não tóxico e de cor e cheiro agradável, o que facilita a adaptação e

Ciências da Saúde

aceitação do consumidor, visto que muitos dos tratamentos tópicos para acne são de odor forte e muitas vezes irritativos a pele. A espécie G1, rica em alcaloides e taninos possibilita um teor de adstringência ao produto, proporcionando uma pele mais seca, porém não irritada e descamada, já TC3E é rica em flavonoides que são associados a atividade anti-inflamatória e antioxidante. O teste de viabilidade celular mostrou sua baixa toxicidade sem precisar da utilização do modelo animal, além de mostrar que G1E e TC3E podem

ter efeitos cicatrizantes, que também é interessante para o produto final. Além disso, o protótipo final tem por base um gel, diminui a disponibilidade de gordura e ácidos graxos para *P. acnes* e demonstrou-se estável em condições extremas de armazenamento. Dessa forma, conseguiu-se demonstrar que as espécies amazônicas estudadas, incluindo seus resíduos, têm potencial para se tornarem ingredientes ativos de produtos antiacne, tornando interessante a continuidade deste estudo.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana da formulação após exposição à diferentes temperaturas.

AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO (mm)
Doxiciclina	9,45 ±
Temperatura ambiente	9,26 ± 0,23
Ciclo	8,73 ± 0,11
Estufa	8,2 ± 0,00
Congelador	8,93 ± 0,23



Figura 9. Halos de inibição da produzidos pela formulação 2 após o teste de estabilidade acelerada.

Agradecimentos

Ao Programa de Inovação Tecnológica (PIBITI) à UFAM À *startup* EORA Fitocosméticos pela estrutura para desenvolver a pesquisa. Ao CNPQ pela bolsa concedida. À equipe do Laboratório de Fitoquímica e Semissíntese (FITOPHAR/FCF/UFAM), em destaque à Tallita Marques pelo treinamento cromatografia líquida de alta eficiência, entre outros.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.



Referências

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J Immunol. Methods**, v.170, p.211–224; 1994.
- ARRUDA, A. C. Rede de inovação de dermocosméticos na Amazônia: o uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Parcerias Estratégicas**, v. 14, n. 29, p145-172, 2009.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2012.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRITO, M. F. M. et al. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 3, p. 331-7 2010.
- CABRAL, E. Utilização da técnica de fingerprinting por espectrometria de massas para análise de produtos naturais. 2010, 145f. Tese (Doutorado em química orgânica) – Universidade de São Paulo.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M07-A10 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- COS, P., VLIETINCK, A. J., BERGHE, D. V., & MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of ethnopharmacology**, v.106, n.3, p.290-302, 2006.
- COSTA, A.; ALCHORNE, M. M. A.; and GOLDSCHMIDT, M. C. B. Etiopathogenic features of acne vulgaris. **Anais Brasileiros Dermatol.** [online]. 2008, vol.83, n.5, pp.451-459.
- COUTINHO, M. A. S.; MUSITANO, M. F., COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual Química**. Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p- 241-256, 2009.
- CUCÉ, L. C.; NETO, C. F. **Manual de Dermatologia**. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- CURFS, J.H; MEIS, J.F; HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**. v. 10, p.742-780. 1997
- FABBROCINI, G. et al. Acne scars: pathogenesis, classification and treatment. **Dermatology Research and Practice**, doi:10.1155/2010/893080, 2010.
- FIGUEIREDO, A et al. Avaliação e tratamento do doente com Acne – Parte I: epidemiologia, etiopatogenia, clínica, classificação, impacto psicossocial, mitos e realidades, diagnóstico diferencial e estudos complementares, **Rev Port Clin Geral**, v. 27 n. 9: 59-65, 2011
- KIM, R. H; ARMSTRONG, A. W. Current state of acne treatment: highlightings lasers, photodynamic therapy, and chemical peels. **Dermatology Online Journal**, v. 17, n. 3, 2011.
- KOKANDI, A. evaluation of acne quality of life and clinical severity in acne female adults. **Dermatology Research and Practice**, doi: 10.1155/2010/410809, 2010.
- MALDINI, M; SOSA, S; MONTORO, P; GIANGASPERO, A; BALICK, M.J; PIZZA, C; et al. Triagem da atividade anti-inflamatória tópica da casca de *Acácia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev e as folhas de *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **J Ethnopharmacol**. 122 : 430-3, 2009.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Diretrizes modernas no tratamento da acne vulgar: da abordagem inicial à manutenção dos benefícios clínicos. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3, p. 205-13, 2002.
- OSTROSKY, E.A; MIZUMOTO, M.K; LIMA, M; KANEKO, T.M; NISHIKAWA, S.O; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**. vol.18 no.2, 2008.
- PAWIN H, BEYLOT C, CHIVOT M et al: Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments. **Eur J Dermatol**, v. 14, p.4-12, 2004.
- POLLINI, M.;PALADINI, F.;CATALANO, M.;TAURINO ,A.; LICCIULLI, A.; MAFFEZZOLI, A.;



Ciências da Saúde

SANNINO, A.; MATER, J.; Antibacterial coatings on hemodialysis catheters by photochemical deposition of silver nanoparticles. **Journal of Materials Science in Medicine**, V.22, p.2005–2012, 2011.

RAMPERSAD, S, N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**. v. 12 n. 9, p. 12347-60, 2012.

REINKE, J.M; SORG, H. Reparação e regeneração de feridas. **EUR. Surg. Res.** v. 49, p. 35–43. doi: 10.1159 / 000339613, 2012

RIBAS, J. R.; SMITH S. B. M. O marketing verde recompensa? **Cadernos de Gestão Social**, v. 2, n. 1, p. 87-114, 2009.

SANTOS, S. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v. 7, n. 3, p. 29-35, set./dez. 2017.

SIMIRGIOTIS, M.J, JULIO BENITES, J., CARLOS ARECHE, C., SEPÚLVEDA, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Journal Molecules**, v. 20, pag. 11490-11507, 2015.

SIMÕES, C. M. O., et al. (Org.). Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. **Porto Alegre: Artmed**, p. 209-210, 221-224, 2017.

SOMMER, C; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010;279-302.

VERMA, N. et al. Anti-inflammatory effects of shea butter through inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the Nf-Kb pathway in LPS-activated J774 macrophage cells. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2012.