



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**



**SÔNIA CARINE COVA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA *IN VITRO* DE EXTRATOS  
ETANÓLICOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Marsetia* E SUAS FORMULAÇÕES**

Feira de Santana - BA  
2015

**SÔNIA CARINE COVA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA *IN VITRO* DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Marcetia* E SUAS FORMULAÇÕES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Branco  
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Cardoso  
Rodrigues Branco

Feira de Santana - BA  
2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Cassia Brito Detoni  
(Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

Profa. Dra. Larissa Araújo Rolim  
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)

---

Profa. Dra. Neila de Paula Pereira  
(Universidade Federal da Bahia)

---

Profa. Dra. Mariana Borges Botura  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

---

Prof. Dr. Alexsandro Branco  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

À minha mãe Ângela, pelo nosso amor, amizade, cumplicidade e companheirismo incondicionais. Meu esposo Gustavo, pelo amor, compreensão e companheirismo. A minha irmã Karol. E as pessoas que são a razão da minha vida, que me fazem sentir a alegria de cada amanhecer e pelos quais vivo: ao meu filho, Guilherme e minha sobrinha, Maria.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram em ações e em pensamentos para a realização deste trabalho, em especial.....

A minha mãe Ângela pelo exemplo dignidade, honestidade e retidão. E que já era meu porto seguro e com o nascimento do meu filho passou a ser nosso porto seguro. Sem o apoio dela não teria chegado até aqui.

Ao meu esposo Gustavo, por todo anos, companheirismo e compreensão durante esses meus longos anos de formação profissional.

Ao meu filho Guilherme e minha sobrinha Maria Eduarda por me dar motivação para seguir em minha caminhada.

A minha irmã Karol pelo companherismo e amizade.

Gratidão a Professor Alexsandro Branco pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a orientação, a confiança e credibilidade depositadas em meu trabalho.

A Professora Carla Branco , que é mais do que uma colega de trabalho, é uma amiga e sempre me auxilia no meu crescimento profissional com seu apoio e incentivo

À eterna “Professora” Inalva, no início professora, depois amiga , hoje e eternamente família. Não família imposta, mas sim família por um amor conquistado.

Ao Prof. Alex Taranto por ter me iniciado nos “caminhos” da pesquisa

A professora Cassia Detoni Britto que em tão pouco tempo procurou me passar ensinamentos sem os quais não realizaria este trabalho

A professora do curso de Farmácia: Mariana Borges Botura

Ao professor e amigo do curso de Farmácia da UEFS: Niljay Patel pelo constante apoio e incentivo

À “minha” aluna de IC Rebecca Godiva pelo apoio no desenvolvimento do trabalho;

A empresa Globo Aves pelo fornecimento de material para experimento

À UEFS por ter me permitido trilhar os caminhos do conhecimento desde a minha graduação.

Enfim, a *DEUS*, sempre presente, mesmo na vezes que pensei estar só.

E a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À todos, meus sinceros agradecimentos.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”*

Jose de Alencar

## RESUMO

A radiação solar é o principal fator de surgimento de patologias tóxicas. Medidas preventivas contra o fotoenvelhecimento cutâneo são necessárias e uma das formas é o uso de fotoprotetores. O gênero *Marcetia* (Melastomataceae) é endêmico dos campos rupestres do nordeste brasileiro e são adaptadas as condições de alta incidência solar devido à bioprodução de flavonoides. Este trabalho teve como objetivo inicial avaliar as atividades antioxidante, fotoprotetora (UVB/UVA) e toxicidade dos extratos etanólicos de *M. taxifolia*, *M. macrophylla* e *M. latifolia*. Em seguida, foi investigado o potencial fotoprotetor dos extratos incorporados a 5, 10, 20 e 30% em loção polawax<sup>®</sup>. Todos os testes foram realizados *in vitro*. As formulações foram avaliadas do ponto de vista físico-químico. Em adição realizou-se CLAE-DAD para identificação e quantificação dos flavonoides. O método espectrofotométrico foi usado para determinação do teor total de flavonoides (TFC), método DPPH• (atividade antioxidante) e atividade fotoprotetora (UVB/UVA). A avaliação da toxicidade foi feita por meio do teste HET-CAM e hemólise. O extrato mais promissor foi fracionado. Foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras (5, 10, 20 e 30%), as quais também tiveram seu perfil fotoprotetor UVB/UVA avaliados. A *M. taxifolia* apresentou maior teor de quercetina, com 55,78 g/Kg e 168 µg/mL, conforme os estudos de CLAE-DAD e TFT. Todos os extratos de *Marcetia* ssp. tiveram uma atividade antioxidante em torno de 95%. Da mesma forma que as três espécies tiveram bons resultados de FPS e fotoproteção UVA. A espécie que apresentou melhor valor de FPS foi a *M. macrophylla* (20,25) e proteção UVA foi a *M. taxifolia* (86,04%), porém estas espécies tem um potencial tóxico superior a *M. latifolia*, que também teve um bom valor de FPS (13,12) e proteção UVA (78,09%). Os resultados de toxicidade mostram que esta espécie foi a mais segura, sendo considerada um irritante fraco e com uma taxa de hemólise de 23,51%, enquanto as outras espécies tiveram a taxa de hemólise  $\geq 50\%$ . Diante destes resultados o EEML foi fracionado em cinco frações (MLFR02, MLFR03, MLFR04, MLFR05, MLFR06). Após os ensaios, a MLFR02 apresentou boa atividade fotoprotetora UVB (FPS: 17, 52) e UVA (87,49%), porém a mais segura foi a MLFR02, além de apresentar um alto valor FPS (37,82) quando incorporada à emulsão o que a faz ser indicada para indivíduos muito sensíveis a queimadura solar.

**Palavras-chave:** *Marcetia*, flavonoides, atividade antioxidante, fotoproteção UVB/UVA

## ABSTRACT

Solar radiation is the main factor in the appearance of skin diseases. Preventive measures against skin photoaging are necessary and one of the ways to avoid it is to use sunscreen. The genus *Marcetia* (Melastomataceae) is endemic of rocky fields in northeastern Brazil and are adapted to high sunlight conditions due to bioproduction of flavonoids. The initial goal of this work was to evaluate the antioxidant activities, photoprotection (UVB/UVA) and toxicity of ethanolic extracts of *M. taxifolia*, *M. macrophylla* and *M. latifolia*. Thus, it was investigated the potential photoprotection of the extracts incorporated at 5, 10, 20 and 30% by polawax® lotion. All tests were performed *in vitro*. The formulations were evaluated in the physicochemical standpoint. In addition it was held HPLC-DAD for identification and quantification of flavonoids. The spectrophotometric method was used to determine the total level of flavonoids (TFC), DPPH• (antioxidant activity) and photoprotective activity (UVB/UVA). The evaluation of toxicity was made by means of the HET-CAM test, and hemolysis rate. The most promising extract was fractionated. Photoprotective formulations have been developed (5, 10, 20 and 30%), which also had their sunscreen profile UVB / UVA evaluated. The *M. taxifolia* showed higher quercetin content, with 55.78 g/Kg and 168 µg/mL, following the studies of HPLC-DAD and TFC. All *Marcetia* ssp extracts had an antioxidant activity around 95%. Likewise, the three species had good results to SPF and UVA photoprotection. The species that has better value SPF was *M. macrophylla* (20.25) and UVA protection was *M. taxifolia* (86.04%), but these species have a higher toxic potential related to *M. latifolia*, which also had a good value SPF (13.12) and UVA (78.09%). The toxicity results show that this species is more secure and is considered an irritant and of weak hemolysis rate (23.51%), while the other species had a hemolysis rate  $\geq 50\%$ . Given these results EEML was fractionated into five fractions (MLFR02, MLFR03, MLFR04, MLFR05, MLFR06). After testing, MLFR02 showed good UVB sunscreen activity (17,52) and UVA (87.49%), but the safest was MLFR02 beyond presenting results in a high SPF value (37.82) when incorporated into the emulsion which makes it suitable for individuals who are very sensitive to sunburn.

**Keywords:** *Marcetia*, flavonoides, antioxidant activitie, photoprotection UVB/UVA.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AA	Atividade antioxidante
AAS	Acido acetilsalicílico
Abs	Absorbância
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
BHT	Butylated hydroxytoluene
BZ3	Benzofenona 3
CAM	Chorioallantoic membrane
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva para 50% da atividade
CLAE-DAD	Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo Diodo
DPPH•	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EEML	Extrato etanólico de <i>M. latifolia</i>
EEMM	Extrato etanólico de <i>M. macrophylla</i>
EEMT	Extrato etanólico de <i>M. taxifolia</i>
EtOH	Etanol
FPS	Fator de Proteção Solar
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
Hex	Hexano
HO•	Radical hidroxila
Kg	Quilograma
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
MLFR02	<i>M. latifolia</i> fração 02

MLFR03	<i>M. latifolia</i> fração 03
MLFR04	<i>M. latifolia</i> fração 04
MLFR05	<i>M. latifolia</i> fração 05
MLFR06	<i>M. latifolia</i> fração 06
RL	Radical livre
EROS	Especies Reativas ao Oxigênio
RVS	Resveratrol
SCV	Suspensão de Células Vermelhas
SRL	Sequestro de Radical Livre
t0	Tempo zero
t20	Tempo vinte minutos
t40	Tempo quarenta minutos
t60	Tempo sessenta minutos
t80	Tempo oitenta minutos
t100	Tempo cem minutos
t120	Tempo cento e vinte minutos
EtOH	Etanol
TFT	Teor de Flavonoides Total
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1:	Estrutura da pele	28
Figura 2:	Ilustração esquemática do espectro eletromagnético	34
Figura 3:	Representação esquemática da penetração de diferentes radiações na pele	35
Figura 4:	Representação esquemática do processo de absorção da radiação UV pelos filtros orgânicos	44
Figura 5:	Estrutura química da BZ3	45
Figura 6:	Estrutura de ressonância das benzofenonas	45
Figura 7:	Estrutura dos isômeros: <i>trans</i> e <i>cis</i> –RVS	49
Figura 8:	Estrutura química básica dos flavonoides	53
Figura 9:	Estágios de oxidação dos lipídios membranares mediada pelos radicais livres.	57
Figura 10:	Redução do DPPH• por um antioxidante	58
Figura 11:	Estrutura química da quercetina	61
Figura 12:	<i>M. taxifolia</i> (A. St.-Hil.) DC	64
Figura 13:	<i>M. macrophylla</i> Wurdack	65
Figura 14:	<i>M. latifolia</i> Naudin	65
Figura 15:	Obtenção dos extratos etanólicos de <i>Marsetia</i> ssp	68
Figura 16:	Fluxograma metodológico da pesquisa experimental	69
Figura 17:	Esquema da diluição das amostras testadas frente ao FPS	74
Figura 18:	Preparação da placa de petri a ser irradiada pela radiação UVA	75
Figura 19:	Preparação dos ovos embrionados para aplicação das amostras	77
Figura 20:	Aplicação da amostra na CAM	77
Figura 21:	Ensaio para avaliação da atividade hemolítica	79

Figura 22:	Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEMT	86
Figura 23:	Perfil de fotoproteção UVB do EEMT	88
Figura 24:	Perfil de fotoproteção UVA do EEMT	89
Figura 25:	Avaliação da atividade hemolítica do EEMT	92
Figura 26:	Apresentação do aspecto visual das formulações contendo diferentes concentrações do EEMT: 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)	93
Figura 27:	Características das formulações contendo diferentes concentrações do EEMT após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)	95
Figura 28:	Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo EEMT em diferentes concentrações	96
Figura 29:	Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo EEMT	97
Figura 30:	Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo EEMT	97
Figura 31:	Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEMM	100
Figura 32:	Perfil de fotoproteção UVB do EEMM	102
Figura 33:	Perfil de fotoproteção UVA do EEMM	102
Figura 34:	Avaliação da atividade hemolítica do EEMM	103
Figura 35:	Apresentação do aspecto visual das formulações contendo diferentes concentrações do EEMM: 5% (A), 10% (B), 20%(C) e 30% (D)	104
Figura 36:	Características das formulações contendo diferentes concentrações do EEMM após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)	105
Figura 37:	Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo EEMM em diferentes concentrações	106
Figura 38:	Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo EEMM	106
Figura 39:	Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo EEMM	107
Figura 40:	Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEML	109

Figura 41:	Perfil de fotoproteção UVB do EEML	112
Figura 42:	Perfil de fotoproteção UVA do EEML	113
Figura 43:	Avaliação da atividade hemolítica do EEML	114
Figura 44:	Apresentação do aspecto visual das formulações contendo diferentes concentrações do EEML: 5% (A), 10% (B), 20%(C) e 30 (D)	115
Figura 45:	Características das formulações contendo diferentes concentrações do EEML após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)	116
Figura 46:	Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo EEML em diferentes concentrações	117
Figura 47:	Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo EEML	117
Figura 48:	Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo EEML	118
Figura 49:	Cromatogramas CLAE-DAD das frações do EEML	122
Figura 50:	Perfil de fotoproteção UVB das frações de <i>M. latifolia</i>	127
Figura 51:	Perfil de fotoproteção UVA das frações de <i>M. latifolia</i>	128
Figura 52:	Avaliação da atividade hemolítica das frações de <i>M. latifolia</i>	130
Figura 53:	Apresentação do aspecto visual das formulações contendo MLFR02, MLFR03, MLFR04, MLFR05, MLFR06 em diferentes concentrações: 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)	133
Figura 54:	Características das formulações MLFR02, MLFR03, MLFR05, MLFR06 após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)	136
Figura 55:	Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo frações do EEML em diferentes concentrações: MLFR02 (A), MLFR03 (B), MLFR05 (C) e MLFR06 (D)	138
Figura 56:	Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo frações do EEML: MLFR02 (A), MLFR03 (B), MLFR05 (C) e MLFR06 (D)	140
Figura 57:	Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo	144

frações do EEML: MLFR02 (A), MLFR03 (B), MLFR05 (C) e MLFR06 (D)

Figura 58: Perfil de fotoproteção UVA da loção com BZ3 5%, loção polawax® e controles 146

LISTA DE TABELAS		Página
Tabela 1:	Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda	49
Tabela 2:	Principais classes de flavonoides	54
Tabela 3:	Absorção máxima UV dos compostos fenólicos	55
Tabela 4:	Classificação das amostras de acordo com a pontuação dos fenômenos	78
Tabela 5:	Composição da loção polawax <sup>®</sup> para incorporação das amostras	80
Tabela 6:	Composição da loção polawax <sup>®</sup> para incorporação da BZ3	80
Tabela 7:	Atividade antioxidante (%) do EEMT	87
Tabela 8:	Classificação do Potencial de Irritação Ocular do EEMT pelo ensaio HET-CAM	91
Tabela 09:	Média e desvio padrão dos valores de pH das formulações contendo EEMT	94
Tabela 10:	Fator de espalhabilidade (mm <sup>2</sup> /g) das formulações contendo EEMM em diferentes concentrações	95
Tabela 11:	Atividade antioxidante (%) do EEMM	101
Tabela 12:	Classificação do Potencial de Irritação Ocular do EEMM pelo ensaio HET-CAM	103
Tabela 13:	Média e desvio padrão dos valores de pH das formulações contendo EEMM	104
Tabela 14:	Fator de espalhabilidade (mm <sup>2</sup> /g) das formulações contendo EEMM em diferentes concentrações	105
Tabela 15:	Quantificação da quercetina e calicopterina em no EEML por CLAE-DAD	110
Tabela 16:	Atividade antioxidante (%) do EEML	111
Tabela 17:	Classificação do Potencial de Irritação Ocular do EEML pelo ensaio HET-CAM	114

Tabela 18:	Média e desvio padrão dos valores de pH das formulações contendo EEML	115
Tabela 19:	Fator de espalhabilidade (mm <sup>2</sup> /g) das formulações contendo EEML em diferentes concentrações	116
Tabela 20:	Comparação dos resultados obtidos a partir das análises dos extratos etanólicos das espécies de <i>Marcetia</i>	120
Tabela 21:	Comparação do potencial fotoprotetor das formulações contendo 30% dos extratos etanólicos das espécies de <i>Marcetia</i> .	120
Tabela 22:	Quantificação da quercetina e calicopterina nas frações de <i>M. latifolia</i> por CLAE-DAD	124
Tabela 23:	Atividade antioxidante das frações obtidas do EEML	125
Tabela 24:	TFT e AA das frações do EEML	125
Tabela 25:	Classificação do Potencial de Irritação Ocular das frações do EEML pelo ensaio HET-CAM	130
Tabela 26:	Características organolépticas das frações obtidas do EEML	131
Tabela 27:	Características organolépticas (aspecto, cor e odor) das formulações após 24 horas de preparo	132
Tabela 28:	Média e desvio padrão dos valores de pH da formulação contendo frações do EEML	134
Tabela 29:	Fator de espalhabilidade (mm <sup>2</sup> /g) das formulações contendo frações de <i>M. latifolia</i> em diferentes concentrações	137



LISTA DE EQUAÇÕES		Página
Equação 1:	Fator de Proteção Solar	39
Equação 2:	Determinação do Fator de Proteção Solar	48
Equação 3:	Limite de Detecção	72
Equação 4:	Limite de Quantificação	72
Equação 5:	Precisão	72
Equação 6:	Exatidão	72
Equação 7:	Determinação do Percentual de Sequestro de Radical Livre	74
Equação 8:	Determinação da Potencial de Irritabilidade (PI) pelo método HET-CAM	78
Equação 9:	Determinação do Percentual de Hemólise	79
Equação 10:	Determinação da Espalhabilidade	83
Equação 11:	Determinação do Fator de Espalhabilidade	83

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	23
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	27
<b>2.1 Pele</b>	28
2.1.2 Envelhecimento cutâneo e os radicais livres	30
<b>2.2 Radiação Solar</b>	33
2.2.1 Radiações UVA/UVB e o fotoenvelhecimento cutâneo	34
<b>2.3 Proteção contra a radiação solar</b>	38
2.3.1 Métodos para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)	46
2.3.1.1 Testes utilizados para determinação de FPS <i>in vitro</i>	47
2.3.1.2 Teste utilizado para determinação da fotoproteção UVA <i>in vitro</i>	49
<b>2.4 Avaliação da segurança de ativos utilizados em formulações cosméticas</b>	50
<b>2.5 Flavonoides</b>	52
2.5.1 Flavonoides: atividades antioxidante e fotoprotetora	56
2.5.2 Quercetina	60
<b>2.6 O gênero <i>Marctia</i></b>	62
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b>	67
<b>3.1 Coleta do material vegetal: <i>Marctia</i> ssp.</b>	68
<b>3.2 Obtenção do extrato etanólico bruto de <i>Marctia</i> ssp.</b>	68
<b>3.3 Fracionamento do extrato etanólico com melhor potencial para uso em fitocosmética</b>	69
<b>3.4 Cromatografia a líquidos de alta eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD)</b>	70
3.4.1 Identificação de flavonoides	70
3.4.2 Quantificação dos flavonoides quercetina e calicopterina	71
3.4.2.1 Validação do método analítico	71
<b>3.5 Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT)</b>	72
<b>3.6 Determinação da atividade antioxidante (AA)</b>	72
<b>3.7 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)</b>	74
<b>3.8 Avaliação do perfil fotoprotetor UVA</b>	75
<b>3.9 Avaliação da segurança dos extratos etanólicos de <i>Marctia</i></b>	76

<b>ssp</b>	
3.9.1 Avaliação da irritabilidade ocular <i>in vitro</i> : Teste HET-CAM	76
3.9.2 Ensaio de hemólise	78
<b>3.10 Preparo da loção base</b>	79
3.10.1 Análises físico-química das formulações	81
3.10.1.1 Características organolépticas	81
3.10.1.2 Determinação do pH	82
3.10.1.3 Centrifugação	82
3.10.1.4 Espalhabilidade	82
<b>3.11. Análise Estatística</b>	83
<b>4. RELTADOS E DISCUSSÃO</b>	84
<b>4.1 Extrato etanólico de <i>Marcetia taxifolia</i></b>	85
4.1.1 Análise do EEMT por CLAE-DAD	86
4.1.2 Teor de Flavonoides Total (TFT) e atividade antioxidante (AA)	87
4.1.3 Fator de Proteção Solar	88
4.1.4 Atividade fotoprotetora UVA	89
4.1.5 Avaliação da toxicidade	90
4.1.5.1 Teste em membrana corioalantóide de ovos de galinha (HET-CAM)	90
4.1.5.2 Atividade hemolítica	91
4.1.6 Avaliação do perfil fotoprotetor UVB/UVA <i>in vitro</i> das formulações contendo EEMT	92
4.1.6.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações contendo EEMT	94
4.1.6.2 Determinação do FPS	96
4.1.6.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA	97
<b>4.2 Extrato etanólico <i>Marcetia macrophylla</i></b>	99
4.2.1 Análise do EEMM por CLAE-DAD	100
4.2.2 Teor de Flavonoides Total (TFT) e atividade antioxidante (AA)	101
4.2.3 Fator de Proteção Solar	101
4.2.4 Atividade fotoprotetora UVA	102
4.2.5 Avaliação da toxicidade	102
4.2.5.1 Teste em membrana corionalantóide em ovos de galinha	102

(HET-CAM)	
4.2.5.2 Atividade hemolítica	103
4.2.6 Avaliação do perfil fotoprotetor UVB/UVA <i>in vitro</i> das formulações contendo EEMM	103
4.2.6.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações	104
4.2.6.2 Determinação do FPS	106
4.2.6.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA	107
<b>4.3 Extrato etanólico <i>Marcetia latifolia</i></b>	108
4.3.1 Análise do EEML por CLAE-DAD	109
4.3.2 Teor de Flavonoides Total (TFT) e atividade antioxidante (AA)	111
4.3.3 Fator de Proteção Solar	112
4.3.4 Atividade fotoprotetora UVA	113
4.3.5 Avaliação da toxicidade	114
4.3.5.1 Teste em membrana corionalantóide de ovos de galinha (HET-CAM)	114
4.3.5.2 Atividade Hemolítica	114
4.3.6 Avaliação do perfil fotoprotetor UVB/UVA <i>in vitro</i> das formulações contendo EEML	115
4.3.6.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações	115
4.3.6.2 Determinação do FPS	117
4.3.6.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA	118
<b>4.4 Investigação do potencial fotoprotetor da espécie de <i>Marcetia</i> com maior potencial para aplicabilidade em fitocosmético</b>	119
4.4.1 Fracionamento do EEML e análise das suas frações por CLAE-DAD	121
4.4.2 Quantificação de quercetina e calicopterina por CLAE-DAD	123
4.4.3 Teor de Flavonoides Total (TFT) e atividade antioxidante (AA) EEML	124
4.4.4 Fator de Proteção Solar	126
4.4.5 Atividade fotoprotetora UVA	128
4.4.6 Ensaio de toxicidade	129
4.4.6.1 Teste em membrana corioalantóide de ovos de galinha (HET-	129

CAM)	
4.4.6.2 Atividade hemolítica	130
4.4.7 Avaliação do potencial fotoprotetor das formulações contendo frações de <i>M. latifolia</i>	131
4.4.7.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações	131
4.4.7.2 Determinação do FPS das formulações	139
4.4.7.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA das formulações	142
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	147
REFERÊNCIAS	151
APÊNDICES	
APÊNDICE A: Cromatograma (I), espectro de UV (II) e estrutura química (III) do padrão quercetina (Tr = 14,33 min)	172
APÊNDICE B: Cromatograma (I), espectro de UV (II) e estrutura química (III) padrão calicopterina (Tr = 18,48 min)	173
APÊNDICE C: Valores experimentais para construção da curva de calibração da quercetina	174
APÊNDICE D: Curva calibração da quercetina	175
APÊNDICE E: Valores experimentais para construção da curva de calibração da calicopterina	176
APÊNDICE F: Curva calibração da calicopterina	177
APÊNDICE G: Parâmetros para validação da quantificação da quercetina nos extratos de <i>Marcetia</i> ssp e frações de <i>M. latifolia</i>	178
APÊNDICE H: Parâmetros para validação da quantificação da calicopterina no extrato de etanólico e frações de <i>M. latifolia</i>	179
APÊNDICE I: Curva analítica da quercetina padrão para quantificação do TFT	180
APÊNDICE J: Espectros de UV dos Tr 11-14 min. de <i>M. taxifolia</i>	181
APÊNDICE L: Espectros de UV dos Tr 15 -21 min de <i>M. taxifolia</i>	182
APÊNDICE M: Espectros de UV de <i>M. Macrophylla</i>	183
APÊNDICE N: Espectros de UV de <i>M. latifolia</i>	184
APÊNDICE O: Espectros de UV de <i>M. latifolia</i>	185
APÊNDICE P: Espectros de UV de <i>M. latifolia</i>	186
APÊNDICE Q: Espectros de UV MLFR02	187
APÊNDICE R: Espectros de UV da quercetina e isoflavonas de	188

MLFR02	
APÊNDICE S: Espectros de UV MLFR03	189
APÊNDICE T: Espectros de UV da calicopterina e isoflavonas em MLFR03	190
APÊNDICE U: Espectros de UV de MLFR04	191
APÊNDICE V: Espectros de UV de MLFR05	192
APÊNDICE X: Espectros de UV de MLFR06	193
ANEXOS	
ANEXO 01. Artigo publicado: “ <i>In vitro</i> photoprotective effects off <i>Marcetia taxifolia</i> ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations”	194
ANEXO 02. Artigo submetido a publicação: “ <i>In vitro</i> evaluation off the <i>Marcetia macrophylla</i> ethanolic extract as a natural antisolar agent: characterization off sunscreen formulations”	201

## **1.INTRODUÇÃO**

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, faz a interface entre o organismo e o ambiente externo. Devido a sua resistência física, exerce diversas funções: termorregulação, síntese bioquímica e metabolismo, resposta aos estímulos imunológicos, detecção sensorial, proteção contra atritos e, a radiação ultravioleta UV (RANGEL, 1998; GONÇALVES, 2000; ORIÁ *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; BELO, 2008).

A luz solar em doses adequadas melhora a eficácia do sistema imunológico (ação fungicida e bactericida), estimula o metabolismo, reduz o colesterol, além de promover a sensação de bem-estar, além de ser responsável pela síntese da vitamina D, que, entre outros hormônios, é vital para a saúde física e mental. (SANSSON, 2006). Porém a radiação UV também é responsável por efeitos nocivos, quando há exposição em excesso, promovendo alterações cutâneas relacionadas com inúmeras doenças de pele, se destacando o câncer de pele.

O envelhecimento cutâneo é um ciclo altamente complexo pelo acúmulo de diferentes substâncias nas células e tecidos, desencadeado por fatores intrínsecos: como geração de radicais livres e alterações hormonais; e extrínsecos, exposição ao tabaco, a desnutrição, a radiação infravermelha e como a exposição a radiação UV, sendo esta o principal agente promotor do fotoenvelhecimento (BALOGH *et al.*, 2011)

Desta forma, a exposição solar deve ocorrer de modo cauteloso para que não resulte em sequelas a pele, pois, fisiologicamente, o organismo humano é capaz de defender-se contra os danos causados pela radiação UV em virtude da ação dos antioxidantes. Porém a exposição excessiva e crônica a radiações UV e outros radicais livres pode interferir, negativamente, nesse mecanismo de defesa natural (GÁLVEZ, 2010, GREGORIS *et al.*, 2011).

A utilização de fotoprotetores é a principal estratégia contra os efeitos nocivos dos raios UV (BALOGH *et al.*, 2011). As formulações com filtros solares, geralmente, apresentam-se na forma de emulsões, sendo estas os veículos mais usados tanto na forma de cremes como também em loções. As emulsões óleo em água (O/A) são os sistemas mais empregados por serem, sensorialmente, mais agradáveis ao usuário (MILESE, GUTERRES, 2002).

O fator de proteção solar (FPS) representa o valor atribuído a esta capacidade e efetividade das formulações. O método padrão de avaliação da



efetividade de uma formulação fotoprotetora baseia-se no cálculo do fator de proteção solar (FPS) (WHO, 2009). Este fator foi criado em 1956 e é calculado pela razão entre a dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar (DMEp) e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida (DMEp) (EL-BOURY *et al.*, 2007, BRASIL, 2012a)

A necessidade de métodos mais rápidos e menos dispendiosos para triagem de substâncias potencialmente fotoprotetoras, para estudos de pré-formulação e avaliações de rotina em controle de qualidade, gerou o desenvolvimento de novas técnicas para determinação do FPS. Uma destas, é uma técnica *in vitro*, na qual a determinação do FPS é determinada usando-se o espectrofotômetro (MANSUR *et al.* 1986). Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico têm apresentado boa correlação com os resultados *in vivo* (SAYRE *et al.*, 1979; SANTOS *et al.*, 1999; FLOR, DAVOLOS, CORREA, 2007; SILVA, FERRARI *et al.*, 2007). Diversos trabalhos têm sido publicados utilizando a metodologia *in vitro* para determinação do FPS de formulações contendo diferentes filtros solares, inclusive moléculas de origem natural, presentes em extrato e óleos vegetais (BOBIN *et al.*, 1994, BEBER, SCHNEIDER, 2000; FERRARI *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2009; LIMA, 2015).

Tal fato é observado porque estudos tem associado a capacidade das substâncias naturais, em absorver na região do UVB e UVA, habilidade de neutralizar radicais livres e/ou compostos oxidantes e geração de mediadores químicos que inibem os danos causados pela excessiva exposição à radiação solar. Ao longo do processo evolutivo é notada a permanência da expressão de genes que regulam o metabolismo de constituintes como os flavonoides que exercem estas funções nas plantas (EDEVRA, 2005; AGATI *et al.*, 2013).

Assim, o emprego de extratos vegetais na tentativa de proteger a pele contra os danos provocados pelas radiações UV vem aumentando nos últimos anos, uma vez que muitos destes extratos possuem substâncias ativas análogas estruturalmente a filtros sintéticos, com uso já consagrado no mercado farmacêutico de fotoprotetores (CHIU *et al.*, 2005).

O espectro de absorção dos flavonoides, quando dispersos em etanol, mostra dois picos na região o UVB: um na faixa de 240-320 nm e outro 300-550 nm, indicando potencial uso fotoprotetor para essa faixa radiação (BOBIN, OGAWA e FURKUI, 1994). Estudos *in vivo* e em *in vitro* tem comprovado que os

flavonoides inibem enzimas que estão envolvidas na produção de radicais livres por meio da doação de elétrons (HANASIKI *et al.*, 1994).

Desta forma, o presente trabalho buscou estudar espécies vegetais oriundas do semiárido baiano frente as suas atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro*, pois diferentes espécies de plantas, em especial as plantas do semiárido, estão adaptadas a uma enorme intensidade de incidência luminosa. As folhas destas plantas, geralmente são cobertas por tricomas e/ou por uma camada de resina, rica em terpenóides e flavonoides. Um dos papéis mais importantes destes flavonoides refere-se à absorção da radiação UVB/UVA como um filtro natural (CUADRA, HARBORNE e WATERMAN, 1997).

Para desenvolvimento do estudo das atividades antioxidante e fotoprotetora das espécies *Marcetia latifolia*, *M. taxifolia* e *M. macrophylla* foram preparados extratos etanólicos utilizando-se métodos extrativos clássicos. A identificação dos flavonoides foi conduzida por CLAE-DAD.

Determinou-se, *in vitro*, a atividade antioxidante por meio do sequestro radical livre DPPH• (ALVES *et al.*, 2010). A determinação do FPS foi feita por meio da técnica *in vitro* usando-se o espectrofotômetro (MANSUR *et al.*, 1986). Ainda avaliando a atividade fotoprotetora, foi mensurada a capacidade de fotoproteção contra raios UVA, observando o potencial dos extratos etanólicos de *Marcetia* em impedir degradação do resveratrol (KERRILEE, 2009; DETONI *et al.*, 2012).

Para avaliação toxicológica dos extratos de *Marcetia* ssp foram realizados os ensaios HET-CAM (*Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*) pelo qual mensurou-se semi-quantitativamente o potencial irritante de soluções contendo o extrato etanólico (BRASIL, 2012b). E avaliação da atividade hemolítica das amostras segundo metodologia descrita por Bender e colaboradores (2012) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012a). Também foi investigada a espécie que se mostrou tanto eficaz. Esta foi então fracionada por cromatografia em coluna aberta. E as frações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas e, novamente, submetidas aos ensaios de FPS, atividade antioxidante e ensaios toxicológicos aplicados aos extratos brutos de *Marcetia* ssp. Posteriormente, foram desenvolvidas formulações farmacêuticas para a incorporação das frações de *M. latifolia*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 Pele

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, faz a interface entre o organismo e o ambiente externo, e corresponde a cerca de 5% do peso total corporal, apresentando variações de espessura e valor de pH de acordo com as regiões corpóreas (PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT, 1998). Devido a sua resistência física, exerce diversas funções: termorregulação, síntese bioquímica, proteção frente a atritos e a radiação ultravioleta, resposta aos estímulos imunológicos - sendo a primeira linha de defesa contra agressões do meio ambiente - e detecção sensorial (RANGEL, 1998).

Este órgão é formado por uma tripla camada tecidual: epiderme (camada mais superficial), derme (camada intermediária) e hipoderme ou tecido celular subcutâneo (camada profunda) (Figura 1).

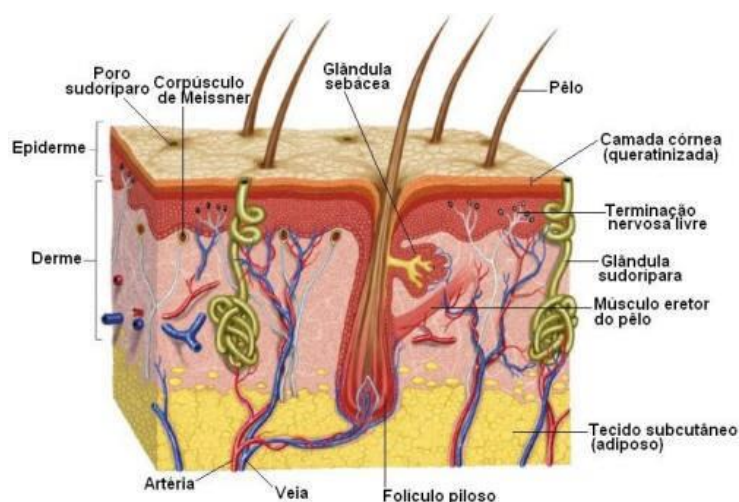


Figura 1: Estrutura da pele (Fonte: RIBEIRO, 2010)

A epiderme é a camada mais externa e protege o corpo das agressões do meio ambiente. A espessura da epiderme varia de 0,07 a 12 mm na maioria do corpo, podendo atingir 0,8 mm na palma das mãos e 1,4 mm na planta dos pés (HABIF, 2005). A epiderme é formada por 5 camadas celulares: estrato germinativo ou camada basal (mais interna), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (mais externa) (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A camada basal é fina e constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, sendo formada por uma região chamada epiderme

viável, com células metabolicamente ativas, que se renovam periodicamente, os queratinócitos, que se organizam em camadas: basal, espinhosa e granulosa.

O estrato córneo corresponde às células mortas queratinizadas - queratina de superfície (ROSEN, 2005; KIM *et al.*, 2007). Além dos queratinócitos, existem outras células presentes neste extrato: melanócitos, que sintetizam a melanina, substância responsável pela coloração da pele e proteção naturalmente contra os raios solares (LEONARDI, 2000). O estrato córneo é capaz de refletir entre 5 e 10 % da luz que incide sobre ele. Na região onde o estrato córneo é mais fino, a sensibilidade a radiação UV é aumentada e a pele pode ser queimada ou lesionada com maior facilidade do que a região dotada de uma camada córnea mais abundante (RIBEIRO, SANTOS e MEDEIROS, 2004).

A derme, tecido localizado abaixo da epiderme, também denominada de tecido de sustentação por ser responsável a dar consistência física da pele. É constituída fundamentalmente por dois tipos de células: fixas (fibroblastos) e “migratórias”. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese das diferentes macromoléculas que compõem a matriz extracelular, enquanto as células migratórias participam da defesa do organismo (PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT, 1998). É formada por tecido conjuntivo denso, sendo rica em fibras colágenas e de elastina formadas pelos fibroblastos presentes. Este tecido de sustentação é atravessado por inúmeros vasos e nervos, no qual estão implantados os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos, estruturas sensoriais e unhas (PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A região da hipoderme é a camada mais profunda do tecido sobre a qual repousam a epiderme e a derme, unindo estas ao resto do corpo, permitindo que as duas primeiras, deslizem livremente sobre as outras estruturas do organismo. É formada por uma variedade de tecido conjuntivo e tecido adiposo, a qual, entre outras funções, é responsável pelo armazenamento de nutrientes e energia para o organismo (PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT, 1998).

Conhecida, também, como tecido subcutâneo, atua como reserva energética, na proteção contra choques mecânicos, redução de impacto e traumas, sendo também considerada termo - regulador (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Envelhecimento cutâneo e os radicais livres

O processo denominado de renovação epidérmica, o qual se completa em torno de duas semanas em pessoas jovens e em, 37 dias em pessoas com idade superior a 50 anos, consiste no deslocamento permanente e repetido de células da camada basal para a superfície da epiderme, de onde se desprendem as mortas, resultando em alterações perceptíveis, como atrofia, enrugamento, lassidão (sinais mais aparentes de uma pele senil). O envelhecimento intrínseco é natural, inevitável, comum a todas as pessoas, podendo está relacionado a fatores genéticos e/ou cumulativos, caracterizado por atrofia da pele, rugas, manchas de hiperpigmentação, redução na espessura da pele e dificuldade de cicatrização que surgem gradativamente, acentuando-se após os 30 anos de idade. Além das alterações fisiológicas, ao longo do ciclo de vida de um indivíduo, a pele sofre diversas agressões por agentes físicos, químicos ou biológicos, que podem levar ao aparecimento de patologias ou alterar o processo de envelhecimento (EDWARDS, MARKS, 1995; PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT, 1998; ORIÁ *et al.*, 2003).

O envelhecimento cutâneo é um ciclo altamente complexo pelo acúmulo de diferentes substâncias nas células e tecidos, desencadeado por fatores intrínsecos: como geração de radicais livres e alterações hormonais; e extrínsecos, como a exposição a radiação ultravioleta (principal agente), exposição ao tabaco, a radiação infravermelha e a desnutrição (BABY *et al.*, 2009).

Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres (RL) aceleram o envelhecimento cutâneo. O maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica, que resulta em alterações irreversíveis em nível da conformação celular, levando ao envelhecimento prematuro, que pode ser visível na pele através de sulcos, rugas e *secura*, entre outras alterações (NICHOLS e KATIYAR, 2010).

Os RL são átomos ou moléculas que apresentam um elétron desemparelhado, tornando-o num composto muito instável e reativo, hoje, também, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). Uma molécula de oxigênio com elétrons pareados é estável, entretanto, o oxigênio

com um elétron sem par é “reativo” porque ele capta elétrons de componentes vitais, danificando-os. Essas reações são a fonte mais importante de produção de radicais livres, por ocorrerem constantemente no interior do organismo vivo. A estrutura incompleta do RL faz com que este tenha a capacidade de ligar-se inespecificamente a outras moléculas, completas e estáveis, promovendo reações em cadeia, capazes de causar danos em diferentes componentes celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

Além da produção através das atividades biológicas do próprio organismo, os RL podem ser produzidos pela indução por fatores externos, destacando-se: destaca-se a poluição (fumo, gases de ozônio), radiações (radiações ionizantes e UV) e agentes químicos (herbicida paraquat, paracetamol, alguns solventes orgânicos) (CHEN, HU e WANG, 2012).

Atualmente, sabe-se que os RL estão envolvidos em processos vitais biológicos: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular. Por outro lado, sabe-se que o excesso destes radicais também está relacionado a processos nocivos para o organismo. Desta forma, conseguiu-se compreender a influência dos RL no envelhecimento, e em diversos outros processos fisiopatológicos como algumas doenças degenerativas, como o cancro, doenças cardiovasculares, cataratas, aterosclerose, inflamação, declínio do sistema imunitário, na peroxidação dos lípidos da membrana citoplasmática, na agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, glícideos e DNA, e ainda na fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Existem soluções para evitar o estresse oxidativo, estas passam pelo aumento do nível de antioxidantes no organismo, uma vez que os mesmos tem a função de remover as espécies reativas que estão sendo produzidas em excesso, impedindo assim lesões oxidativas e, conseqüentemente, o *stress* oxidativo. O excesso de RL no organismo seja por produção endógena ou exógena é combatido por compostos conhecidos como antioxidantes. Estes são mais reativos com os RL do que as células do organismo, assim agem como mecanismo de defesa do corpo, estes podem ser produzidos pelo próprio indivíduo, adquiridos através da dieta (ingesta de alimentos ou suplementos

alimentares) e até por reposição cutânea. (FARRIS, 2007; NICHOLS e KATIYAR, 2010)

O corpo desenvolve mecanismos de defesa contra o ataque de RL por meios antioxidantes como: superóxido dismutase, catalase,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), ubiquinona e glutathione. A glutathione, a qual está presente na maioria das células, é considerada um dos componentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, ozônio e radiação ultravioleta (RU) (HALLIWELL *et al.*, 1997; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A exposição solar prolongada e excessiva na faixa da radiação UVA resulta no fotoenvelhecimento, que ocorre quando elementos-chaves de suporte da pele são danificados por esta radiação. Trata-se de um processo cumulativo que contribui para a formação de rugas, flacidez e outros sinais de envelhecimento precoce e como consequência mais grave, pode-se citar a indução ao câncer de pele, dependendo da tonalidade da pele, tempo e intensidade de exposição (DE PAOLA e RIBEIRO, 1998).

As radiações UVB e UVA II penetram apenas na epiderme e derme superior, enquanto a UVA I atinge a derme profunda, essa exposição solar crônica sobre o metabolismo das células da pele, queratinócitos e fibroblastos, gera uma sobrecarga de EROS, que, por sua vez, acabam esgotando os mecanismos celulares de defesa, quando então a célula inicia o processo de senescência (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1999).

O envelhecimento cutâneo devido a fatores externos, o qual é conhecido como envelhecimento extrínseco ou actínico é resultado, principalmente, da exposição excessiva à radiação ultravioleta. Esta ainda pode causar danos outros ao organismo, são eles: imunossupressão local e sistêmica, fotoenvelhecimento precoce e, como principal fonte de preocupação, o aparecimento de fotocarcinogênese (BASTUJI-GARIN, 1999; LUCCI, CITRO e WILSON, 2001; FISHER e XU, 2005).

No processo de envelhecimento cutâneo promovido pela exposição às radiações UV, os RL oriundos desta exposição, vão reagir imediatamente com moléculas, oxidando o DNA, lípidos e proteínas celulares, resultando, desta forma, alterações irreversíveis na conformação celular, as quais levarão ao



envelhecimento cutâneo prematuro, facilmente perceptível (sulcos, rugas e ressecamento). E ainda promovem reações inflamatórias, eritematosas, imunossupressão, esta última provoca mutações no gene supressor tumoral, reduzindo a capacidade do organismo em evitar a proliferação celular exacerbada, formação de tumores (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os antioxidantes podem ser particularmente úteis nas alterações da pele induzidas pela radiação UVA que se acredita ser determinante, em grande parte, pelo processo oxidativo. De fato, a aplicação tópica de antioxidantes eleva a dose mínima de UVA necessária para induzir um escurecimento pigmentar imediato e diminuir a severidade das fotodermatoses induzidas pela radiação UVA (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Para prevenção e terapia contra o envelhecimento cutâneo, diversos métodos podem ser utilizados tais como: fotoprotetores para prevenir os danos induzidos pela radiação ultravioleta, compostos antioxidantes (vitaminas, coenzima Q10 e polifenóis) que podem ser usados por via tópica ou oral, retinoides, hormônios, enzimas de reparo ao DNA (TOREZAN, NIWA e FESTA NETO, 2009)

## **2.2 Radiação Solar**

O Sol representa a principal fonte de energia do planeta, a emite na forma de radiação eletromagnética de vários comprimentos de onda, incluindo energia cósmica de alta e baixa energia; raios gama; raios ultravioletas (UV) de alta e baixa energia; luz visível; radiação infravermelha (IV); microondas, e finalmente ondas de rádio (Figura 2).

Radiação com comprimento de onda de alta energia ( $\lambda < 10$  nm) desloca os elétrons das moléculas para formar íons, e são consideradas radiações ionizantes. Radiação UV, visível e IV com baixo comprimento de onda, não possuem a energia requerida para esse processo e são classificadas como não ionizantes (KIRCHOFF, 1995; SHAATH *et al.*, 2005).

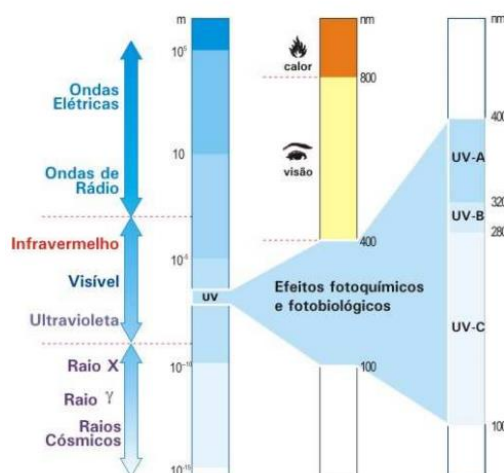


Figura 2: Ilustração esquemática do espectro eletromagnético (<http://acquaticos.blogspot.com.br/2010/08/radiacao-ultravioleta-gerada-pela.html>)

Esse espectro de radiação UV é dividido em três segmentos, baseados nos diferentes comprimentos de onda - radiação de comprimento de onda UVA ( $\lambda = 320\text{-}400\text{ nm}$ , que pode ser subdividida em UV-A1 ( $\lambda = 340 - 400\text{ nm}$ ) e UV-A2 ( $\lambda = 320 - 340\text{ nm}$ ), UVB ( $\lambda = 290 - 320\text{ nm}$ ) e UVC ( $\lambda = 100 - 290\text{ nm}$ ).). Cada radiação penetra a pele de acordo com o seu comprimento de onda, interagindo assim com diferentes células localizadas nas diferentes camadas da pele (GARCIA, 2001)

Ao incidir sobre a pele, a radiação UV pode ser absorvida, refletida ou espalhada. Somente a parte absorvida produz alterações dos cromóforos (moléculas que absorvem a radiação), como exemplos de cromóforos tem-se a melanina, os ácidos nucléicos (que formam o DNA), aminoácidos (que formam as proteínas) .As alterações sofridas pelos cromóforos da pele são denominadas reações fotoquímicas, as quais desencadeiam todas as demais reações bioquímicas que resultam em danos como: queimadura, elastose solar, fotoenvelhecimento e até mesmo, câncer de pele (PINNELL, 2003; SUAREZ PEREZ *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Radiações UVA/UVB e o fotoenvelhecimento cutâneo

O fotoenvelhecimento consiste nas alterações cutâneas resultantes de exposição solar crônica. A pele fotoenvelhecida é áspera, enrugada, com coloração amarelada (diminuição dos vasos sanguíneos), despigmentação

mosqueada provocada pela estimulação dos melanócitos pela radiação UV, microvasos surgem pelo alargamento de pequenos vasos e rugas finas devido ao enfraquecimento dos tecidos de suporte, perda da elasticidade e aparecimento de lesões cancerosas pré-malignas e malignas (PARRISH, JAENICKE e ANDERSON, 1982).

O envelhecimento extrínseco é um intensificador do envelhecimento cronológico, sendo esse o motivo pelo qual, áreas expostas e não expostas à radiação UV costumam apresentar aspectos muito diferentes (STEINER, 1995; ENJELKE *et al.*, 1997). A interação entre a pele e a luz solar é inevitável. O potencial de dano depende do tipo e da intensidade da exposição (GRUIJL, VAN KRANEN e MULLENDERS, 2001; NORVAL, 2001, MURPHY, 2002). A luz UV apresenta distinta penetração na pele (Figura 3) e causa a maioria das reações cutâneas fotobiológicas.

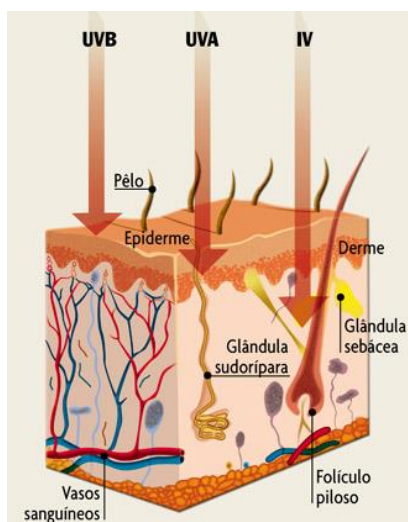


Figura 3: Representação esquemática da penetração de diferentes radiações na pele (LAWRENCE, 2001).

Os fotodanos, na pele humana, causados pela radiação UVA não varia de acordo com a hora do dia, pois, a intensidade desta radiação é constante, assim, promove o surgimento de danos a longo prazo, especialmente com exposições repetidas ao sol, tais como reações de fotosensibilidade e fototoxicidade, danos ao sistema vascular periférico e induz ao câncer de pele, dependendo do tipo de radiação, do tempo, frequência e intensidade de exposição (MENDONÇA, 1998; SALGADO, GALANIE e LEONARDI, 2004;

OLIVEIRA *et al.*, 2004; STEINER, 2005), bronzeamento direto com eritema fraco, ou subqueimadura. A reação máxima do eritema é atingida em 72 horas, após a exposição ao sol. Havendo exposição contínua, não somente acelera o envelhecimento da pele, mas também, ocorre implicação carcinogênica e imunossupressão (DUMAY, KARAN e VIAN, 2001; GARCIA, 2001).

A radiação UV que consegue atravessar a atmosfera consiste principalmente em UVB ( $\cong 5\%$ ) e UVA ( $\cong 95\%$ ), sendo esses espectros, compreendidos entre 290 a 400 nm, que interessam clinicamente à fotoproteção por ocasionarem danos à pele. Naturalmente, a UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio da atmosfera, mas com a degradação ambiental parte desta radiação também pode nos atingir. (SANTOS e BLATT, 1998)

A radiação UVA por ter um maior comprimento de onda, consegue penetrar mais profundamente na pele, atingindo não só os queratinócitos da epiderme, como os fibroblastos da derme. Apesar de ser fracamente absorvida, pode ativar a formação de radicais livres (RL) e átomos de oxigênio reativo (ROs), que na deficiência de vitamina E intracelular irá se combinar com a molécula lipídica e liberar um átomo de oxigênio, iniciando uma peroxidação do lipídeo poliinsaturado que produz moléculas não ativas de peróxido. Estas moléculas podem causar alguns danos celulares que promovem o fotoenvelhecimento (GARCIA *et al.*, 2001). A faixa UVA também ocasiona eritema, mas é necessária uma intensidade de radiação mil vezes maior que a faixa do UVB para causar o mesmo efeito.

Já os raios UVB possuem pequena penetração na pele, mas devido a sua alta energia, são os maiores responsáveis pelos danos imediatos da radiação solar. As reações fotoquímicas afetam a camada epidérmica da pele, causando eritema e bronzeamento indireto da mesma, pois aproximadamente 90% da radiação UVB é observada pela epiderme e 10% atingem a parte superficial da derme (GARCIA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004). O eritema causado por UVB ocorre em duas fases distintas, sendo que a primeira inicia-se imediatamente após o início da exposição e possui duração de alguns minutos, enquanto que a fase tardia inicia-se após 3 a 4 horas, atinge o máximo em 12 a 24 horas e diminui após 72 horas da exposição (DE PAOLA e RIBEIRO, 1998).

Devido a fatores ambientais, a redução na camada de ozônio tem levado a um aumento da radiação UVB na superfície da terra (ROY, GIES e TOOMEY, 1995). A radiação UVB por ser considerada uma radiação de ondas curtas atingem a pele, penetrando até a camada basal da epiderme. Gera espécies reativas de oxigênio (EROS) sendo, assim, responsável pela indução de *stress* oxidativo, envelhecimento prematuro da pele e por múltiplos efeitos no sistema imunitário. Como consequência da modificação do ângulo da radiação solar e da absorção da radiação solar pela atmosfera, a intensidade da radiação UVB que atinge a superfície terrestre sofre alterações, tendo maior incidência entre 10:00 e 15:00 horas (OSTERWALDER *et al.*, 2000; GARCIA, 2001).

Entretanto faz-se necessário lembrar que a radiação UVB também possui efeitos benéficos como a participação na formação da vitamina D, exerce ação antidepressiva - estimulando a glândula pineal que elabora as endorfinas cerebrais, cuja ação no humor é primordial. As radiações exercem também efeito terapêutico benigno em algumas enfermidades cutâneas, tais como: psoríase, dermatite atópica, micose fungóide, vitiligo e icterícia neonatal, entre outras (DE PAOLA e RIBEIRO, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2004; KULLAVANIJAYA e LIM, 2005).

Os raios UVC não atingem a superfície da Terra em quantidade significativa, pois são filtrados na camada de ozônio, portanto, não implicariam risco para a população. No entanto, a diminuição progressiva desta camada, pode tornar perigosa a exposição a esses raios (ROY, GIES e TOOMEY, 1995).

Resumidamente, os danos cutâneos causados pela exposição à radiação UV podem ser classificados em crônicos e agudos: a exposição crônica pode levar ao fotoenvelhecimento e câncer de pele, diminuição da imunidade cutânea (FERRARI *et al.*, 2002). Já a resposta aguda consiste basicamente em inflamação (eritema, sensibilidade ao toque, edema), bronzeamento (aumento da melanogênese), reações de fotossensibilização induzida por droga e agravamento de doenças e/ou alergias (PARRISH, JAENICKE e ANDERSON, 1982).

A exposição excessiva resulta em severo estresse oxidativo nas células da pele através de interações com cromóforos intracelulares e

fotossensibilizadores, resultando em danos transitórios ou permanentes (FERRARI, 2002).

### 2.3 Proteção contra a radiação solar

Nas primeiras décadas do século XXI, notou-se que o sulfato de quinina acidificado e, mais tarde, o Antilux<sup>®</sup> (2-naftol-6,8-dissulfonato de sódio) evitavam as queimaduras da pele (eritema) pelos raios solares, surge então os protetores solares (URBACH, 2001; MASSON e SCOTTI, 2003). Ao longo do século, muitas substâncias surgiram com eficácia na prevenção de eritema solar e seu uso se tornou mais popular após a segunda guerra mundial, com o ácido *p*-amino benzoico (PABA) (SHAATH, 1997; URBACH, 2001).

Os protetores solares são preparações de uso tópico que reduzem os efeitos deletérios da radiação UV, além de oferecer proteção contra a formação de eritema induzido por radiação UV em peles animal e humana, também inibem a fotocarcinogênese em pele animal (GASPARRO, MITCHNIC e FRANK, 1998).

Os ativos presentes nos protetores solares podem bloquear ou absorver energia eletromagnética na faixa denominada UV e emití-la, geralmente, na faixa do infravermelho, gerando sensação de calor. Devido a esse mecanismo não há penetração da radiação na pele, o que evita danos e permite, assim, maior tempo de exposição ao sol. Há alguns anos, os ativos fotoprotetores são utilizados devido à necessidade de prevenção contra as reações fototóxicas, o câncer de pele e o envelhecimento precoce (UITTO *et al.*, 1997; OZER *et al.*, 2001).

Outro fator tão relevante quanto os anteriormente mencionados nos aspectos qualitativos dos protetores solar é o seu Fator de Proteção Solar (FPS), que corresponde a um valor numérico, com a finalidade de avaliar o tempo durante o qual a pele estará protegida contra queimadura solar, provocada pela radiação UVB, através da administração de um determinado protetor solar (FLOR, DAVALOS e CORREA, 2007; NEVES, 2008a; NEVES, 2008b; NEVES, 2008a; CHORILLI *et al.*, 2009).

Para mensurar, aproximadamente, quanto tempo um indivíduo pode permanecer em exposição solar, com base no FPS do produto, basta saber quanto tempo a pessoa consegue permanecer ao sol, sem nenhum protetor

solar até aparecer na pele um leve eritema, então se multiplica essa fração de tempo, em minutos, tempo pelo FPS declarado no rótulo do protetor. Por exemplo, se o tempo máximo de exposição ao sol, sem filtro solar, for de oito minutos e o fator de proteção solar do produto utilizado for quinze, o tempo máximo de exposição será de cento e vinte minutos. Para um tempo maior deve-se utilizar um protetor solar com FPS superior, considerando que seja utilizado da maneira recomendada (quantidade, reaplicações, etc.) (EL-BURY *et al.*, 2006).

O FPS é definido como o valor obtido pela razão entre a dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar (DMEp) e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida (DMEnp), conforme equação 1 (BRASIL, 2012a)

$$\text{FPS: DMEp/DMEnp} \quad (1)$$

A Dose Mínima Eritematosa (DME) é definida como a menor dose da radiação UV requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta, de acordo com a metodologia adotada. (COLIPA GUIDELINES, 2006; BRASIL, 2012a)

A DME varia conforme o tipo de pele, ou seja, o fototipo de cada indivíduo, que é baseado no histórico de queimadura solar e de bronzeamento. Segundo Fitzpatrick, existem 6 (seis) fototipos distintos e a recomendação do FPS a ser utilizado para cada tipo de pele, como demonstrado no quadro 01.

Tipo de Pele	Fotosensibilidade à radiação UVA	Histórico de queimadura solar e bronzeamento	FPS recomendado		DEM (mJ/cm <sup>2</sup> )
			Mín.	Máx.	
I	Extremamente sensível	Sempre queima facilmente, nunca bronzeia	20	≥ 30	15-30
II	Muito sensível	Sempre queima facilmente, bronzeia minimamente	12	< 20	25-30
III	Sensível	Sempre queima facilmente, bronzeia gradativamente	8	< 12	30-50
IV	Moderadamente sensível	Queima minimamente, sempre bronzeia bem	4	< 8	45-60
V	Pouco sensível	Raramente queima, bronzeia intensamente	2	< 4	60-100
VI	Não sensível	Nunca queima, pele profundamente pigmentada	SR	SR	100-200

Quadro 01: Tipos de pele e fatores de proteção recomendados (OLIVEIRA *et al.*, 2004, adaptado)

Para que a ação do protetor solar seja completa, é ideal que este forme um filme uniforme sobre a superfície da pele. O relevo cutâneo é bastante irregular formado por picos e vales, portanto, torna-se um trabalho difícil revestir a pele de forma homogênea e este é um fator crucial para alcançar uma



proteção efetiva. A dosagem estabelecida para a eficácia fotoprotetora é de 2 mg/cm<sup>2</sup> (GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ-LORENTE e GILARTE-CALZADA, 2008).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Protetor Solar é qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação (BRASIL, 2012a). Nos Estados Unidos da América, onde o FDA (Food and Drug Administration) considera esses produtos como “OTC” (*over the counter*, uma denominação utilizada para medicamentos de venda livre) quando utilizados em seres humanos (RUVOLO JÚNIOR, 1997), já que são considerados como produtos para prevenção de efeitos agudos (como o eritema solar) e crônicos (como o câncer de pele) causados pela radiação solar (FDA, 1999).

A ANVISA também estabelece a Designação de Categoria de Proteção (DCP) relativa à proteção oferecida pelo produto contra radiação UVB e UVA para a rotulagem dos Protetores Solares (Quando 03), que, apesar de não ser obrigatória, é uma informação adicional que auxilia o consumidor no momento de escolha do protetor.

Indicações adicionais não obrigatórias na rotulagem	DCP	FPS	FPUVA
Pele pouco sensível a queimadura solar	Baixa Proteção	6,0 - 14,9	1/3 do fator de proteção solar indica do na rotulagem
Pele moderadamente sensível a queimadura solar	Média proteção	15,0-29,9	
Pele extremamente sensível a queimadura solar	Alta proteção	30,0–50,0	
Pele extremamente sensível a queimadura solar	Proteção muito alta	50 >FPS< 100	

Quadro 03: DCP relativa à proteção oferecida pelo produto contra radiação UVB e UVA para a rotulagem dos Protetores Solares (Fonte: Brasil, 2012b (adaptado))

A determinação do FPS é uma técnica que comprova a eficácia dos filtros solares para a porção UVB do espectro eletromagnético. Como o UVB é responsável por causar eritema na pele, um filtro bastante eficaz é aquele que é capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar (DAMIANI *et al.*, 2006).

Inicialmente os filtros solares foram desenvolvidos para a prevenção de queimaduras solares, porém hoje são reconhecidos como uma importante estratégia para a prevenção ou redução de lesões benignas e malignas da pele, envelhecimento cutâneo precoce e imunossupressão causada pelos raios UV (SALGADO, GALANTE e LEONARDI, 2004).

A eficácia de uma formulação contendo filtro solar é comumente determinada através da maior ou menor proteção proporcionada contra a queimadura, esta eficácia pode ser alterada a depender das propriedades hidrofílicas e lipofílicas dos filtros, pH, estabilidade em temperaturas elevadas e propriedades emolientes do veículo, além da incorporação em veículos apropriados, estes aspectos que podem influenciam o FPS (SHAAT, 1986; PETRAZZUOLI, 2000; MARTINI e SEILLER, 2006).

A efetividade dos fotoprotetores vai depender da disponibilidade de produtos que sejam capazes de promover a proteção contra as radiações UVB e UVA e possuir compatibilidade entre os componentes da formulação e material de acondicionamento e a formulação deve ser quimicamente estável. Quando estas propriedades não são observadas ligações químicas podem ser rearranjadas, levando a novas moléculas cuja absorvância UV pode ser modificada, ou mesmo perdida e as propriedades toxicológicas alteradas. A energia luminosa absorvida pelos filtros UV, se não espalhada ou refletida, deve apenas ser transformada em energia térmica inócua. (DORIA, 2008)

A eficácia dos filtros solares é dependente, ainda, de vários outros aspectos: absorção, distribuição homogênea sobre a pele, reaplicação sempre que houver remoção física, além de respeito ao tempo máximo de permanência ao sol que o produto permite aderir bem à epiderme sem atingir as camadas mais profundas da pele. Também não deve manchar vestuários, não ser volátil, não ser absorvido pela pele, ser hipoalergênico, não ser fototóxico e ser resistente à água. (DE PAOLA e RIBEIRO, 1998)

Os fotoprotetores possuem diversas formas de apresentação, podendo ser encontrados sob a forma de loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água (O/A), emulsões água em óleo (A/O), bastões, aerossóis e cápsulas. Dentre todas estas formas de apresentação, as emulsões são aquelas que apresentam fotoproteção superior (BABY *et al.*, 2008). Além disto, existem substâncias que, embora destituídas de efeito fotoprotetor intrínseco, determinam o aumento do desempenho das formulações contendo filtros solares, como por exemplo, filmógenos (agentes formadores de filmes) capazes de torná-las altamente resistentes à lavagem com água devido a insolubilidade em água, possuindo baixa tensão superficial, conferindo as propriedades de formador de filme, emolientes, que aumentam a lipofilicidade da formulação, determinando uma melhor deposição dos filtros solares na pele e conferindo uma maior resistência à água (AZZELLINI, 1995). Substâncias que previnem reação inflamatória, ocasionada pela radiação UVB, também são propostas para a melhoria da eficácia dos protetores solares (COHEN, DOSSOU e ROUGIER, 1994).

Outro fator que deve ser considerado durante a utilização de formulações fotoprotetoras é a quantidade aplicada na pele. Segundo Kullavanijaya & Lim (2005), a maioria das pessoas aplica uma quantidade em torno de  $0,5 \text{ mg/cm}^2$  que é menor que a necessária para uma fotoproteção eficaz ( $2,0 \text{ mg/cm}^2$ ). A reaplicação da formulação também poderá aumentar a eficácia da fotoproteção, e a principal razão para esta reaplicação é a de repor a quantidade de filtro solar que pode ter sido removido pela água, suor, fricção ou areia (DIFFEY, 2002).

Filtros solares podem ser divididos em dois tipos, de acordo com a natureza e o mecanismo de ação, filtros inorgânicos ou orgânicos (RIBEIRO, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os filtros orgânicos podem ser subdivididos em filtros UVA (absorve radiação UVA), filtros UVB (absorve radiação UVB) e filtros de amplo espectro (absorvem radiação UVA e UVB), geralmente, são moléculas sintéticas que garantem proteção por absorção seletiva da radiação, sendo a maioria deles lipossolúveis e com a função de absorver as radiações ultravioletas de alta energia capazes de causar danos à pele humana. São compostos aromáticos conjugados com um grupo carboxílico, apresentam um grupo doador de elétrons (metoxila ou uma amina) e, algumas vezes, um grupo doador de elétron (amina

ou metoxila) é substituído na posição *orto* ou *para* do anel aromático. Devido à estrutura molecular, possui a capacidade de absorver a radiação em um determinado comprimento de onda, evitando assim, a penetração da radiação sobre a pele e transformando a radiação em calor, ou seja, o filtro atua como um cromóforo absorvendo um fóton de energia e evolui para um estado excitado. Ao retornar para o estado não excitado, ocorre liberação de energia num comprimento de onda mais longo, na região do visível ou infravermelho. (SHAATH *et al.*, 1986; (RIBEIRO, 2010). Determina-se, desta forma, o mecanismo da maioria dos filtros solares existentes no mercado (Figura 4) (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

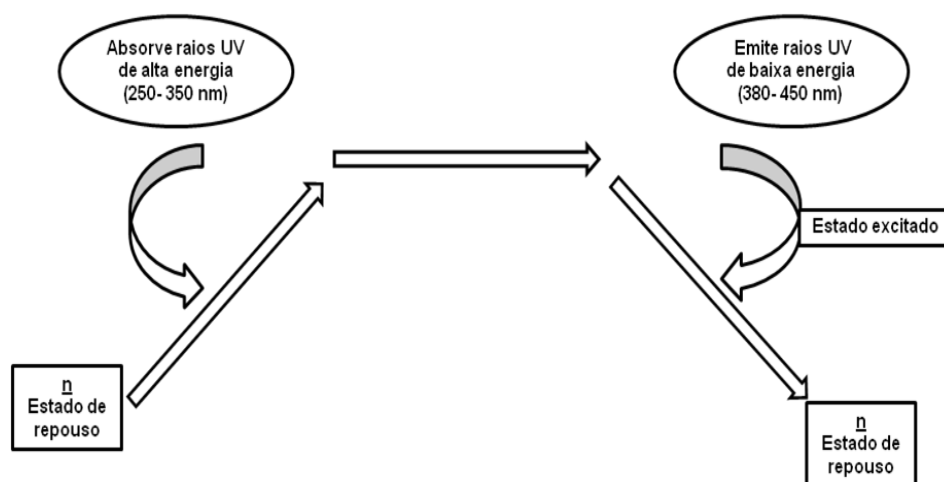


Figura 4: Representação esquemática do processo de absorção da radiação UV pelos filtros orgânicos (SHAATH, 1986).

Os filtros solares usados comercialmente que são capazes de absorver a radiação UVA destacam-se os antranilatos, benzofenonas e avobenzonas. Os filtros capazes de absorver a radiação UVB são os derivados do ácido p-aminobenzóico-(PABA), cinamatos, salicilatos e derivados da cânfora (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Os mais utilizados desta classe são o metilbenzilideno cânfora, a benzofenona-3 e o metoxicinamato de octila, sendo que a família das benzofenonas se destaca devido o seu amplo espectro de absorção e uma boa estabilidade (LEONARDI, 2004).

A benzofenona-3 (BZ3) (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona), também conhecida como oxibenzona ou Eusolex 4360<sup>®</sup> são cetonas aromáticas sólida e de difícil solubilização em água. É utilizada há mais de 30 anos, não

apenas como filtro solar em formulações de uso tópico, mas também na proteção, contra descoloração sofrida pela exposição à luz solar, de algumas preparações cosméticas e ainda podem ser utilizadas como aditivos alimentares, e/ou componentes de embalagens, com a função de proteger e conservar as mesmas (OKEREKE, BARAT, ABDEL-RAHMAN, 1995)

A BZ3 é considerada como um filtro de amplo espectro, ou seja, absorve tanto radiação UVA (320 a 360 nm) como UVB (290 a 320 nm) e uma pequena faixa de UVC (250 a 290 nm), apresentando uma excelente estabilidade. Possui massa molar de 228,2 g/mol, ponto de fusão entre 62 e 64°C. A estrutura química da BZ3 está representada na Figura 5 (OKEREKE, BARAT e ABDEL-RAHMAN, 1995).

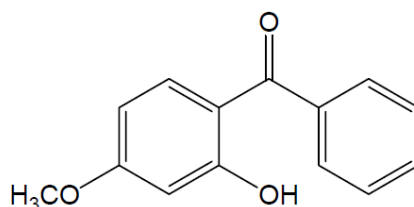


Figura 5: Estrutura química da BZ3 (OKEREKE, BARAT, ABDEL-RAHMAN, 1995)

O deslocamento por ressonância, como nas outras classes de compostos, é acrescida pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições *orto* e/ou *para*. O grupamento carbonila participa deste processo sendo o receptor grupamento de elétron. Esses compostos entram em ressonância mais facilmente, requerendo menor energia quântica para a transição eletrônica, como mostra na figura 6. Considerando-se que a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda ( $E = hc/\lambda$ ), os compostos desta classe irão absorver a energia, com valores correspondentes de comprimento de onda acima de 320 nm (SHAATH, 1997; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; RIBEIRO, 2004).

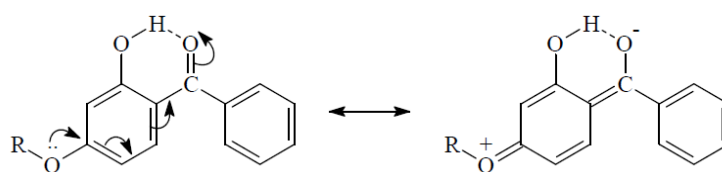


Figura 6: Estrutura de ressonância das benzofenonas (SHAATH, 1997).

A ANVISA aprova o uso da BZ3 como filtro solar em produtos para higiene pessoal, cosméticos e perfumes na concentração máxima de 10% e ressalta que para concentrações maiores que 0,5% deve-se incluir a seguinte advertência na rotulagem: contém oxibenzona (BRASIL, 2006; FLOR, DAVALOS e CORREA, 2007).

Filtros solares quando aplicados topicamente, podem penetrar através da barreira epidérmica, entre estes a BZ3. Estudos relatam que após um período de 12 horas de ensaio, 1% a 2% da quantidade de BZ3 aplicada na pele, pode ser detectada na urina. Embora esta absorção seja considerada pequena, os autores sugerem que este filtro não seja utilizado em grandes áreas da pele, por um período prolongado e repetido de tempo, a menos que nenhuma outra proteção alternativa esteja disponível. (HAYDEN *et al.*, 1997; YESUDIAN e KIM, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Métodos para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)

A RDC 30 de 2012 da ANVISA, apesar de não apresentar nenhuma metodologia, determina que o valor de FPS de um produto seja determinado aplicando a metodologia descrita por outros órgãos regulamentadores como: FDA (Food and Drug Administration), utilizada nos Estados Unidos, COLIPA (European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association), utilizada nos países Europeus; ou Standards Australia Association (SAA), norma australiana utilizada na Austrália e Nova Zelândia (RUVOLO JÚNIOR, 1997; BRASIL, 2012a). As principais diferenças entre as metodologias descritas pelos órgãos acima mencionados são: número de voluntários, produto FPS padrão, progressão de doses e leitura da DME (SCHALKA e REIS, 2011). Apesar dessas diferenças, as metodologias produzem resultados de FPS equivalentes.

A determinação do FPS de formulações é feita por métodos *in vivo*, utilizando 25 indivíduos sadios e com tipos de pele I a III, segundo a escala Fitzpatrick, sendo homens e mulheres com sensibilidade mediana ao UV. O fotoprotetor utilizado como padrão utilizado pelo FDA é uma formulação contendo 8% de salicilato de homomentila, que confere um FPS de 4,47 e a COLIPA preconiza a utilização da fórmula que contém 2,7% de *p*-metoxicinamato de octila (FPS  $3,7 \pm 0,3$ ). Esta padronização foi baseada em

estudos que mostraram que a irregularidade da superfície cutânea, a qual é composta por sulcos e saliências, podem apresentar maior ou menor amplitude a depender da região corpórea. Então, Brown e Diffey concluíram que seria necessária uma quantidade de 2 mg/cm<sup>2</sup> para que o protetor solar propicie o mínimo de 1 mm de cobertura na região do topo das cristas epidérmicas (BROWN e DEFFEY, 1886)

No desenvolvimento do teste, em uma parte das costas de cada indivíduo (0,3m x 0,3m), aplica-se o produto (150 ± 15mg/100 cm<sup>2</sup>) em 4 cm<sup>2</sup>, deixando também uma parte descoberta (superfície teste), separada por uma fita de 1cm de largura. Irradia-se com lâmpada UV de 300W por vinte minutos após a aplicação do produto. Observa-se o tempo de formação do eritema e obtém-se o FPS após a realização dos cálculos (JANOUSEK, 1997; GUIDELINES FOR EVALUATING SUN PRODUCT WATER RESISTANCE, 2005). Porém, apesar deste ser o método aceito para determinar a eficácia fotoprotetora de um produto, existem algumas controvérsias quanto ao método do FPS e sua aplicabilidade, como a medida do eritema, assim este ensaio pode sofrer variação em seus resultados (SCHALKA e REIS, 2011).

Outro aspecto a ser considerado se deve ao fato de que as condições experimentais não traduzem necessariamente a realidade da exposição solar cotidiana, uma vez que a realidade é que a população, geralmente, não aplica essa quantidade de produto. Estudos apontam que a quantidade aplicada do produto é muito abaixo da requerida, a quantidade de protetor solar aplicada pelos usuários varia de 0,39 a 1,3 mg/cm<sup>2</sup>, independentemente de sexo, cor da pele ou faixa etária (WULF, STENDER e LOCK-AUDERSEN, 1997; NEALE, WILLIAMS e GREEN, 2002; FAURSCHOU e WULF, 2007).

A quantidade ideal de produto, que deve ser aplicado 30 minutos antes da exposição ao sol é, em termos gerais, 2,5 a 5,0 mL para o rosto e pescoço, 5,0 a 7,5 mL para braços e ombros, 5,0 a 7,5 mL para o tórax e abdome e 10 a 12,5 mL para as pernas e região superior do pé (KHAN e PRAY, 2009).

#### 2.3.1.1 Teste utilizado para determinação de FPS *in vitro*

Embora o método *in vivo* seja a maneira mais precisa em avaliar um produto fotoprotetor, os resultados obtidos por métodos *in vitro* apresentam uma

boa correlação com as metodologias *in vivo* (SAYRE *et al.*, 1979; VILAR *et al.*, 1992, HEINRICH *et al.*, 2004).

O teste para determinação do FPS *in vitro* é realizado por meio de espectrofotometria na região UV para avaliação de compostos com atividade fotoprotetora e fotoprotetores. Essa técnica baseia-se na medida de transmitância ou absorbância de uma radiação monocromática que atravessa uma solução contendo uma substância absorvente e na relação entre estas medidas e a concentração da espécie absorvente. Essa energia absorvida pela substância em análise provoca a excitação dos elétrons do seu estado fundamental ou normal a estados de maior energia ou estado excitado, este fenômeno é conhecido como transição eletrônica.

Para a determinação do FPS, mede-se a intensidade da luz em comprimentos de onda determinados entre 290 a 320 nm (espectro da região UVB) e depois aplica-se a equação 2, apresentada a seguir (MANSUR, *et al.*, 1986) e ainda a constante  $EE(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda)$  estabelecida por Sayre e colaboradores (1979), tabela 1

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (2)$$

Onde:

FC = fator de correção (igual a 10);  $EE(\lambda)$  = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda  $\lambda$ ;  $I(\lambda)$  = intensidade da luz solar no comprimento de onda  $\lambda$ ;  $Abs(\lambda)$  = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda ( $\lambda$ ).

A técnica de determinação de FPS *in vitro* tem como vantagens, menor custo e a segurança de não precisar de voluntários humanos para o teste, mas, não foi adotada oficialmente até hoje devido às dificuldades técnicas encontradas, como encontrar um substrato adequado que possua todas as características técnicas necessárias, que são:

- Uma boa afinidade dos produtos com o substrato, que simule as características de absorção, reproduzindo fielmente o que ocorre *in vitro*.
- Transparência suficiente a UVB, compatível com a baixa sensibilidade dos métodos espectrofotométricos.



- Aplicação de maneira representativa e correta os fotoprotetores como substrato, na dose preconizada de 2 mg/cm<sup>2</sup>.

A técnica *in vitro*, por espectrofotometria, pode ser utilizada em testes comparativos e orientativos, tendo grande aplicação na previsão do FPS antes de serem realizados os testes em voluntários humanos, reduzindo os riscos de queimaduras aos quais estes indivíduos são submetidos ao executarem o teste (MANSUR *et al.*, 1986)

Tabela 1: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação para cada comprimento de onda.

$\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ )
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
$\Sigma$	1,0000

Fonte: SAYRE *et al.*, 1979

### 2.3.1.2 Teste utilizado para determinação da fotoproteção UVA *in vitro*

O resveratrol (RVS) é um polifenol encontrado em diversos alimentos: casca de uva preta, vinho tinto, amoras, amendoins, entre outros, conferindo proteção contra bactérias, fungos e outros agentes agressores (SARAF e KAUR, 2010). Sendo constituído por dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de metileno (-CH<sub>2</sub>-), essa geometria molecular é a base estrutural de diferentes compostos e permite a formação de isômeros *trans* e *cis* (SOLEAS, DIAMANDIS e GOLDBERG, 1997) (Figura 7).

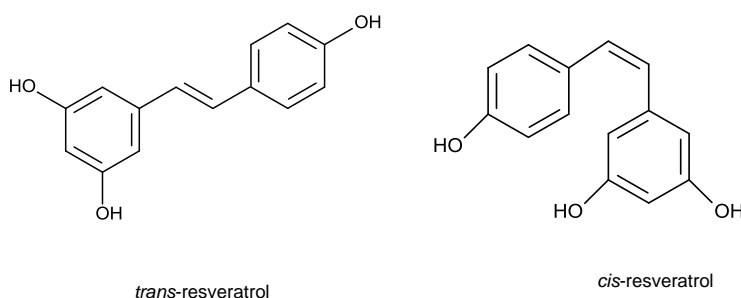


Figura 7: Estrutura dos isômeros: *trans* e *cis* – resveratrol (ORALLO, 2006)

As formas isômeras *trans*- e *cis*-resveratrol são relativamente estáveis, contudo o *cis*- é um pouco mais estável do que a forma *trans*. A conversão do isômero *trans*- em *cis*-resveratrol resulta da exposição à radiação UVA. Quando o *trans*-resveratrol é exposto a radiação UVA, sofre uma degradação, a qual pode ser observada pela queda da sua absorvância durante intervalos de tempo (TRELA e WATERHOUSE, 1996; ORALLO, 2006)

Como o isômero *cis*-resveratrol não é comercializado, o isômero *trans*-resveratrol é viabilizado comercialmente, através da conversão pela radiação UV do isômero *trans*- resveratrol, a forma *cis* é facilmente obtida. Quando o *trans*-resveratrol é exposto a radiação UVA, sofre uma degradação, a qual pode ser observada pela queda da sua absorvância durante intervalos de tempo (TRELA e WATERHOUSE, 1996; ORALLO, 2006; KERRILEE, 2009).

#### **2.4 Avaliação da segurança de ativos utilizados em formulações cosméticas**

Entende-se por segurança de cosméticos a probabilidade deste não provocar danos significativos aos usuários. A avaliação da segurança de produtos cosméticos envolve o conhecimento de diversas áreas, incluindo finalidade de uso do produto pelo consumidor, os métodos de teste e as concentrações máximas permitidas de matérias primas nos produtos (CHORILLI *et al.*, 2007).

A avaliação de risco é o processo que se estima a probabilidade de um determinado agente químico produzir efeitos adversos em uma dada população, sob determinadas condições de exposição. O resultado deste processo, conhecido como caracterização do risco, que orienta as decisões das autoridades regulatórias, destinadas a reduzir ou eliminar o risco de agravos à saúde decorrente a exposição a substâncias químicas. Portanto, para que se possa utilizar com segurança um produto, é preciso submetê-lo a ensaios toxicológicos, este pode ser por meio da avaliação de risco da (s) substância(s) química(s) e/ou produto(s) acabado(s), antes de exposição dos seres humanos a novos produtos químicos que possam provocar irritação cutânea e ocular (CHIARI *et al.*, 2012)

É parte importante de qualquer estudo abrangendo novos produtos químicos e produtos de consumo a realização de investigação toxicológica sobre os mesmos. Até os dias atuais, a avaliação de segurança preliminar de substâncias químicas é amplamente baseada em experiências com animais. Devido às questões políticas e éticas, os testes de toxicidade em animais estão gradativamente sendo substituídos pelos ensaios *in vitro*. Assim os ensaios *in vitro* surgem como alternativas viáveis e promissoras para estudos de toxicidade de substâncias cosméticas (VIRNADELL e MITJANS, 2006; CHORILLI *et al.*, 2007).

Há relatos na literatura sobre a necessidade de avaliar grau de toxicidade de algumas substâncias presentes em cosméticos, mesmo havendo compostos que, por sua vez, apresentam um nível aceitável, como corantes, conservantes e filtros solares (BRASIL, 2002; NOBREGA e ALVES, 2008).

Para tal avaliação, o teste da membrana cório-alantóide do ovo de galinha (HET-CAM) é uma das metodologias recomendadas pela ANVISA. O método corresponde a uma modificação do método descrito por LUEPKE (1985), aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA, na avaliação da segurança de diferentes tipos de produtos cosméticos e farmacêuticos (VINARDELL e GARCÍA, 2000). É um método estimativo de irritação de mucosas, principalmente ocular.

No ensaio *in vitro* de HET-CAM, tem-se por objetivo avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto (produtos solúveis, emulsões, géis e óleos) sobre a membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação (BRASIL, 2012a)

A membrana corioalantóide (CAM) do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada, utilizada pelo embrião do frango para as trocas gasosas através da casca de ovo. Suas características estruturais fazem com que esta seja considerada uma estrutura semelhante a tecidos altamente vascularizados como a conjuntiva, sendo capaz de responder frente a produtos irritantes (NUNES, 2011). O processo para realização do ensaio pode ser apresentado em quatro etapas principais: preparação da membrana corioalantóide, aplicação da amostra, observação da membrana e avaliação das lesões.

Outro teste de toxicidade é o teste de hemólise. Este constitui uma alternativa válida para o teste de irritação ocular de Draize quando se pretende

avaliar os efeitos agudos de formulações e ingrediente contendo tensoativos. Esta metodologia não requer técnicas ou equipamentos especiais e este também tem o mérito de ser rápido e de baixo custo, além de ter boa correlação com metodologias *in vivo*. É, particularmente, válido para o estudo de produtos para uso tópico (VIRNADELL e MITJANS, 2006)

O ensaio de hemólise foi desenvolvido para avaliar as reações celulares iniciais para a irritação causada por alguns produtos químicos. Certas classes de substâncias irritantes e químicas podem danificar as membranas plasmáticas de células levando a desnaturação de vários tipos de proteínas, estudos sustentam a hipótese de que tais reações podem ser correlacionadas com os acontecimentos iniciais de irritação ocular e levam a respostas inflamatórias do tecido e alterações na conformação da proteína, como, por exemplo, a opacificação da córnea após o contacto com produtos químicos irritantes para a mesma (VIRNADELL e MITJANS, 2006).

## 2.5 Flavonoides

Os flavonoides foram descobertos em 1930, pelo ganhador do prêmio Nobel de Medicina, Szent-György, que extraiu a citrina da casca do limão, a qual possuía a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares sanguíneos. Assim, esta classe de produtos naturais foi inicialmente denominada como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C<sub>2</sub>, visto que algumas das substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém, dada a não confirmação destas substâncias como vitaminas, esta classificação foi abandonada em 1950 (MARTÍNEZ-FLÓREZ, GONZÁLEZ-GALLEGO e CULEBRAS, 2002).

O termo flavonoide engloba um grupo de compostos polifenólicos, de baixo peso molecular, amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores de plantas, que apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (Figura 8) (CALIXTO e YUNES; 2001). Os flavonoides são metabólitos secundários que ocorrem amplamente no reino vegetal, sendo atualmente composta por mais de

40000 representantes (HARBONE e WILLIAMS, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).

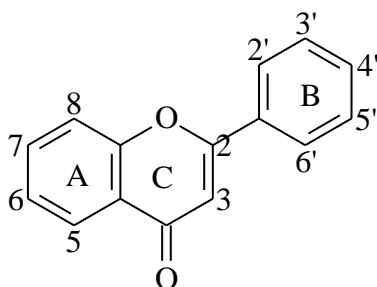
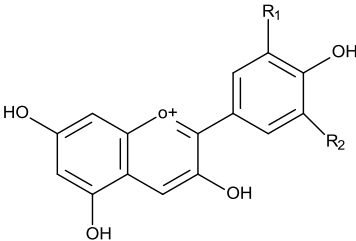
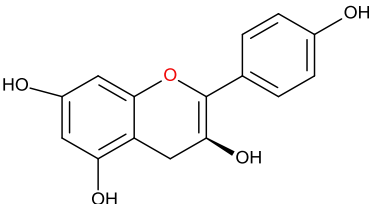
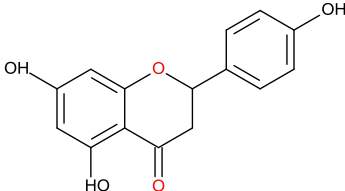
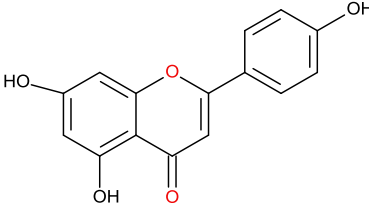
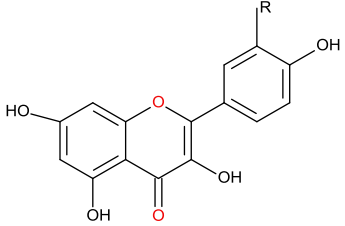
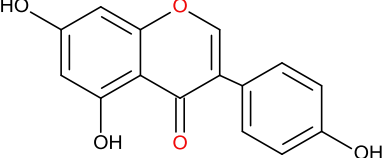


Figura 8: Estrutura química básica dos flavonoides. (SIMÕES *et al.*, 2004)

As classes de flavonoides estão baseadas no carbono de ligação do anel B com o anel C e no padrão de oxidação do anel C. Dentre as muitas classes de flavonoides, as que mais se destacam são: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis (dihidroflavonóis), flavanóis (flavan-3-óis) e antocianidinas, sendo esta subdivisão baseada nas diferenças encontradas no anel C. Outras classes de flavonoides incluem biflavonas, chalconas e auronas (BEECHER, 2003). As principais classes de flavonoides estão descritas na Tabela 2.

Geralmente, os flavonoides ocorrem nas plantas na forma glicosilada. Aumentando a solubilidade em água, o que permite a estocagem nos vacúolos celulares, sendo a glicose o açúcar mais comumente ligado. O termo glicosídeo é aplicado quando na presença de um ou mais grupamentos de açúcares e glucosídeo se este for uma unidade de glucose. Caso possuam substituinte açúcar ligado a oxigênio, são denominados O-heterosídeos e se for ligado ao carbono, C-heterosídeos. Entretanto, esses compostos podem ser encontrados também sob a forma de aglicona. (SIMÕES *et al.*, 2004). A abundância relativa dos flavonoides no reino vegetal, a especificidade em algumas espécies e a relativa estabilidade e facilidade de identificação, fazem desse grupo um marcador quimiotaxonômico (SIMÕES *et al.*, 2004; IGNAT, VOLF e POPA, 2011)

Tabela 2: Principais classes de flavonoides		
Classe	Exemplo	Estrutura Básica
Antocianinas	Cianidina Delfinidina Peonidina.	
Flavanas (mono, bi e triflavans)	Catequina; Epicatequina Luteoforol Procianidina Theaflavina	
Flavanonas	Hesperidina Naringenina	
Flavonas	Apigenina Luteolina Diosmetina Tangeretina Nobiletina	
Flavonóis	Quercetina Rutina Miracetina Kaempherol	
Isoflavonoides	Daidzeína Genisteína.	

(Fonte: HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008)

O espectro de absorção UV da aglicona, em geral, apresenta dois máximos de absorção, a banda I, entre 240-280 nm (corresponde ao anel A) e a banda II entre 300-550 nm (corresponde ao anel C). Quando o máximo é observado na banda I geralmente a estrutura corresponde a dihidroflavonas, dihidroflavonóis ou isoflavonas. Quando o máximo é observado na banda II

geralmente são chalconas, auronas ou antocianinas (Tabela 3). Mudanças no padrão de substituição também geram alteração no espectro de absorção ultravioleta. A posição precisa e intensidade das bandas fornece informações sobre a natureza do flavonoide e seu padrão de oxigenação (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

As propriedades biológicas dos flavonoides varia desde a proteção contra patógenos como vírus, fungos, insetos e bactérias, contribuição com a pigmentação, pelo controle de hormônios vegetais e de enzimas, atividade antioxidante até no auxílio na proteção contra a radiação ultravioleta (SIMÕES *et al.*, 2004; IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

Apesar da variedade de funções biológicas, o que chama a atenção para os flavonoides é sua ampla utilização em suplementos alimentares, em produtos cosméticos, apresentando destaque, as isoflavonas da soja, as catequinas do chá verde (principalmente a epigalocatequina-3-galato), a silimarina (que é uma mistura de três flavonoides principais: silibina, silidianina e silicristina da planta *Silybum marianum*) e o resveratrol (R V S) extraído de casca de *Vitis vinifera* (DRAELOS, 2006).

Tabela 3: Absorção máxima UV dos compostos fenólicos

Classe de Compostos*	Máxima absorção/nm	
	Banda II	Banda I
Fenóis simples	266-295	-
Ácidos Fenólicos	235-305	-
Ácidos hidroxicinâmicos	227-245, 310-332	-
Hidroxicumarinas	210, 250-260, 280-303	312-351
<i>Flavonoides</i>		
Flavonas, Biflavonas	250-280	310-350
Isoflavonas	245-275	310-330
Flavonols	250-280	350-385
Flavanonas	275-295	310-330
Chalconas	240-260	365-390
Auronas	240-270	390-430
Antocianinas	265-275	465-560

\*Solvente usualmente utilizado é o metanol, com exceção das antocianinas que utiliza metanol acidificado. (Fonte: ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

### 2.5.1 Flavonoides: atividades antioxidante e fotoprotetora

A atividade antioxidante de um flavonoide depende de sua estrutura e de seus substituintes nos anéis B e C (SIMÕES *et al.*, 2004), sendo que os maiores determinantes para esta atividade são: a presença de um grupo catecol no anel B, o que aumenta a propriedade doadora de elétrons e a presença de ligação dupla nas posições 2 e 3 do anel C, conjugada com o grupo 4-oxo, formando uma enona, que é responsável pela deslocalização de elétrons. Estes e outros fatores explicam as diferenças de atividade antioxidante entre as diferentes classes de flavonoides (PIETTA, 2000).

Assim, esta diversidade estrutural permite aos flavonoides atuarem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, neutralizadores do oxigênio singlete e quelando metais que possam iniciar ou propagar as reações em cadeia. Contudo, o mecanismo de ação antioxidante mais estudado dos flavonoides é a captação de RL, propriedade esta que depende da estrutura química da molécula em relação à capacidade doadora de elétrons e a estabilização do radical formado através da deslocalização do elétron desemparelhado (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988, DURANGO, 2008; PIETTA, 2000).

Porém alguns autores consideram o mecanismo de ação antioxidante dos flavonoides mais complexo por duas razões: existem, no mínimo, seis possíveis diferentes mecanismos antioxidantes dos flavonoides. Em segundo lugar, os efeitos sequestrantes dos radicais livres não são necessariamente uma ação bioquímica única, esta ação pode envolver mais de um tipo de reação dentro do processo oxidante. Neste sentido, existem três diferentes estágios de oxidação mediada por radicais dos lipídios membranares (Figura 9).



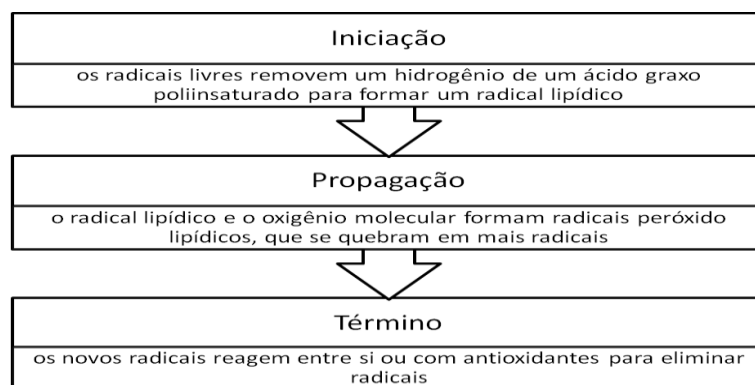


Figura 9: Estágios de oxidação dos lipídios membranares mediada pelos radicais livres.

Os flavonoides podem atuar em qualquer uma destas fases bloqueando a iniciação e/ou sequestrando radicais primários, como o superóxido. Os flavonoides também podem reagir com os radicais peróxidos para retardar a propagação. Além disso, os radicais intermediários flavonoídicos, formados após a reação com radicais peróxidos, podem reagir com os outros radicais formados durante a propagação. Isso acelera o processo de término.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os flavonoides inibem enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, como a xantina oxidase (HANASAKI, OGAWA e FUKUI, 1994) e a proteína kinase-C (URSINI *et al.*, 1994). Além disso, inibem as enzimas ciclooxygenase, lipoxigenase, glutathione S-transferase e NADH oxidase, as quais também estão envolvidas na produção de RL (KORKINA e AFANAS'EV, 1997; BROWN *et al.*, 1998). Alguns flavonoides atuam quelando metais que desempenham um papel importante no metabolismo do oxigênio, tais como ferro e cobre, os quais aumentam a formação de RL, atuando na redução do peróxido de hidrogênio com a geração de radical hidroxil e na oxidação da lipoproteína de alta-densidade (PIETTA, 2000).

Dentre os métodos existentes para avaliação do potencial antioxidante de diversos extratos de plantas brasileiras, método de sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) é utilizado com bastante frequência por ser rápido, prático e seguro (SANTOS *et al.*, 2009; GREGORIS *et al.*, 2011). A metodologia foi originalmente desenvolvida por Blois (1958) e baseia-se na redução do radical DPPH• pelo antioxidante das amostras. A solução etanólica de DPPH•, que absorve no comprimento de onda próximo de 518nm, possui

coloração violeta, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração, para solução amarela, frente às moléculas antioxidantes testadas (Figura 10) (BONDET, MARCAWILLIAMS e BERSSET, 1997; FAUCONNEAU *et al.*, 1997; DI MAMBRO, MARQUELE e FONSECA, 2005; GOUVÊA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009).

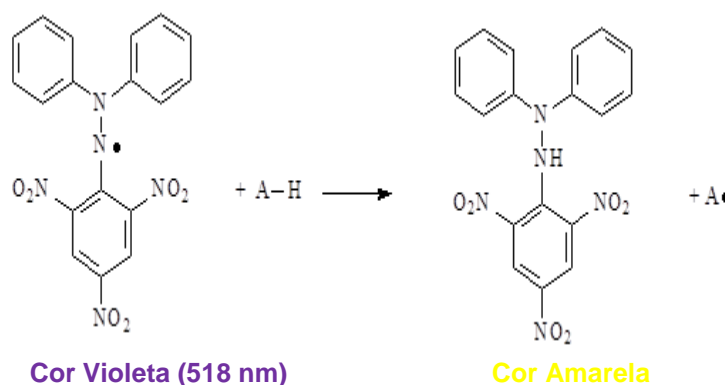


Figura 10: Redução do DPPH• por um antioxidante (RUFINO *et al.*, 2007)

Quanto mais clara torna-se a solução, mais forte o potencial antioxidante da amostra analisada. Deste modo, torna-se possível avaliar a captura dos radicais livres DPPH• pelo suposto antioxidante evidencia-se que compostos ativos presentes nos extratos vegetais atuam como doadores elétrons ao radical, passando de uma solução violeta para uma amarela que absorve a radiação luminosa a 518 nm (KALOGEROPOULOS *et al.*, 2006; RUFINO *et al.*, 2007; DE ALMEIDA MELO, *et al.*, 2008)

Os resultados da AA em espécies vegetais são expressos, comumente, por meio do  $CE_{50}$ , o qual expressa a concentração de substrato que leva a redução de cerca de 50% do DPPH•, independentemente da concentração da amostra (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999). Contudo, estudos experimentais têm sinalizado uma relação não linear entre a concentração de antioxidante e atividade sequestradora de radicais livres, o que compromete a medição da  $CE_{50}$ , quanto mais baixo o valor para a  $CE_{50}$ , mais eficiente a capacidade antioxidante da substância em análise. Esse parâmetro só deve ser calculado caso haja alguma inibição superior a 70%, caso contrário pode haver um erro estatístico significativo e os resultados não são confiáveis (LOCATELLI *et al.*, 2008).

Outra atividade biológica atribuída aos flavonoides é a fotoproteção. A escolha de novos ativos fotoprotetores envolve principalmente a capacidade de absorção da luz ultravioleta pelos cromóforos de cada molécula. Existe uma grande quantidade de produtos naturais que poderiam preencher estes requisitos, tais como compostos da classe dos flavonoides (GUARATINI *et al.*, 2009).

Os mecanismos relacionados à capacidade fotoprotetora de flavonoides baseiam-se em atividades decorrentes de sua estrutura química. A capacidade de absorção na região do ultravioleta, a inibição da geração de espécies reativas de oxigênio e caso estas sejam formadas têm capacidade para reduzi-las, e também capacidade de mediar cascatas de sinalização de crescimento e diferenciação celular (GONZÁLEZ, FERNADES-LORENTE e GILABERTE-CALZADA, 2008).

A procura por ativos de origem vegetal ricos em substâncias de núcleo flavonoide tornou-se uma vertente em fotoproteção, visto que estes constituintes são formados por um núcleo benzopirano ou cromano, unido a anel aromático, caracterizado por um esqueleto C6-C3-C6, cuja semelhança estrutural aos filtros químicos torna possível a absorção de radiação na região do ultravioleta (DE PAOLA e RIBEIRO, 2008; MUNHOZ *et al.*, 2012; AGATI *et al.*, 2013).

A absorção na região do ultravioleta é uma das premissas para utilização de flavonoides como fotoprotetores, devido ao espectro de absorção nas regiões do UVB e UVA (DORNAS *et al.*, 2007). Devido à semelhança estrutural dos flavonoides com os filtros químicos, adicionalmente às suas propriedades antioxidantes e a similaridade entre seus espectros de absorção na região da radiação UV, tais compostos de origem natural são passíveis de exercer atividade fotoprotetora (BABY *et al.*, 2008).

Autores descrevem que o aumento na produção de flavonoides é uma resposta fotoprotetora da planta, a qual ocorre devido à absorção da radiação eletromagnética na faixa do UV e, dessa maneira, apresentam um papel importante na defesa das plantas contra esta radiação (MARKHAN, RYAN e BLOOR, 1998; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Para algumas espécies, a penetração da radiação na lâmina foliar é atenuada pelas camadas cuticulares e pelo acúmulo de substâncias que absorvem a radiação. Estas substâncias alteram as propriedades ópticas das folhas, atenuando os efeitos maléficis da

radiação UVB, ao absorver ou dissipar energia solar (POULSON, BOEGER e DONAHUE, 2006).

Outro estudo, nos qual se induziu um aumento a exposição a radiação UVB, em folhas de cevada, foi observado um aumento dos níveis de flavona e, conseqüentemente, reduziu os danos ao DNA causados pela UVB. Ainda no mesmo estudo folhas com deficiência de flavonas não conseguiram proteger o DNA, ocasionando maiores danos celulares (SCHMITZ-HOENER e WEISSENBOCK, 2003), pois o DNA é provavelmente o cromóforo mais importante da pele, desde que as lesões do DNA induidas pela radiação UV inibem o metabolismo celular. Os dois mecanismos pelos quais os raios UV podem lesionar o DNA são a excitação direta das moléculas, principalmente na região do UVB, e a formação de RL, predominantemente na região da UVA. Os danos oxidativos, provavelmente, são intermediados pela melanina. Células previamente irradiadas com baixa dose de UVA e, em seguida, com alta dose apresentam duas vezes mais danos oxidativos do que aquelas sem pré-irradiação (SOUZA, FISCHER e SOUZA, 2004)

Em virtude destas atividades, extratos e óleos de plantas têm sido utilizados em cosméticos como filtros solares devido à ação fotoprotetora. Por apresentarem moléculas com estruturas semelhantes às dos filtros químicos sintéticos. Os extratos vegetais por constituírem de uma mistura de diversos flavonoides na forma livre e heterosídeos, podem apresentar vantagens em relação a um flavonoide isolado, pois proporcionam um amplo espectro de ação antirradicalar, atuando em diferentes espécies reativas de oxigênio (BALOGH *et al.*, 2011). Podem ser citados: *Passiflora incarnata*, rutina (BABY *et al.*, 2008), *Culcitium reflexum* (BONINA *et al.*, 2002), *Calendula officinalis* (MISHRA, MISHRA e CHATTOPADHYAY, 2012), própolis (HU e WANG, 1998; FERRARI, 2002; GREGORIS *et al.*, 2011) pistache (MARTORANA *et al.*, 2013). *Aloe vera*, *Matricaria chamomilla*, *Hamamelis virginiana*, *Crocus sativus* (HU e WANG, 1998; GREGORIS *et al.*, 2011).

### 2.5.2 Quercetina

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) (Figura 11) pertencente à classe dos flavonols, é o flavonoide encontrado em maior quantidade nos

alimentos, é lipossolúvel e pode ter açúcares ligados à molécula (FORMICA e REGELSON, 1995; SKIBOLA e SMITH, 2000).

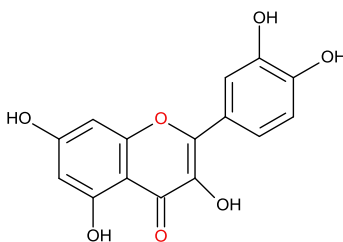


Figura 11: Estrutura química da quercetina (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008)

Este importante flavonoide apresenta diversas atividades biológicas, como ação anti-hipertensiva, antiaterogênica, antiarrítmica, antialérgica, antineoplásica, antiagregante plaquetária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (FORMICA e REGELSON, 1995; MOON *et al.*, 2003).

As propriedades antioxidantes da quercetina devem-se principalmente à sua capacidade em eliminar radicais livres como hidroxil, peroxila e ânions superóxido e quelar metais de transição como Fe e Cu, que quando livres aumentam o potencial de formação das EROs pela reação de Fenton (CHOI; CHEE e LEE, 2003). Diversas pesquisas demonstraram que a quercetina inibe de forma efetiva a peroxidação lipídica por meio do sequestro de radicais livres e/ou quelando metais de transição. Observaram ainda aumento na atividade de enzimas antioxidantes como glutathiona reduzida, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase no fígado, confirmando a ação antioxidante deste flavonoide (MAITI *et al.*, 2005).

Três componentes estruturais revelaram ter papel importante na relação estrutura x atividade da quercetina, são eles: (i) presença do grupo catecol no anel B, o qual proporciona a formação de radicais fenoxila mais estáveis após a doação do radical hidrogênio; (ii) a dupla ligação entre os C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> em conjugação com o grupo 4-carbonil, que permite o deslocamento de um elétron do radical fenoxil no anel B para o anel C; e finalmente, (iii) a presença do grupo 3-hidroxila combinação com a dupla ligação entre os C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, o que aumenta a estabilização por ressonância dos elétrons deslocados sobre a

molécula (BONINA *et al.*, 1996; PIETTA, 2000; SILVA *et al.*, 2002; SUGIHARA *et al.*, 1999).

Foram evidenciados também os efeitos benéficos do uso tópico da quercetina na diminuição dos danos oxidativos causados pela radiação UV na pele (CASAGRANDE *et al.*, 2006; SAIJA *et al.*, 1998). No entanto, o uso de outras estratégias capazes de promover aumento na penetração da quercetina pela pele deve ser considerado para otimizar sua ação (SAIJA *et al.*, 1998).

O mecanismo de proteção da QUE contra os danos causados pela radiação UV dar-se por depleção da glutathiona peroxidase (GSH). Seja por eliminação da atividade dos RL ou por diminuição da produção dos mesmos através de agentes quelantes do ferro. Além disso, os efeitos protetores deste flavonoide podem ser também devido a efeitos antioxidantes mediados por aumento enzimático e não enzimático celular, talvez por estimular as estruturas citoplasmáticas envolvidas na ressíntese de GSH. Portanto, os efeitos de protetores da quercetina acontecem em diversos níveis: eliminação radical, agentes quelantes de ferro e modulação de respostas antioxidantes celulares (RAMOS *et al.*, 2008).

## **2.6 O gênero *Marcetia***

O semiárido estende-se por aproximadamente 1 milhão de Km<sup>2</sup>, abrangendo a grande parte dos estados do nordeste brasileiro: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e ainda o norte do estado de Minas Gerais. No Nordeste corresponde mais da metade da sua área e cerca de 10% do território nacional. O clima predominante da região semiárida é o tropical seco, ocorrendo pequenos períodos de chuvas sazonais, o que faz com que este seja caracterizado pelas irregularidades no regime pluviométrico, definido pela escassez, irregularidade, temperatura elevada, logo a vegetação nativa é extremamente adaptada às condições de semiaridez da região (ROMERO, 2002; IMSAR, 2006; GIULIETTI, 2006).

Entre as diversas famílias vegetais encontradas no semiárido baiano, a família Melastomataceae caracterizada por ser uma família endêmica. Compreende 4.570 espécies distribuídas, em aproximadamente, 160 gêneros

com características de arbustos, trepadeiras lenhosas, ervas ou árvores. Estas espécies ocorrem em regiões tropicais de florestas de altitude e savanas ao longo do globo terrestre, principalmente em regiões do novo mundo (RENNER, 1993). No Brasil, é a sexta maior família entre as angiospermas, com mais de 1.300 espécies presentes em florestas, cerrados e campos rupestres do país (GARDONI, ISAIAS e VALE, 2007; GOLDENBERG, BAUMGRATZ e SOUZA, 2012).

É descrito na literatura o uso medicinal de espécies da família como antiviral (DÈVÈHAT *et al*, 2002; CUNHA *et al*, 2008). No tratamento de erisipela, vermes intestinais, leucorréia, ulcerações, palpitações, males dos rins e bexiga, escabiose, dermatoses, eupepsia, reumatismo, resfriado, febre, infecções vaginais, hematúria, insônia e analgésica (CUNHA *et al*, 2003b; SPESSOTO *et al*, 2003; VASCONCELOS *et al*, 2006), tripanocidal (CUNHA *et al*, 2003a), anticolinesterásica (NIÑO *et al*, 2006), anti-inflamatória (VASCONCELOS *et al*, 2006), protetora da mucosa gástrica (ANDREO *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2008) e mutagênica (SANTOS *et al*, 2008). E investigações recentes comprovaram atividade antibacteriana (LEITE *et al.*, 2012)

Estudos fitoquímicos da família Melastomataceae identificaram diferentes classes de metabólitos secundários, tais como antocianinas (LOWRY, 1976; TERAHARA *et al.*, 1993), taninos hidrolisáveis (YOSHIDA *et al.*, 1999; YOSHIDA, ITO e ISAZA, 2005), flavonoides (BONFIM -PATRICIO *et al.*, 2002; MIMURA, SALATINO e SALATINO, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008), triterpenos e esteróides (CREVELIN *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008). A família demonstra uma clara tendência a síntese de flavonas e flavonóis poli-hidroxilados; nas Melastomataceae também foram identificadas duas 3-metóxi-flavonas, penduletina e isocanferídeo (BONFIM-PATRICIO *et al.*, 2002).

Dentre os vários gêneros pertencentes à família Melastomataceae, o gênero *Marcetia*, que é constituído de 28 espécies vegetais e se caracteriza por sua tendência ao endemismo, pois, aproximadamente 96 % das espécies deste gênero são endêmicas do Brasil (MARTINS, 1989). A maioria, cerca de 80%, cresce em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (MG e BA) e principalmente na Chapada Diamantina (BA) (SANTOS, 2005).

O gênero *Marcetia*, ao qual pertencem as espécies *M. taxifolia* (A. St.-Hil.) (Figura 12), *M. macrophylla* Wurdacke (Figura 13) e *M. latifolia* Naudin

DC.(Figura 14) tem forte preferência por habitats rupestres, sendo que 95% das espécies manifestam clara tendência em apresentar distribuições endêmicas no Brasil. O campo rupestre, tipo vegetacional o qual o gênero habita, é situado nas áreas mais elevadas em uma matriz de savana, geralmente a partir de 900 m de altitude (NEVES e CONCEIÇÃO, 2010), sua flora está submetida a condições de estresse que predispõem a produção de metabólitos secundários, estes não são necessariamente essenciais para o organismo produtor, mas garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie em seu ecossistema (SIMÕES *et al.*, 2004) e podem muitas vezes ser extraídos e utilizados pelos seres humanos para seu benefício. A distribuição do gênero *Marcetia* é endêmica na Bahia, podendo ser encontrado principalmente na Chapada Diamantina, nas cidades de Andaraí, Mucugê, Lençóis e Palmeiras, em campos rupestres situados entre 700-1000 m de altitude, raramente atingindo altitudes mais elevadas. Esta espécie floresce e frutifica principalmente de novembro a março, mas esporadicamente ocorre em outros meses do ano (MARTINS, 1989).



Figura 12: *M. taxifolia* (A. St.-Hil.) DC

*Marcetia macrophylla* Wurdack é um arbusto ereto, muito ramificado, com tamanho variando de 0,5 a 3m de altura. É uma das maiores espécies do gênero, pois as demais possuem altura média de 0,8 m e raramente ultrapassam 2m. Pode ser reconhecida pela pilosidade densamente serícea, formando faixas ao longo das nervuras principais na face inferior das folhas, e pela presença de



pelos glandulares esparsos, dispostos externamente na metade superior da pétala.



Figura 13: *M. macrophylla* Wurdack



Figura 14: *M. latifolia* Naudin

Até o presente momento existem poucos relatos na literatura sobre a composição química do gênero *Marcetia*, os poucos relatos descrevem a presença majoritária de triterpenos em *M. latifolia*, *M. taxifolia* e a presença de hidrocarbonetos em *M. macrophylla* em análises dos extratos hexânicos por cromatografia gasosa (LEITE *et al.*, 2009).

A análise por CLAE-DAD dos extratos acetato de etila e metanólico revelaram a presença de flavonoides nos extratos de *M. taxifolia*, *M. macrophylla* e *M. latifolia*, e, de um modo geral os flavonoides presentes nestes extratos pertencem à classe das flavonas e flavonóis devido à forte absorção entre 342 a 359 nm (banda I), tais como hesperidina, naringina, quercetina, rutina. E na *M. latifolia* foi identificado o flavonoide a calicopterina, que não foi encontrado em

nenhuma outra espécie da família (LEITE *et al.*, 2012). Em mais recente estudo realizado na espécie *M. macrophylla*, foram identificadas por Espectrometria de Massas (EM) as quercetina glicosiladas: quercetina-3-O-hexosídeo, quercetina-3-O-pentosídeo e quercetina-3-O-desoxihexosídeo (DAMASCENO, 2014).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Coleta do material vegetal: *Marcetia* ssp.

As espécies *Marcetia taxifolia* (A.St.-Hil.) DC, *M. macrophylla* Wurdack e *M. latifolia* Naudin foram coletada em Rio de Contas (Chapada Diamantina, Bahia, Brasil) no mês de julho. Uma exsicata de cada espécie foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana sob o número HUEFS 191053, HUEFS 191055 e HUEFS 191054, respectivamente.

### 3.2 Obtenção do extrato etanólico bruto de *Marcetia* ssp.

As partes aéreas (folhas, caules e inflorescências) de cada uma das espécies foram separadamente estabilizadas por meio de secagem em estufa com ventilação forçada a 45-55 °C por 72 h e, posteriormente, moídos em macromoinho de facas (Solab<sup>®</sup>). O pó foi submetido à maceração a frio com etanol P.A. (EtOH PA) durante 72h. Os extratos foram filtrados a vácuo utilizando funil de Buchner e papel Watmann nº 1, posteriormente, tiveram seu volume reduzido a 40% do volume inicial em rotoevaporador. Em seguida cada extrato foi particionado com hexano para extração do material graxo resultando no extrato etanólico de cada espécie (Figura 15).

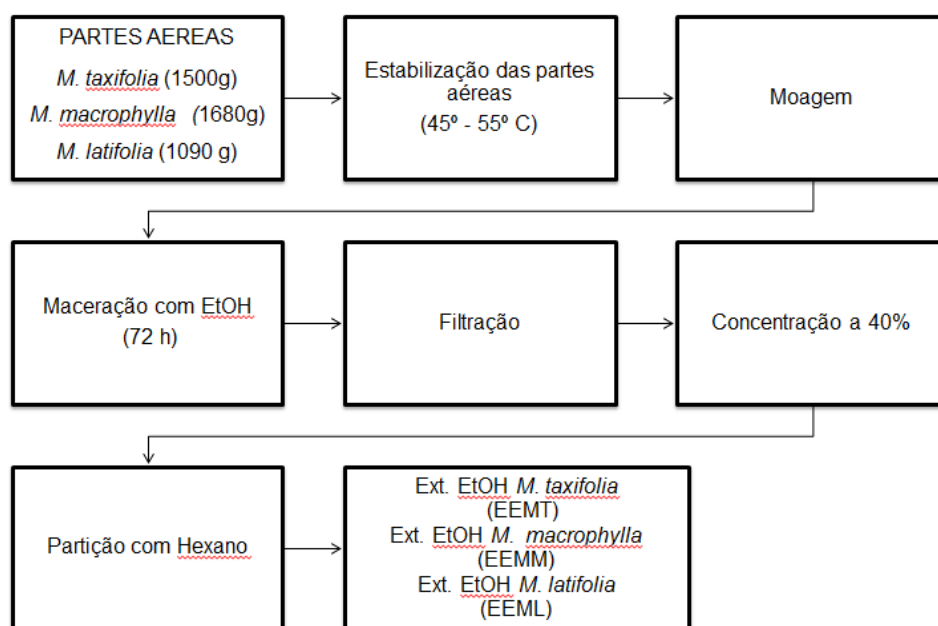


Figura 15: Obtenção dos extratos etanólicos de *Marcetia* ssp

Os extratos obtidos foram submetidos a ensaios para identificação e quantificação dos constituintes químicos e avaliação das propriedades biológicas. O fluxograma a seguir (Figura 16) ilustra, de forma resumida, as etapas da pesquisa experimental desenvolvidas no presente estudo, as quais serão descritas posteriormente.

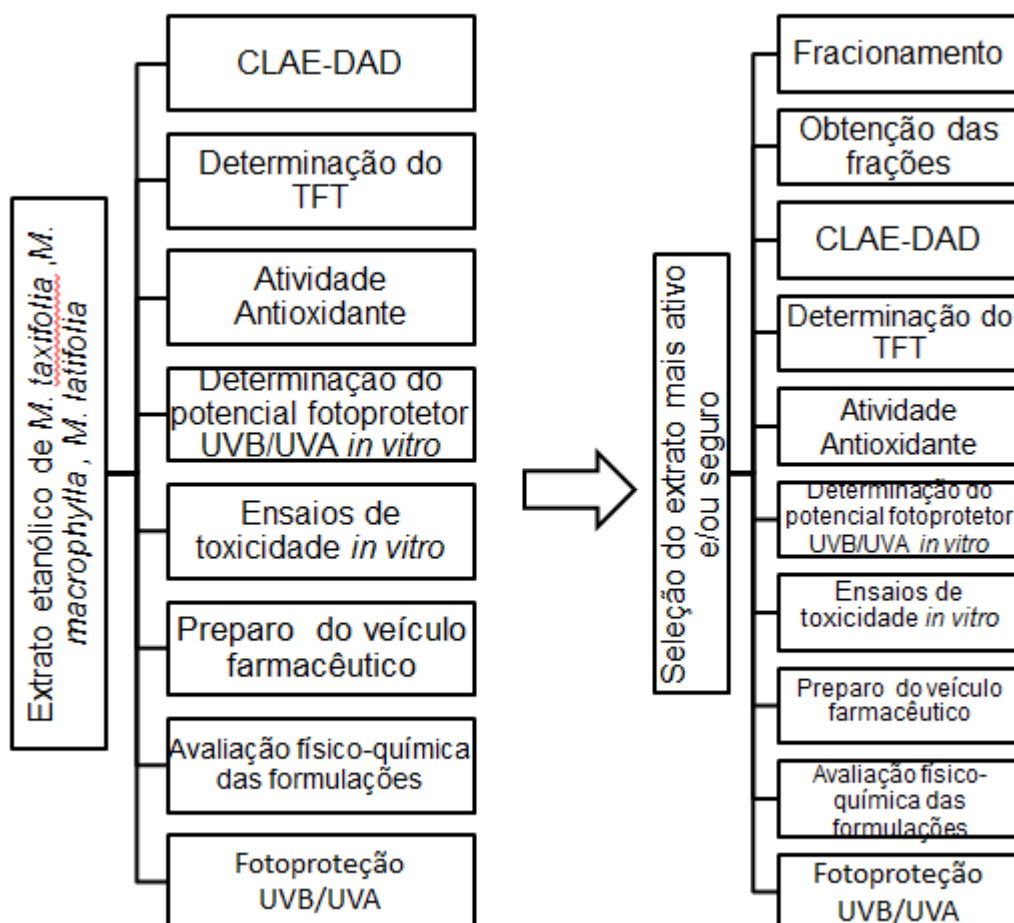


Figura 16: Fluxograma metodológico da pesquisa experimental

### 3.3 Fracionamento do extrato etanólico com melhor potencial para uso em fitocosmética

O fracionamento do extrato etanólico de *M. latifolia* (EEML) foi feito em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 200-400 mesh (60Å) e sistema de eluente na ordem crescente de polaridade: Hex, AcOEt, EtOH e H<sub>2</sub>O. Este procedimento resultou em 39 frações, que foram reunidas em 05 frações

### 3.4 Cromatografia a líquidos de alta eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD)

As amostras EEML, EEMT, EEMM e as frações do EEML para preparo das amostras foram diluídas em Hex e filtradas em cartucho SPE a concentração de 1 mg/mL. Para preparo das amostras dos padrões quercetina e calicopterina ambas nas concentrações de 0,1 mg/mL, as quais também foram diluídas e filtradas.

As amostras foram analisadas no equipamento EZCHROM ELITE<sup>®</sup> e bomba VRW HITACHI L-2130. A separação cromatográfica foi desenvolvida em coluna Purospher Star (RP8e (25 x 4 mm, 5 mm ID) da Merck<sup>®</sup>. A otimização das condições de separação em sistema de gradiente foi obtida pela aplicação de uma fase móvel H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (A) e MeOH (B). O gradiente da fase móvel foi desenvolvido em A (75–0 %) e B (25–100 %) por 20 min, 100 % B por 4 min, 75 % A and 25 % B por 10 min.

O fluxo foi de 1 mL/min, injetando-se 20 µL de cada amostra e temperatura do forno foi mantido a 30°C. A análise foi monitorada em  $\lambda=360$  nm. A identificação foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e espectros de absorbância no UV correspondente com padrão quercetina.

#### 3.4.1 Identificação de flavonoides

A identificação da quercetina e calicopterina foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção (Tr) e espectro de absorbância no UV em relação aos respectivos padrões quercetina (Tr: 14,33 min) (APÊNDICE A), e calicopterina (5,4'-dihidroxi-3,6,7,8-tetrametoxiflavona) (Tr: 18,48 min) (APÊNDICE B) quando analisadas por CLAE-DAD. Assim, esta metodologia foi aplicada aos extratos de *Marsetia* ssp e frações de *M. latifolia*.

### 3.4.2 Quantificação dos flavonoides quercetina e calicopterina

#### 3.4.2.1 Validação do método analítico

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa foi efetuado o teste de ajuste do modelo linear, pois um coeficiente de correlação maior que 0,98 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (BRASIL, 2006).

Neste estudo, para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foi gerada uma curva de calibração com sete pontos. Para a construção da curva de calibração para a quantificação da quercetina (QUE) nas amostras foram injetados 20 µL de cada solução nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 mg/mL (APÊNDICE C).

Para o parâmetro linearidade da quercetina obteve-se uma equação igual a  $y = 30000000x - 110145$  e  $r^2$  foi de 0,9987 (APÊNDICE D) demonstrando que há uma correlação linear entre as variáveis X e Y (BRASIL, 2003).

A quantificação da calicopterina nas amostras definiu-se através de uma curva de calibração com oito pontos. Utilizando-se soluções nas concentrações de 0,01 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,075 mg/mL; 0,01 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,2 mg/mL (APÊNDICE E).

Para o parâmetro linearidade da calicopterina obteve-se a equação  $y = 70000000x + 86268$ . A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados demonstrou um coeficiente de correlação muito próximo da unidade (0,9972) (APÊNDICE F).

Ainda para validação do método analítico foram determinados o desvio padrão relativo das amostras, precisão (Equação 3), exatidão (Equação 4) e os limites de detecção (LD) (Equação 5) e limite de quantificação (LQ) (Equação 6). Todas as amostras foram injetadas em triplicata.

$$\text{DPR} = \frac{\delta \times 10}{\text{CMD}} \quad (3)$$

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{LD} = \frac{\delta \times 3}{\text{IC}} \quad (5)$$

$$\text{LQ} = \frac{\delta \times 10}{\text{IC}} \quad (6)$$

Onde: CMD: concentração média determinada, CME: concentração média experimental, CT: concentração teórica,  $\delta$ : desvio padrão e IC: inclinação da reta.

Assim, estabelecidos os parâmetros que permitiram validar a metodologia aplicada, assegurou-se a quantificação da quercetina (APÊNDICE G) e da calicóptera (APÊNDICE H) nas amostras analisadas.

### 3.5 Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT)

O TFT dos extratos foi determinado pelo método da reação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), que ao se complexar com os flavonoides absorvem a energia UV em 425nm (REZENDE, 2010, KALITA *et al.*, 2013). Foi realizada uma curva analítica com o padrão quercetina nas concentrações de 20, 40, 80, 160, 320 e 640  $\mu\text{g/mL}$  (APÊNDICE I), seguida de regressão linear, onde os valores são relatados em micrograma de quercetina por micrograma de extrato. O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados gerou a equação descrita, assim como seu coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) médio que obteve valor de 0,9937, bastante próximo de 1, conferindo linearidade ao método (MENSOR *et al.*, 2001).



Foram preparadas uma solução de  $\text{AlCl}_3$  (1%) e acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ ) a 1M. Para as amostras teste, foram preparadas soluções etanólicas na concentração 2mg/mL.

Em seguida foram adicionados, individualmente, a balões volumétricos 2 mL as soluções de QUE; 0,1 mL de solução  $\text{AlCl}_3$ ; 0,1 mL de solução  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ ; 2,8 mL de água destilada e , finalmente, o balão volumétrico teve seu volume completado com EtOH. O mesmo procedimento foi aplicado para as amostras teste. O balão volumetrico como branco foi preparado sem a solução de  $\text{AlCl}_3$ .

As amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos, posteriormente as amostras foram lidas 415 nm em espectrofotômetro modelo Evolution 220 UV/Vis (Thermo Scientific®) (GURSOY, *et al.*, 2009)

A absorvância das soluções foi determinada subtraindo do valor da absorbância da solução de QUE ao valor de absorbância do branco. A concentração de flavonoides totais foi calculada a partir construção da curva de calibração da quercetina (1 mg/mL). Os dados foram expressos como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de quercetina (QUE) por 10 mg de peso de extrato etanólico.

### 3.6 Determinação da atividade antioxidante (AA)

Para a avaliação da AA foi preparada uma solução etanólica de DPPH• (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 2,5 mL de cada extrato etanólico de *Marcetia* ssp e das frações de *M. latifolia* em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram adicionados a 1 mL de solução de DPPH•. Foram utilizados como controle positivo o BHT e ácido ascórbico nas mesmas mesmas condições da amostras investigadas. Foi feito um branco para cada concentração de amostra ou padrão testado, substituindo a solução de DPPH• por etanol. As soluções reagentes foram incubadas no escuro e a temperatura ambiente (25°C) durante 30 min para que a reação ocorresse. A redução do radical livre foi medida através da leitura da absorbância a 518 nm em espectrofotômetro da marca Evolution 220 UV/Vis (Thermo Scientific®) e os resultados foram expressos em % de Sequestro do Radical Livre (%SRL) de acordo com a equação (7):

$$\% \text{ SRL} = 100 - \{[(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{controle}}\} \quad (7)$$

Onde,

$Abs_{amostra}$  - Absorbância da amostra

$Abs_{controle}$  - Absorbância do controle

Após o equilíbrio da reação mediu-se, ainda, a  $CE_{50}$ , que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% do DPPH• pelo Graphpad Prism®, versão 5.0 (SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999).. A cinética da reação foi calculada por regressão linear, obtendo-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a equação da reta ( $y = ax + b$ ).

### 3.7 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)

Para a determinação do FPS das amostras foi utilizado o método *in vitro* espectrofotométrico na região do UV desenvolvido por Mansur e colaboradores (1986) (MANSUR *et al.*, 1986; GARCIA e SANTOS, 1990; SANTOS *et al.*, 1999; BARTH, 2000; HEINRICH *et al.*, 2004; VIOLANTE *et al.*, 2009)

Foram preparadas soluções estoque 1 g/mL em EtOH, dos extratos brutos de *Marcetia ssp* e das frações de *M. latifolia*, as quais foram diluídas para as concentrações de 250, 125, 50, 25, 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$ . Para as formulações contendo 5, 10, 20 e 30% das frações de *M. latifolia* as concentrações foram entre 0,2 - 50 mg/mL, conforme Figura 17.

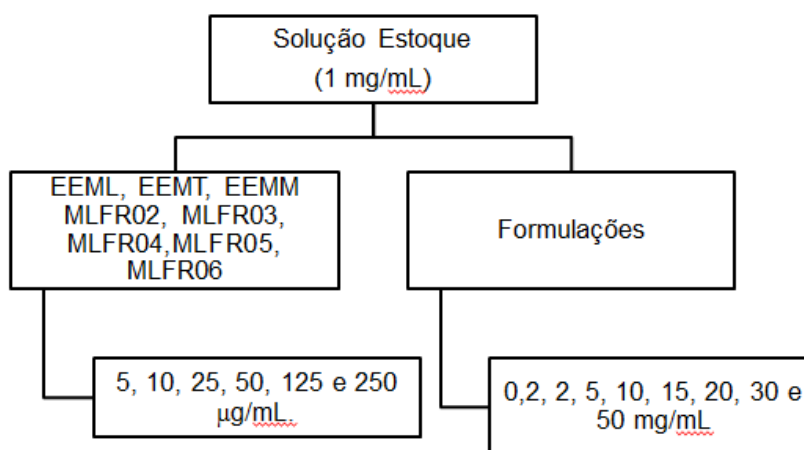


Figura 17: Esquema da diluição das amostras testadas frente ao FPS

Após esse procedimento, foi efetuada a leitura das amostras em espectrofotômetro Evolution 220 UV/Vis (Thermo Scientific®) na faixa de 290 a

320 nm em intervalo de leitura de 5 nm. FPS médio foi calculado de acordo com a Equação 2 e Tabela 1, já demonstradas (páginas 49 e 50).

Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados das absorvâncias foram confrontados estatisticamente pela análise de variância ANOVA ( $p < 0,05$ ) no software Graphpad Prism<sup>®</sup>, versão 5.0.

### 3.8 Avaliação do perfil fotoprotetor UVA

Para aplicação da metodologia proposta por Hommoss (2008), Kerrilee (2009), Detoni e colaboradores (2012) foi preparada uma solução estoque de resveratrol (RVS) 1 mg/mL em EtOH:H<sub>2</sub>O (80):(20). Em seguida, pesou-se uma alíquota de 0,04 g de cada amostra investigada em placas de petri (4,5 cm de diâmetro), espalhando-as homoganeamente sobre a parte superior. Ao fundo de cada placa foi adicionado 10 mL da solução de RVS (Figura 18).

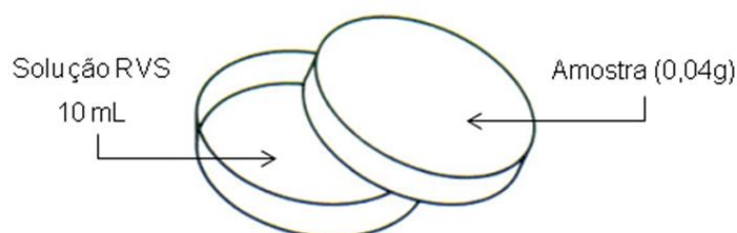


Figura 18: Preparação da placa de petri a ser irradiada pela radiação UVA

As placas foram colocadas em uma câmara e submetidas à radiação com lâmpadas UVA (320-400 nm) de exposição com 60.0 W de potência (KERRILEE, 2009; DETONI *et al.*, 2012). A fotodegradação do RVS foi avaliada durante 120 minutos, sendo que ao intervalo de 20 minutos [0 (t<sub>0</sub>) - 120 minutos (t<sub>120</sub>)], era retirada uma alíquota de 100 µL da solução de RVS. Esta alíquota foi transferida para balão volumétrico e tiveram seu volume completado para 10 mL com EtOH. A alíquota da solução do RVS irradiada teve sua absorvância avaliada em espectrofotômetro Evolution 220 UV/Vis (Thermo Scientific<sup>®</sup>) no modo scan (320-400 nm). A absorvância a 306 foi utilizada como indicativo da degradação. Quanto maior a absorvância após 120 minutos, maior a proteção que a amostra proporcionou ao resveratrol, pois uma menor quantidade do *trans*-RVS foi transformado em *cis*-RVS. As avaliações da fotodegradação do

RVS foram realizadas em triplicata. Os resultados de degradação foram mensurados por medida indireta, UVA os valores de absorvância ( $\lambda$ ) foram convertidos para a medida indireta (percentagem). Assim a  $\lambda$  no t0 correspondeu a solução de 1mg/mL de RVS, ou seja 100% de *trans* – RVS e a cada intervalo de tempo pré-determinado foi observado a % de RVS ainda presente na amostra. A absorvância no (t0) foi considerada 100% o que corresponde a solução de RVS 1,0 mg/mL e as outras absorvâncias foram comparadas ao t0.

Para avaliação das formulações foi preparado o controle negativo, representado pela placa com a loção polawax<sup>®</sup> e controle positivo, placa de petri protegida com a formulação de BZ3 a 5%, que é sua concentração usual (BATISTUZZO, ETO e ITAYA, 2006)

### **3.9 Avaliação da segurança dos extratos etanólicos de *Marctetia ssp***

#### **3.9.1 Avaliação da irritabilidade ocular *in vitro*: Teste HET-CAM**

Os ovos embrionados de Matrizes COBB foram fornecidos pela granja Globo Aves, possuindo 10 dias de incubação a 37°C  $\pm$  0,5 °C com umidade relativa de aproximadamente 70 %. Para a execução do experimento, os ovos foram identificados e colocados em posição vertical sobre um suporte para ovos, de forma que a parte mais larga e plana ficou voltada para cima. Com o auxílio de uma pinça foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca, a qual foi recortada circularmente com a pinça, e posteriormente foi retirada a primeira membrana de aspecto esbranquiçado para deixar descoberta a CAM, a qual é caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos evidentes (Figura 19).

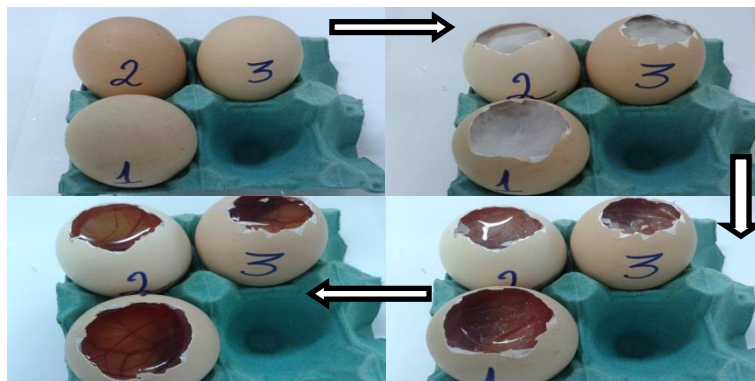


Figura 19: Preparação dos ovos embrionados para aplicação das amostras

Uma vez expostas, as membranas foram avaliadas com finalidade de verificar danos, o que causaria a rejeição do ovo no experimento. Também foram descartados os ovos em que não haja embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade) (VINARDELL e MITJANS, 2006).

As amostras (extratos etanólicos e frações) foram diluídas a concentrações de 250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , em água destilada. A aplicação das amostras se deu em ordem decrescente até não mais serem observados efeitos irritantes. Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  foi aplicada sobre a CAM (Figura 20)

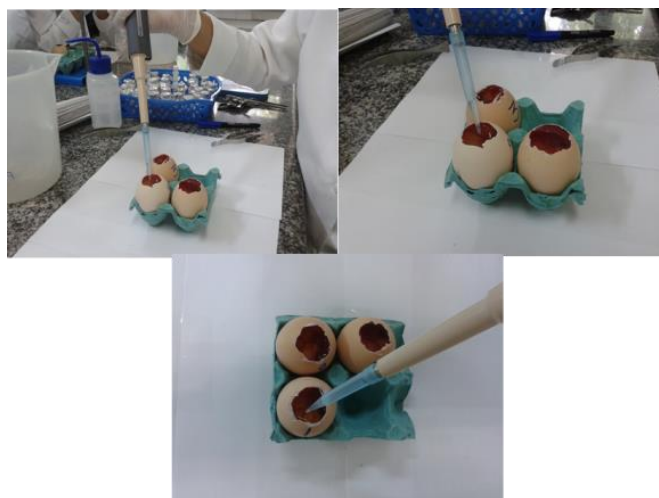


Figura 20: Aplicação da amostrana na CAM

Como controle positivo, os ovos foram tratados com NaOH (0,1 N) como modelo de produtos altamente irritantes e nos quais se observam sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia e coagulação). O controle negativo foi utilizado água destilada (NUNES, 2011).

As alterações a serem observadas foram hiperemia (aparecimento de capilares que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis se observam

mais vermelhos e intensos), hemorragia (clara difusão de sangue no meio) e coagulação (detectada pela agregação de plaquetas que forma uma espécie de mancha rosada ou a coagulação de proteínas dando um aspecto de grumos esbranquiçados) (VINARDELL e MITJANS, 2006).

A Equação 8 foi utilizada para a determinação numérica do Potencial Irritante (PI). A partir deste valor foi determinada a classificação na qual se encaixa a amostra avaliada, conforme indicado na Tabela 4.

$$PI = \frac{(301-H) \times 5}{300} + \frac{(301-L) \times 7}{300} + \frac{(301-C) \times 9}{300} \quad (8)$$

Onde: H = tempo de início do surgimento da hiperemia; L= tempo de início surgimento da hemólise; C = tempo de início do surgimento da coagulação.

Tabela 4: Classificação das amostras de acordo com a pontuação dos fenômenos

<b>Índice HET-CAM</b>	<b>Categorias</b>
N<1	Não irritante
1≤N≤5	Irritação fraca
1≤N≤5	Irritação moderada
N≥9	Irritação severa

(Fonte: NUNES, 2011)

### 3.9.2 Ensaio de Hemólise

O ensaio de atividade hemolítica dos extratos etanólicos de *Marsetia* ssp e frações de *M. latifolia* foi consuzido segundo metodologia descrita por BENDER *et al.* (2012) e a ANVISA (2012a) com algumas adaptações. Amostras de sangue (5 mL) de um adulto sádio foram coletadas por punção venosa em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante, eritrócitos do sangue humano foram separados por centrifugação (900 g por 5 minutos) (Eppendorf Centrifuge® 5424) e foram lavados três vezes com solução salina de NaCl (0,9 %). Os eritrocitos lavados foram resuspendidos em 0.9% NaCl (1:9) e diluídos (1:24) em tampão fosfato de sódio (pH = 7,4), o que resultou em uma suspensão de células vermelhas (SCV).

Em tubos eppendorf foram adicionados 900 µL da SCV e 100 µL das amostras ou dos controles. As amostras foram diluídas em solução tampão

fosfato (PBS) até concentração final de 125 and 250  $\mu\text{g/mL}$ . Como controles positivo e negativo foram usados o Extran MA01<sup>®</sup> e soro fisiológico 0,9 %, respectivamente. Os tubos Eppendorf foram incubados a temperatura de 37 °C por 30 min. e, posteriormente, centrifugadas por 10 min. a 900 x g.

O grau de hemólise foi determinado medindo a absorvância dos sobrenadantes a 415 nm em espectrofotômetro Evolution 220 UV/Vis (Thermo Scientific<sup>®</sup>), como demonstrado na figura 21. A porcentagem de hemólise foi calculada para cada amostra segundo a equação 9:

$$\% \text{ Hemolise: } = \frac{[(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do controle negativo}) / \text{absorbância do controle positivo}] \times 100}{(9)}$$

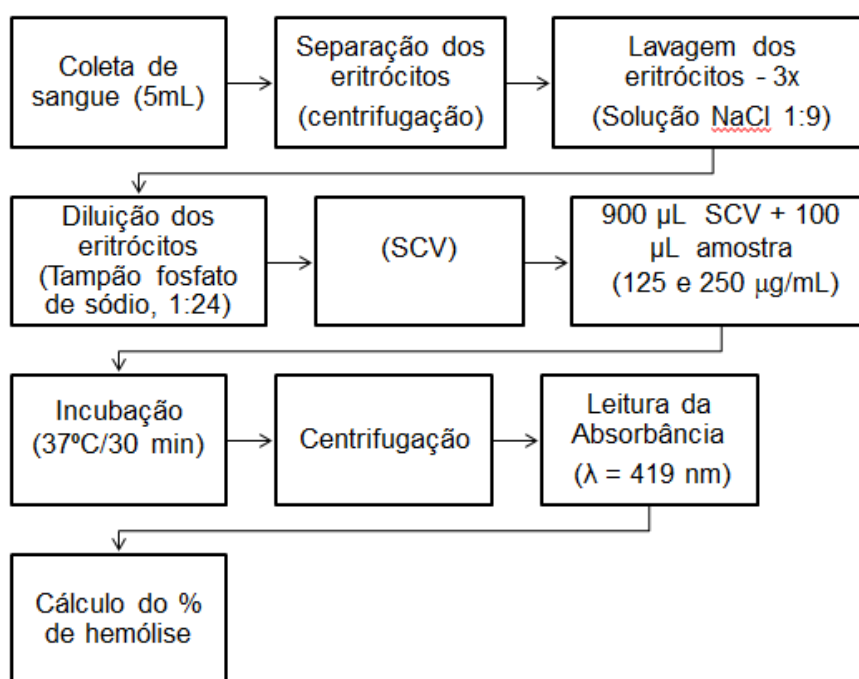


Figura 21: Ensaio para avaliação da atividade hemolítica

### 3.10 Preparo da loção base

Loções e cremes são as formulações mais comuns para fotoprotetores. Estes veículos são emulsões água/óleo ou óleo/água, cuja principal diferença está na viscosidade, que por sua vez é resultante da concentração da base autoemulsionante na formulação. As emulsões menos viscosas, mais finas, são

chamadas loções, e as mais viscosas, espesas, são creme. Desta forma é possível incorporar uma variedade de matérias-primas, permitindo uma maior flexibilidade para escolha de um sistema emulsionante para filtros solares (AULTON, 2005).

A base farmacêutica, emulsão O/A, para incorporação das amostras e do filtro solar, usado como controle positivo, foi adaptada a partir do Formulário Médico Farmacêutico (BATISTUZZO, ETO e ITAYA, 2006) como descrito nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5: Composição da loção polawax<sup>®</sup> para incorporação das amostras

<b>Fase</b>	<b>Matérias primas</b>	<b>Quantidades</b>	<b>Propriedades</b>
1	Metilparabeno	0,15%	Conservante
	Glicerina	5%	Umectante
	Água deionizada	q.s.p. 100g	Veículo
2	Propilparabeno	0,05%	Conservante
	Vaselina líquida	3%	Emoliente
	Estearato de octila	4%	Emoliente
	Cera polawax <sup>®</sup>	8%	Cera auto emulsionante
3	Imidazolidinil Ureia	0,1%	Emulsionante
			Conservante

Tabela 6: Composição da loção polawax<sup>®</sup> para incorporação da BZ3

<b>Fase</b>	<b>Matérias primas</b>	<b>Quantidades</b>	<b>Propriedades</b>
1	Metilparabeno	0,15%	Conservante
	Glicerina	5%	Umectante
	Água deionizada	q.s.p. 100g	Veículo
2	Propilparabeno	0,05%	Conservante
	Vaselina líquida	3%	Emoliente
	Estearato de octila	4%	Emoliente
	Cera polawax <sup>®</sup>	8%	Cera auto emulsionante
	BZ3	5%	Fotoprotetor UVA/UVB
3	Imidazolidinil Ureia	0,1%	Conservante

O veículo, usado para a incorporações dos extratos de *Marcetia* ssp.e frações de *M. latifolia*, foi preparado por aquecimento da fase 1 e 2 a 75 °C separadamente (PROENÇA *et al.*, 2009). Posteriormente, a fase 2 (oleosa) foi



vertida sobre a fase 1 (aquosa), sob constante agitação e ao final a fase 3 foi adicionada e a mistura homogeneizada até a temperatura abaixo de 40 °C.

Para formulação das emulsões utilizou agitador de pás, placa de aquecimento, cera polawax<sup>®</sup>, estearato de octila, imidazolidinil ureia, propilenoglicol e trietanolamina (Pharmanostra<sup>®</sup>), metilparabeno, propilparabeno e glicerina vegetal (Fragon<sup>®</sup>) e vaselina líquida (Galena<sup>®</sup>).

A emulsão O/A contendo o filtro químico BZ3, foi preparada seguindo a mesma metodologia descrita para o preparo da emulsão O/A, sem a BZ3. As amostras foram incorporadas na loção polawax<sup>®</sup> nas concentrações 5, 10, 20 e 30 %. Uma vez prontas, o pH foi medido e ajustado, com trietanolamina, em torno de pH 6,0 – 7,0, que é considerada a faixa desejável para uma melhor estabilidade dos protetores solar de acordo com Ribeiro (2010).

### 3.10.1 Análises físico-química das formulações

Os ensaios físico-químicos (caracteres organolépticos, pH, centrifugação e espalhabilidade) foram utilizados como recurso para triagem das formulações fotoprotetoras que não apresentassem sinais de instabilidade após 24 horas de manipulação, sendo aptas, portanto, para serem submetidas a avaliação do seu potencial fotoprotetor UVB e UVA.

#### 3.10.1.1 Características organolépticas

As formulações tiveram seus caracteres organolépticos avaliados a temperatura ambiente (25°C) e a fonte de luz natural por 24 horas após a manipulação, tendo como padrão de referência a emulsão polawax antes e após a incorporação dos extratos de *Marcetia* ssp e frações de *M. latifolia*. Os parâmetros analisados das formulações foram cor, brilho, odor, homogeneidade, presença de grumos (BRASIL, 2004).

### 3.10.1.2 Determinação do pH

A avaliação pH é um dos parâmetros utilizados para monitorar alterações na estrutura da formulação nem sempre perceptíveis visualmente, esta análise pode sinalizar problemas de estabilidade entre os constituintes da formulação, alterações provenientes do processo de fabricação (contaminação microbiana e cruzada), além da qualidade do produto final e segurança do produto para o consumidor (AULTON, 2005).

A determinação do pH das loções fotoprotetoras, 24 horas após a manipulação, foi realizado em pHmetro digital Digimed<sup>®</sup> DM-22, com sensor Digimed DNE-CVB e a temperatura ambiente (25°C). As amostras foram inseridas diretamente em contato com o eletrodo, verificando sua diferença de potencial (BRASIL, 2004). Antes das leituras, o pHmetro foi calibrado com solução tampão comercial pH 4,0 e 7,0. O ensaio foi efetuado em triplicata.

### 3.10.1.3 Centrifugação

Para avaliar a estabilidade inicial das formulações, foi realizado o teste de centrifugação das emulsões após correção de pH. No ensaio de centrifugação buscou-se observar os aspectos da estabilidade física, tais como: cremagem, coalescência, separação de fases (sedimentação e/ou precipitação) e aparecimento de gotículas de óleo. O aparecimento de qualquer um destes sinais indica necessidade de reformulação do produto.

Aproximadamente 1,5 g de cada amostra foi colocada em eppendorf e centrifugada (Eppendorf Centrifuge<sup>®</sup> 5424) por 30 minutos a 3.000 rotações por minuto (rpm) a temperatura ambiente (25 °C), após 24 horas da manipulação. O ensaio foi realizado em triplicata (BRASIL, 2004).

### 3.10.1.4 Espalhabilidade

Para o teste de aferição da extensibilidade da amostra mediante a força aplicada, perfil de espalhamento e espalhabilidade máxima conseguida com a força limite foi empregada a metodologia proposta por Münzel e colaboradores (1959), modificada por Knorst em 1991.

No desenvolvimento do ensaio de espalhabilidade, foi utilizada uma placa-molde circular de vidro (diâmetro = 10 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, o qual foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (10 cm X 10 cm). Sob essas placas foi posicionada uma folha de papel milimetrado. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície nivelada com espátula e após a placa-molde foi cuidadosamente retirada. Sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso pré-determinado. Após 60 segundos, foi calculada a superfície abrangida através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro médio (BORELLA *et al.*, 2010).

Esse procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas a cada 60 segundos. Após cada determinação, a superfície abrangida e o peso da placa adicionada foram registrados. A espalhabilidade ( $E_i$ ) foi determinada a 25 °C e calculada através da equação 10 (DE PAULA *et al.*, 1998).

$$E_i = (d^2 \cdot \pi) / 4 \quad (10)$$

Onde:  $E_i$  = espalhabilidade da amostra para peso  $i$  ( $\text{mm}^2$ );  $d$  = diâmetro médio (mm) e  $\pi = 3,14$ .

Os resultados da espalhabilidade foram apresentados pela relação entre a área de espalhamento conseguido com a aplicação de esforço sobre o produto e o esforço limite, relação esta que corresponde ao Fator de Espalhabilidade em  $\text{mm}^2/\text{g}$  (Equação 11).

$$\text{Fator de Espalhabilidade} = \text{espalhabilidade}_{n/\Sigma \text{ pesos}} \quad (11)$$

### 3.11. Análise Estatística

Para o teste de atividade antioxidante e hemólise foi calculado pelos valores originais e expressos em média  $\pm$  desvio padrão após análises em triplicata, assim como os valores de pH. A espalhabilidade e os potenciais fotoprotetores *in vitro* foram analisados empregando o software Graphpad Prism<sup>®</sup> e a avaliação estatística foi determinada por análise de variância ANOVA seguida de teste de Tukey, com significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Os resultados obtidos nesta pesquisa serão apresentados em dois momentos: 1) Investigação da atividade fotoprotetora de extratos etanólicos do gênero *Marsetia* e sua formulações farmacêuticas; 2) Obtenção de frações ativas do extrato bruto em que os resultados anteriores mostraram maior potencial de uso na indústria cosmética.

## 4.1 Extrato Etanólico de *Marcetia taxifolia*<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Os resultados referentes a *M. taxifolia* foram publicados na Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 25, n. 4, p. 413-418, 2015, como o título: “*In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations” (ANEXO 01)

#### 4.1.1 Análise do EEMT por CLAE-DAD

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo Diodos (CLAE-DAD) é fundamentalmente de separação, apresentando a vantagem de separar os componentes da mistura em análise antes da identificação e quantificação (AQUINO-NETO e NUNES, 2003). Dentre as diversas metodologias analíticas descritas na literatura, evidencia-se como uma das mais versáteis e precisas para análise de misturas altamente complexas, como extratos brutos vegetais, pois apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos, dependendo do detector utilizado, resposta independente da fase móvel, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (BAGGIO e BRAGAGNOLO, 2004).

O extrato em bruto de *Marcetia taxifolia* foi analisado por meio de CLAE-DAD. A análise do respectivo cromatograma (Figura 22) e espectros de UV do EEMT (APÊNDICES J e L) mostrou a presença de ácidos fenólicos entre 11,0 – 12,0 min. E entre Tr (s) 15,0 – 21 min constatou-se a presença de flavonols não glicosilados.

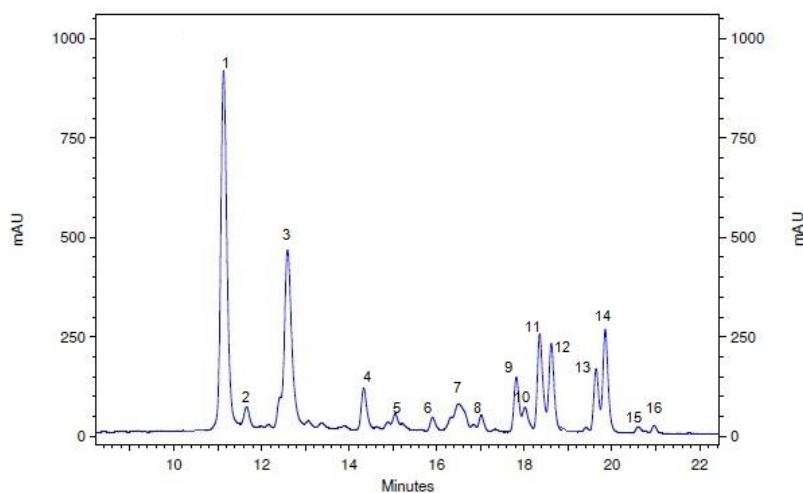


Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEMT

A quercetina (Pico 4) foi identificada comparando-se espectro de UV e Tr 14,34 com a QUE padrão. Devido à boa ação fotoprotetora da quercetina, este composto foi quantificado no EEMT. Os resultados de quantificação mostram que o teor de quercetina presente no extrato etanólico atendeu aos LD e LQ,

assim como a precisão e exatidão encontram-se dentro dos valores admissíveis, o que demonstra confiabilidade do método.

A quantificação da QUE foi feita usando-se a equação da reta  $y = 30000000x + 14619$  ( $R^2 = 0,9987$ ), que confere linearidade ao método, permitindo determinar que a concentração QUE presente no extrato etanólico de *M. taxifolia* foi de 1,12 mg/mL o que corresponde a 55,78g por kg de planta seca.

Os resultados da quantificação da QUE no EEMT foram dentro do LD (0,011 µg/mL) e do LQ (0,04 µg/mL) enfatizando a confiabilidade do método. A precisão e exatidão das medições estavam dentro dos valores admissíveis; a precisão não permitiu valores que excedecem 2,09%.

#### 4.1.2 Teor de Flavonoides Total (TFT) e atividade antioxidante (AA)

O TFT no extrato de *M. taxifolia* foi calculado por equivalente de QUE, mostrando  $168 \pm 0,35$  µg/mL de quercetina a cada 10 mg do extrato etanólico. O resultado da avaliação da atividade antioxidante pode ser visto na tabela 7. Estes resultados demonstram boa associação entre AA e a presença de flavonoides em *M. taxifolia*, a qual apresentou  $EC_{50}$  de  $5,515 \pm 1,078$  ( $R^2 = 0,853$ ). Estes resultados indicam que EEMT mostrou uma atividade antioxidante mais pronunciada do que o BHT ( $CE_{50}$ :  $8,152 \pm 0,365$ ) e inferior ao ácido ascórbico ( $CE_{50}$ :  $1,857 \pm 0,280$  µg/mL).

Tabela 7: Atividade antioxidante (%) do EEMT

	SRL (%)					
	250*	125	50	25	10	5
EEMT	95,31 ± 0,019	93,97 ± 0,025	93,43 ± 0,027	74,19 ± 0,109	35,52 ± 0,074	20,25 ± 0,033
BHT*	94,64 ± 0,068	94,07 ± 0,075	86,58 ± 0,017	57,16 ± 0,054	30,20 ± 0,084	18,38 ± 0,010
AA**	97,03 ± 0,037	96,62 ± 0,043	96,98 ± 0,038	96,57 ± 0,046	74,32 ± 0,032	24,60 ± 0,091

\*µg/mL; \*\*di-terc-butil metil fenol; \*\*\* ácido ascórbico.

Como demonstrado por Vicentini e colaboradores (2007) a quercetina tem forte atividade antioxidante para inibição do DPPH•, com  $IC_{50}$  de 0,8 µg/mL, em estudos com o extrato etanólico de *Psidium guajava* foi demonstrado um  $EC_{50}$

de 0,15 mg/mL. Enquanto a *Calendula officinalis* também apresentou boa atividade antioxidante (IC<sub>50</sub>: 4,4 µg/mL). Ambos os resultados foram atribuídos a ação da QUE contra o radical DPPH• (ILHA *et al.*, 2008, FONSECA *et al.*, 2010)

#### 4.1.3 Fator de Proteção Solar

Os flavonoides executam diferentes funções dependendo das suas concentrações. É plausível que, além de absorver comprimentos de onda curtos, os flavonoides continuem a desempenhar a função antioxidante paralelamente a fotoproteção (AGATI *et al.*, 2013).

O resultado da determinação do FPS, *in vitro* está apresentado na Figura 23. De acordo com a legislação brasileira, RDC nº 30 de 01 de junho de 2012 (Brasil, 2012b), apenas FPS maior ou igual a 6 pode ser considerado como produtos cosméticos com atividade fotoprotetora UVB. O extrato de *M. taxifolia* nas concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL, estatisticamente diferentes, tiveram atividade fotoprotetora satisfatória (15,52 e 8,35, respectivamente) e acima do limite mínimo exigido pela ANVISA.

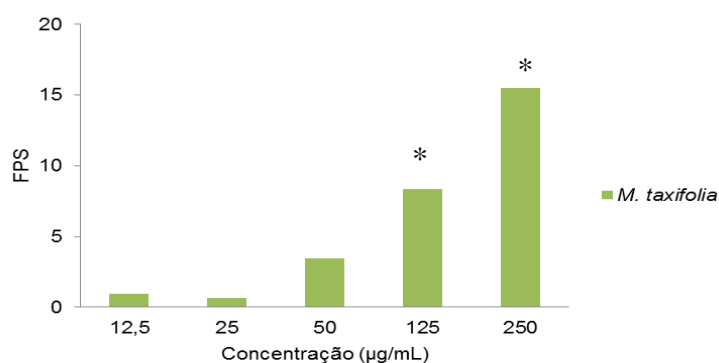


Figura 23: Perfil de fotoproteção UVB do EEMT

Diversas espécies vegetais vêm sendo estudadas quanto à sua atividade antioxidante e fotoprotetora. Estudos recentes relatam a importância de protetores solares naturais nas composições de filtros solares comerciais e destacam seu possível papel na prevenção do câncer de pele (POLONINI, RAPOSO e BRANDÃO, 2013). Propriedades fotoprotetoras foram avaliadas em extratos de uma grande variedade de plantas. Os extratos de *Chrysanthemum ramat* e *Crocus sativus* (L) provaram reduzir o eritema induzido por agente



fotoestimulante em comparação com benzofenona 4 (HU e WANG, 1998). Violante e colaboradores (2009) desenvolveram estudos sobre a espécie *Microsiphonia velame*, *Oxalis hisutissima* e *Lafoensia pacarido* descrevendo boa absorção destas espécies na região do UV em  $\lambda_{\max}$  318 nm, 324 nm e 356 nm, respectivamente. Estudos fitoquímicos descrevem a presença de flavonoides, e outros constituintes como taninos e alcalóides, como substâncias com uma ação fotoprotetora nestas espécies. O extrato *Calophyllum inophyllum* apresentou resultados interessantes de fotoproteção UVA e UVB, sendo rico em vários compostos protetores solares naturais, tais como biflavonoides, tocoferóis e tocotrienos, além da ampla absorção no UV (250 – 400 nm) (SAID *et al.*, 2007). Estudos utilizando o extrato seco das folhas de *Neoglaziovia variegada* (Bromeliaceae) descreveram potente atividade antioxidante e significativa atividade fotoprotetora correlacionadas aos compostos flavonoides presentes no extrato (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

#### 4.1.4 Atividade fotoprotetora UVA

A placa revestida com EEMT apresentou um teor de 78,09 % de trans-RVS ao fim da exposição de 120 minutos. Estes valores são satisfatórios já que os controles claro (CC) e escuro (CE), respectivamente, apresentaram no mesmo intervalo de tempo, 40,49% e 99,78%, isto permite inferir que a fotoproteção contra a radiação UVA pode ser proveniente das amostras estudadas. De acordo com o teste ANOVA para o EEMT os t120 entre t0, t40, t60 e t100 foram estatisticamente diferentes (Figura 24).

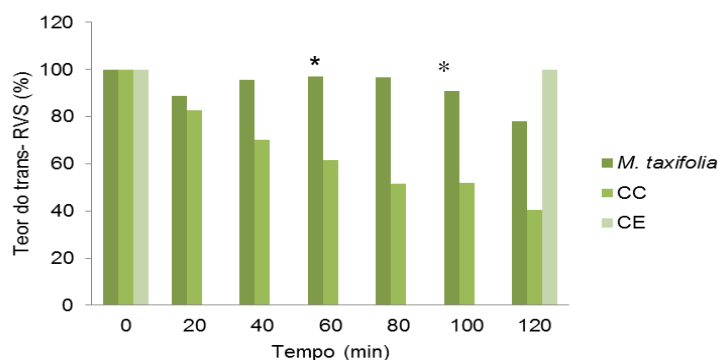


Figura 24: Perfil de fotoproteção UVA do EEMT

Mesmo sendo conhecidos os danos causados pela radiação UVA, a maioria dos protetores solares disponível no mercado oferece, significativamente, maior proteção contra a radiação UVB, mas pouca proteção UVA. São poucos os protetores de amplo espectro como a avobenzona, BF3 ou óxido de zinco, que "passivamente" absorvem ou dispersam os raios UVA, diminuindo assim a quantidade total de radiação UVA prejudicial de alcançar a pele (WANG, OSTERWALDER e JUNG, 2011).

Ainda sobre a fotoproteção UVA, estudos tentaram estabelecer uma relação entre AA e fotoproteção contra radiação UVA. Partindo da fundamentação teórica de que a radiação UVA induz a produção de radicais livres, tentou-se associar antioxidantes, como a vitamina C e E, a protetores solares e verificar se a presença dos mesmos resultava em aumento da proteção contra radiação UVA. Porém os resultados sugerem que os antioxidantes nestes produtos não oferecem nenhuma contribuição significativa para a proteção contra os radicais livres. Os resultados indicaram que maior parte da proteção contra os radicais livres vinha dos filtros de espectro de proteção contra raios UVA e não dos antioxidantes incorporados. Resultados que fundamentam a necessidade em se buscar compostos com capacidade de fotoproteção UVA (WANG, OSTERWALDER e JUNG, 2011; HOJEROVA, MOVCIKOVA e MIKUL; 2011).

A proteção contra as radiações UVB e UVA é considerada de fundamental importância na prevenção ao câncer de pele e ao fotoenvelhecimento. Assim, é mais pertinente o desenvolvimento de produtos fotoprotetores com um espectro de absorção na faixa do UVB e UVA (NASH, TANNER e MATTS, 2006; GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ-LORENTE e GILARTE-CALZADA, 2008).

#### 4.1.5 Avaliação da toxicidade

##### 4.1.5.1 Teste em membrana corionialantóide de ovos de galinha (HET-CAM)

O HET-CAM avalia as alterações vasculares e gera resultados que, por sua vez, em comparação com o modelo animal, tem um ótimo relacionamento

com fenômenos observados na conjuntiva, mesmo se eles são, via de regra, são mais leves do que as alterações detectadas em outros sistemas tal como, por exemplo, os induzidos em órgãos isolados (NOBREGA *et al.*, 2008)

Pelos resultados obtidos das médias das triplicadas nos ensaios HET-CAM foi possível classificar, de acordo com a metodologia aplicada, que o extrato etanólico de *M. taxifolia* (250 e 125 µg/mL) apresentou baixo potencial de irritação (1,93 e 1,08). A tabela 8 apresenta o potencial de irritação do EEMT frente ao teste HET-CAM.

Tabela 8: Classificação do Potencial de Irritação Ocular do EEMT pelo ensaio HET-CAM

	Concentração (µg/mL)	PI	Classificação
EEMT	250	1,93	irritação fraca
	125	1,08	irritação fraca
	62,5	0,14	não irritante
NaOH 0,1 M*	0,1M	12,6	irritante
Água destilada**	-	0,0	não irritante

\* controle positivo/\*\* controle negativo

Como descrito por outros estudos, o ensaio HET-CAM se mostrou eficiente na determinação do potencial irritante de extratos vegetais (MANSUR, 2001; DEBBASH *et al.*, 2005; NUNES, 2011).

#### 4.1.5.2 Atividade hemolítica

Com forma de complementação aos estudos sobre a toxicidade da *M. taxifolia* o EEMT teve também seu potencial hemolítico avaliado. A concentração que teve a menor taxa percentual de hemólise permaneceu límpida como a solução de soro fisiológico, após a centrifugação, ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado, sem que tenha havido a lise das células.

O EEMT a uma concentração de 250 µg/mL e 125 µg/mL, ocasionaram hemólise em  $66,55 \pm 0,020$  % e  $17,34 \pm 0,019$ , respectivamente (Figura 25). Análise estatística revelou que o percentual hemolítico o EEMT é estatisticamente diferente para as concentrações avaliadas com  $p < 0,05$

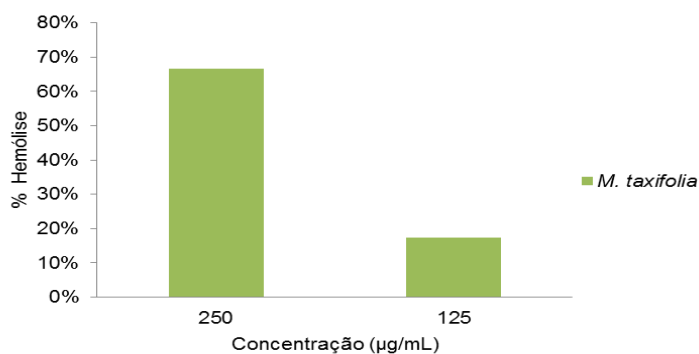


Figura 25: Avaliação da atividade hemolítica do EEMT

#### 4.1.6 Avaliação do perfil fotoprotetor UVB/UVA *in vitro* das formulações contendo EEMT

As emulsões para a incorporação de ativos fotoprotetores devem atender a alguns aspectos importantes como: não interferir negativamente no desempenho do protetor solar, como o próprio FPS, permitir a obtenção de um produto estável, não provocar a irritação cutânea, dotadas de resistência à água, não gordurosas e fornecer um produto final estável (DE PAOLA e RIBEIRO, 1998).

Para o desenvolvimento das formulações utilizadas neste estudo, o emulsionante utilizado foi a cera autoemulsionante polawax<sup>®</sup> (caráter não iônico). A cera polawax<sup>®</sup> é formada a partir de álcool cetó - estearílico e álcool cetó-estearílico etoxilado. Esta base auto-emulsionante apresenta baixa toxicidade e irritabilidade, além de ser compatível com diversas substâncias, mais que os emulsionantes aniônicos ou catiônicos (AULTON, 2005)

A loção polawax<sup>®</sup>, depois de manipulada, consistiu em uma loção branca, brilhosa e de odor característico. Alguns autores, como Borghetti e colaboradores (2006) utilizam esse tipo de emulsão para incorporação de fotoprotetores.

Como os sistemas emulsionados são propensos a instabilidade, os testes descritos em seguida permitiram avaliar se as amostras em estudo sofreram ou não alterações físicas, observou-se: separação de fases, precipitação, turvação, alteração de cor e odor (BRASIL, 2004).

#### 4.1.6.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações contendo EEMT

Os extratos vegetais podem ser incorporados em diferentes preparações farmacêuticas, seja para fins terapêuticos ou cosméticos. E dependendo dos constituintes químicos, tornam-se responsáveis pela atividade do produto. Porém, como qualquer ativo, quando incorporado ao veículo farmacêutico pode alterar ou não a forma farmacêutica e o comportamento físico-químico da preparação, por isso é importante analisar alguns parâmetros inerentes às formulações elaboradas (ISAAC *et al.*, 2008).

As características organolépticas foram parâmetros analisados para avaliar se as formulações estavam em conformidade com as pretensões esperadas ao desenvolver o produto baseadas nas propriedades sensoriais e químicas da amostra. As variáveis organolépticas analisadas por observação direta/sensorial foram: o aspecto da emulsão antes e após incorporação do extrato, o odor, a cor final, maciez e brilho (BRASIL, 2004).

A formulação contendo apenas o padrão de benzofenona-3 se distinguiu pela presença da cor levemente amarelada, maciez, brilhosa e odor característico do fotoprotetor. Após adição dos extratos nas concentrações estudadas, foi observada mudanças na coloração, odor e brilho de todas as formulações, apresentando características distintas, o que resultou, conseqüentemente, em formulações com aspectos visuais e sensoriais variados (Figura 26)

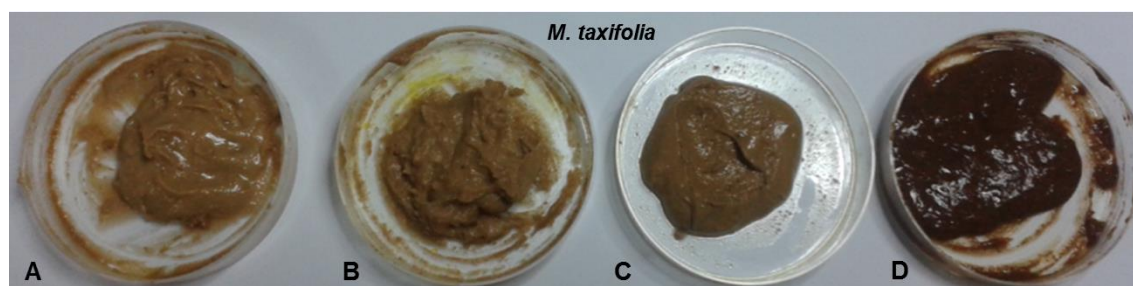


Figura 26: Apresentação do aspecto visual das formulações contendo diferentes concentrações do EEMT: 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)

Em formulações tópicas, o pH é um parâmetro bastante importante. A pele apresenta pH levemente ácido que contribui para a manutenção da sua

integridade física, logo, quando essa característica é modificada, podem ocorrer agressões dermatológicas. Também é importante lembrar que o pH é capaz de acelerar ou diminuir a velocidade de reações, pois as principais reações envolvidas na degradação de princípios ativos, como hidrólise e oxidação (LEONARDI, GASPAR, CAMPOS, 2002). Ainda, segundo Ribeiro (2010), o pH pode alterar o deslocamento dos elétrons na molécula de filtros solares, podendo reduzir seu poder de absorver e diminuir o poder protetor, além de torna-los insolúveis.

A medição do pH ocorreu logo após a preparação da formulação e adição dos extratos em suas devidas concentrações. Para que as loções ficassem mais próximas do pH cutâneo, foi utilizada a trietanolamina como agente modificador de pH (Tabela 9)

Tabela 9: Média e desvio padrão dos valores de pH das formulações contendo EEMT

Formulação (%)	pH sem correção	pH com correção
	EEMT	
5	2, 53 ± 0,060 <sup>a</sup>	6, 85 ± 0,094 <sup>a</sup>
10	2, 85 ± 0,070 <sup>b</sup>	6, 45 ± 0,095 <sup>a</sup>
20	3, 49 ± 0,273 <sup>c</sup>	6, 46 ± 0,191 <sup>b</sup>
30	3, 37 ± 0,160 <sup>c</sup>	6,86 ± 0,092 <sup>c</sup>

a, b, c: as médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Outro aspecto avaliado das formulações foi o comportamento frente ao teste de centrifugação, a força da gravidade atua sobre os produtos fazendo com que as partículas se movam no seu interior. O teste de centrifugação promove um estresse na amostra simulando o aumento da força de gravitacional, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitações, separação de fases e formação de sedimentos compactos. Este teste é recomendado pela ANVISA, pois o mesmo prevê a necessidade de reformulação caso a amostra indique instabilidade para este teste (BRASIL, 2004; ISSAC *et al.*, 2008).

Todas as amostras formuladas foram submetidas ao teste e ao final do ensaio foi observado que nenhuma amostra possuía separação de fases nem precipitações, considerando assim as formulações aptas a futuros testes de estabilidade. De acordo com Vanzin e Camargo (2008), o não aparecimento de

gotículas visíveis de óleo garante à uniformidade da dose aplicada na pele, caso contrário, a fotoproteção é considerada duvidosa. A Figura 27 demonstra o aspecto físico das formulações após teste de centrifugação, mostrando que as mesmas permaneceram estáveis.

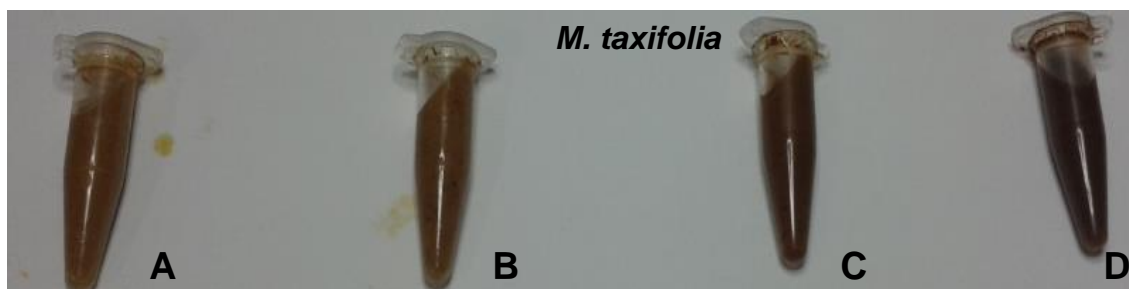


Figura 27: Características das formulações contendo diferentes concentrações do EEMT após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)

Quando se planeja desenvolver um filtro solar procura-se que o mesmo tenha uma boa espalhabilidade, formando um filme homogêneo sobre pele e, conseqüentemente, uma boa aderência a mesma, para com isso proteger a pele por mais tempo e não sair facilmente quando em contato com a água, pois eficácia de um fotoprotetor está intimamente ligada a sua espalhabilidade. Assim, o estudo das características reológicas, incluindo, espalhabilidade pode ser utilizado como um meio de seleção para diferentes formulações cosméticas (MILAN *et al.*, 2007).

A boa espalhabilidade propicia uma aplicação mais agradável, redução do consumo do fotoprotetor, pela menor quantidade necessária ao aplicar, e filtros solares devem propiciar fácil espalhamento sobre a pele para garantir o FPS nominal (BORGHETTI e KNORST, 2006; BORELLA *et al.*, 2010, KRURY; BORGES, 2011).

A determinação da espalhabilidade permitiu avaliar a expansão das formulações contendo diferentes concentrações do EEMT sobre uma superfície após determinado período de tempo (GARG *et al.*, 2002; KRURY e BORGES, 2011). Foi observado que o fator de espalhabilidade aumentou proporcionalmente que a concentração dos extratos foi aumentada, isto por que a amostra proporciona uma fluidez a formulação (Tabela 10).

Tabela 10: Fator de espalhabilidade ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ) das formulações contendo EEMT em diferentes concentrações

Formulação EEMT (%)	Fator de espalhabilidade
5	$1,10 \pm 0,011$
10	$1,30 \pm 0,031$
20	$1,31 \pm 0,016$
30	$1,41 \pm 0,031$
Loção polawax®	$0,26 \pm 0,230$
*Loção BZ3	$6,89 \pm 0,085$

\*5%

Também foi possível observar que, de modo geral, após adição crescente do extrato, houve uma redução na relação entre a área e o esforço limite ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ), quando comparada com a loção polawax® (Figura 28).

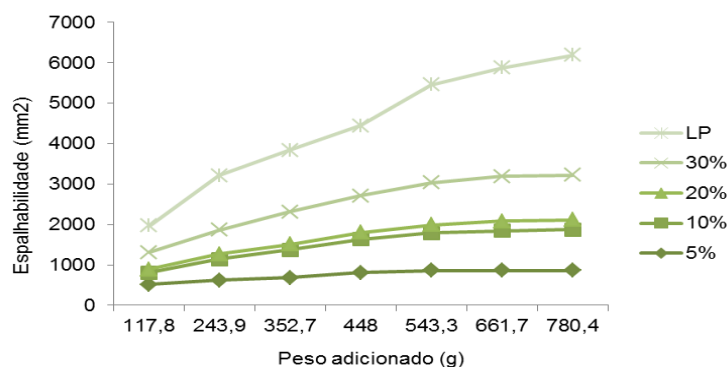


Figura 28: Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo EEMT em diferentes concentrações

A análise estatística revelou que os valores de espalhabilidade foram estatisticamente diferentes para as formulações (5 a 30%) a medida que os pesos pré determinados foram adicionados.

#### 4.6.1.2 Determinação do FPS

O resultado da avaliação do FPS das formulações contendo extrato de *M. taxifolia* (5, 10, 20 e 30%) foi satisfatório, pois as mesmas apresentaram um FPS  $\geq 6$  na diluição a partir de 2,0 mg/mL (Figura 29). Para a espécie investigada, observou-se que na diluição de 50,0 mg/mL, o FPS foi próximo do padrão BZ3 a 5%, fator de proteção na faixa de 30,0 - 50,0, sugerindo, de acordo com a RDC ANVISA nº 30/12, que as formulações podem ser adequadas para pele muito sensíveis a queimadura solar devido ao seu elevado índice de proteção solar.



Analisando estatisticamente os valores de FPS, podemos ver que as formulações com extrato de *M. taxifolia* 10% e 20% mostraram os mesmos valores de FPS para a diluição de 0,2 mg/mL. E as formulações a 20% e 30% para uma concentração de 20,0 mg/mL também foram estatisticamente iguais. O mesmo é válido para a concentração de 50,0 mg/mL e a formulação padrão de 5% de benzofenona.

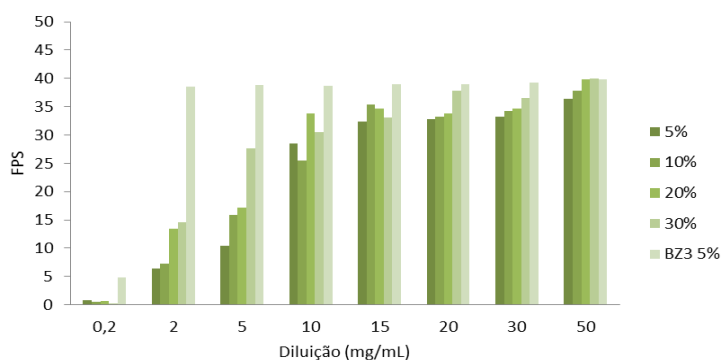


Figura 29: Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo EEMT

#### 4.6.1.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA

Ao analisar o perfil fotoprotetor UVA das formulações (Figura 30), constatou-se que as mesmas não obtiveram um desempenho tão satisfatório quanto comparado ao extrato bruto, na primeira avaliação, no t120 o teor do *trans*-RVs era em torno de 85%, na análise das formulações nos primeiro 20 minutos já estava em torno de 74% e ao final dos 120 minutos de observação as concentrações de RVS para as formulações com EEMT a 5, 10, 20 e 30% foram respectivamente, 55,22; 55,24; 51,04 e 46,70%. Este teor pode ser considerado baixo já que após o mesmo tempo de exposição do CC teve um teor de 40,49% do *trans*-RVS.

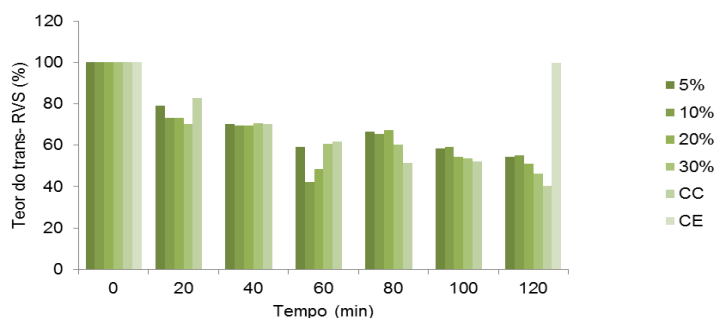


Figura 30: Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo EEMT

Por meio dos resultados estatísticos, foi possível observar que as análises foram estatisticamente diferentes quando comparados os intervalos de tempo. A diferença estatística só não foi observada entre os tempos T60 e T100 para a concentração de 5% do EEMT e, 30% para os tempos T60 e T80, em que o tempo parece não influenciar no teor do RVS, visto que já completou a degradação.

## 4.2 Extrato Etanólico de *Marcetia macrophylla*<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Os resultados obtidos com a *M. macrophylla* foram submetidos na forma de artigo ao periódico International Journal of Cosmetic Science com o título “*In vitro* evaluation of the *Marcetia macrophylla* ethanolic extract as a natural antisolar agent: characterization of sunscreen formulations” (ANEXO 02)

#### 4.2.1 Análise do EEMM por CLAE-DAD

O cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEMM está apresentado na Figura 31. Os espectros de UV (APÊNDICE M) demonstraram a presença de região de flavonoides hidroxilados entre os Tr: 10-15 min. A presença da quercetina foi caracterizada utilizando o padrão analítico [Tr: 14,36 min (Pico 6)]

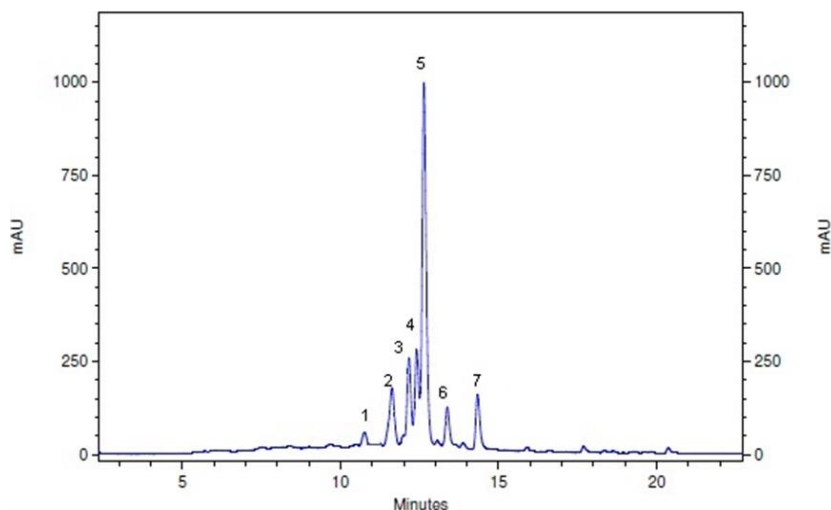


Figura 31: Cromatograma CLAE-DAD do EEMM

Análises por CLAE-DAD do extrato de *Crataegus*, rico em flavonoides, em condições cromatográficas semelhantes aplicadas aos extratos de *Marsetia* ssp., mostrou perfil cromatográfico similar no âmbito da eluição dos compostos flavonoídicos pela coluna visto que os espectros de UV mostraram dois máximos de absorção (banda I e banda II) característico de um esqueleto flavon ou flavonol. Os compostos que eluíram primeiro apresentaram um mínimo a 280 nm e uma absorção de banda I superior a 350 nm, de acordo com a estrutura flavonol. A banda II de absorção cerca de 265 nm indicaram que as partes glicosiladas (CUYCKENS e CLAEYS, 2002).

A quantificação da QUE foi feita usando mesma a equação da reta que permitiu a quantificação deste flavonoide no EEMT, assim a concentração de QUE presente em EEMM foi de 0,15 mg/mL o que corresponde a 40,66 g por kg de planta seca, dentro, portanto, do LD (0,011) e LQ (0,04).

#### 4.2.2 Teor de Flavonoides Total (TFT) e atividade antioxidante (AA)

O TFT foi calculado por equivalente de QUE, mostrando 0,122  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina a cada 10 mg do extrato etanólico. Existem diversos métodos para avaliar a capacidade de um extrato/substância em promover a atividade antioxidante, sendo que a metodologia adotada enfoca a captação do RL (DPPH•). O EEMM foi avaliado nas concentrações de 250, 125, 50, 25, 10, 5,0 mg/mL e comparado com os padrões BHT e ácido ascórbico. A tabela 11 mostra a atividade antioxidante do EEMM, ao comparar os valores percentuais de sequestro radicais livres (SRL%) entre EEMM e os padrões, fica evidente EEMM apresenta boa AA. Os valores  $\text{CE}_{50}$  para EEMM, BHT e ácido ascórbico foram  $2,948 \pm 0,625$ ;  $8,152 \pm 0,365$ ;  $1.857 \pm 0.280$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estes resultados indicam que EEMM mostrou uma atividade antioxidante mais pronunciada do que o BHT.

Tabela 11: Atividade antioxidante (%) do EEMM

	SRL (%)					
	250*	125	50	25	10	5
EEMM	95,61 $\pm$ 0,018	94,60 $\pm$ 0,022	93,61 $\pm$ 0,027	92,99 $\pm$ 0,029	56,17 $\pm$ 0,018	17,85 $\pm$ 0,034
BHT*	94,64 $\pm$ 0,068	94,07 $\pm$ 0,075	86,58 $\pm$ 0,017	57,16 $\pm$ 0,054	30,20 $\pm$ 0,084	18,38 $\pm$ 0,010
AA**	97,03 $\pm$ 0,037	96,62 $\pm$ 0,043	96,98 $\pm$ 0,038	96,57 $\pm$ 0,046	74,32 $\pm$ 0,032	24,60 $\pm$ 0,091

\* $\mu\text{g/mL}$ ; \*\*di-terc-butil metil fenol; \*\*\* ácido ascórbico

#### 4.2.3 Fator de Proteção Solar

O EEMM mostrou atividade fotoprotetora satisfatória com valores de FPS 10,32 e 20,25 para as concentrações 125 e 205  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 32), respectivamente. As demais concentrações apresentaram  $\text{FPS} \leq 6$ . De acordo com a ANOVA, o FPS nas concentrações 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  não diferiram estatisticamente, mas os demais foram estatisticamente diferentes com valor de  $p < 0,05$ .

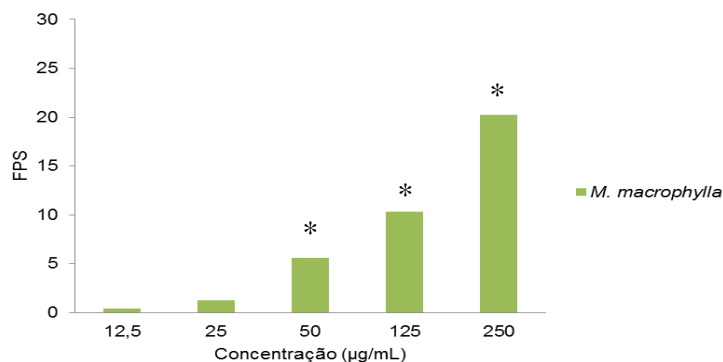


Figura 32: Perfil de fotoproteção UVB do EEMM

#### 4.2.4 Atividade fotoprotetora UVA

O EEMM apresentou uma boa atividade fotoprotetora frente a degradação do *trans*-RVS, visto que no intervalo de tempo de 120min, na primeira avaliação aos 20 min, o teor do *trans*-RVS foi de 88,33% e ao final do experimento t120, 78,09%, caindo em aproximadamente 10%% (Figura 33). Ao comparar com o CC, é possível inferir que o EEMM, tem uma boa proteção contra a radiação UVA, pois o CC apresentou uma degradação de 40,49% do *trans*-RVS na amostra.

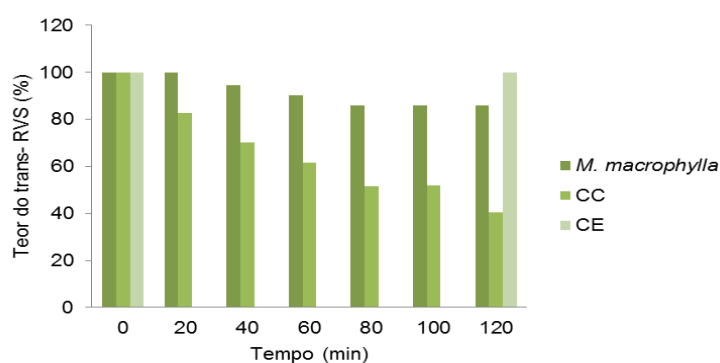


Figura 33: Perfil de fotoproteção UVA do EEMM

#### 4.2.5 Avaliação da toxicidade

##### 4.2.5.1 Teste em membrana corionalantóide em ovos de galinha (HET-CAM)

A tabela 12 trás os valores do ensaio HET-CAM obtidos a partir da aplicação do EEMM sobre a CAM, como pode ser observado o PI do extrato foi

de irritação severa a moderada, o que faz com que tenha-se ressalvas quanto a utilização do mesmos em produtos farmacêuticos, como protetores solar, por exemplo.

Tabela 12: Classificação do Potencial de Irritação Ocular do EEMM pelo ensaio HET-CAM do EEMM

	Concentração (µg/mL)	PI	Classificação
EEMM	250	10,49	irritação severa
	125	10,46	irritação severa
	62,5	6,61	irritação moderada
NaOH 0,1 M*	0,1M	12,6	irritante
Água destilada**	-	0,0	não irritante

\*controle positivo; \*\*controle negativo

#### 4.2.5.2 Atividade Hemolítica

Ao avaliar a atividade hemolítica do EEMM confirmou-se a toxicidade do extrato para a concentração de 250 µg/mL com uma taxa de hemólise de  $54,36 \pm 0,0200\%$  (Figura 34). E o ensaio estatístico mostrou que os valores apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

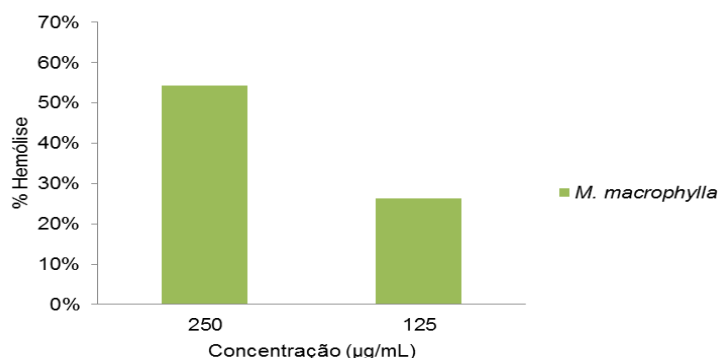


Figura 34: Avaliação da atividade hemolítica do EEMM

#### 4.2.6 Avaliação do perfil fotoprotetor UVB/UVA *in vitro* das formulações contendo EEMM

Após o preparo, as formulações contendo diferentes concentrações do EEMM (5, 10, 20 e 30%) e o filtro solar contendo BZ3 (5%) foram deixadas em repouso por 24 horas. Depois, as amostras foram submetidas à avaliação de

características organolépticas, análise de pH e teste de centrifugação, espalhabilidade como forma de verificar a estabilidade das mesmas

#### 4.2.6.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações

Por meio da análise macroscópica foi possível observar que todas as formulações foram homogêneas, com odor característico do extrato de *M. macrophylla*. Uma consistência mais fluida foi observada nas concentrações de 20 e 30% de extrato etanólico. A cor das amostras foi determinada pela cor do extrato, castanho claro, variando em intensidade como uma maior proporção de extrato que foi incorporada a loção polawax<sup>®</sup> (Figura 35).

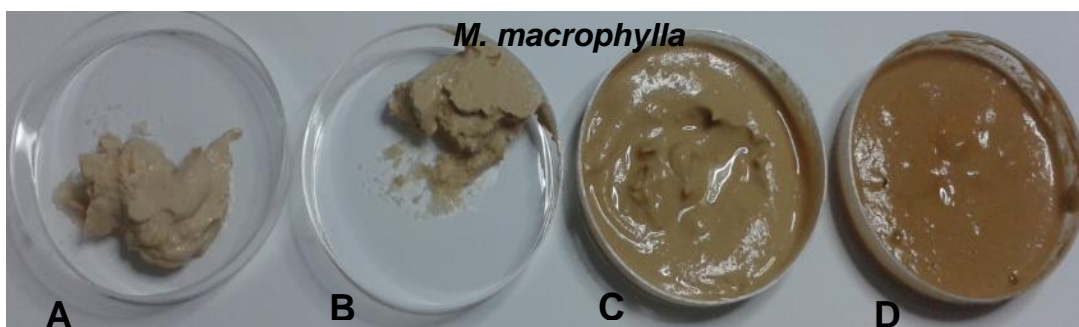


Figura 35: Apresentação do aspecto visual das formulações contendo diferentes concentrações do EEMM. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)

Os resultados do pH das formulações estudadas são mostrados na Tabela 13. Uma vez formulados, o pH foi medido e ajustado com trietanolamina a pH 6,0 a 7,0, que é o pH desejável para a proteção solar, baixo valor de pH pode ser associado com o aparecimento de irritação cumulativa da pele (LEONARDI, 2002; PROENÇA, *et al.*, 2009; FRANGE e GARCIA, 2009)

Tabela 13: Média e desvio padrão dos valores de pH das formulações contendo EEMM

Formulação (%)	pH sem correção	pH com correção*
5	5, 11 ± 0,041 <sup>a</sup>	6, 41 ± 0,180
10	5, 24 ± 0,045 <sup>a</sup>	6, 73 ± 0,145
20	4, 62 ± 0,070 <sup>b</sup>	6, 71 ± 0,265
30	4, 48 ± 0,062 <sup>c</sup>	6, 45 ± 0,065

\* Não apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ). a, b, c: as médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey



Após 30 minutos a 3.000 rpm, centrifuga, não foi observado separação de fases, não existindo, portanto, a necessidade de reformulação (Figura 36).

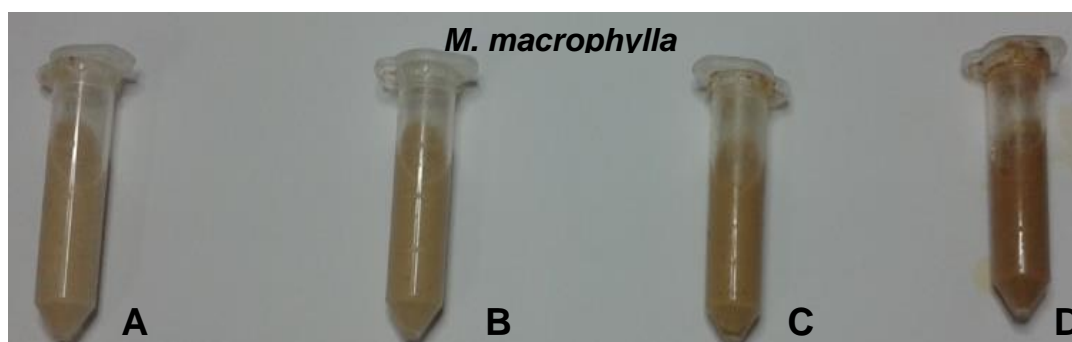


Figura 36: Características das formulações contendo diferentes concentrações do EEMM após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20%(C) e 30%(D)

Os resultados da Tabela 14 correspondem ao fator de espalhabilidade das formulações com diferentes concentrações do EEMM. Observando-se o fator de espalhabilidade aumentou na concentração de 10% e voltou a reduzir como o aumento da concentração para 20 e 30% do referido extrato.

Tabela 14: Fator de espalhabilidade ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ) das formulações contendo EEMM em diferentes concentrações

Formulação EEMM (%)	Fator de espalhabilidade
5	$1,20 \pm 0,34$
10	$1,40 \pm 0,37$
20	$1,41 \pm 0,105$
30	$1,43 \pm 0,16$
Loção polawax®	$0,26 \pm 0,230$
*Loção BZ3	$6,89 \pm 0,085$

\*5%

Quanto à espalhabilidade das formulações contendo o EEMM (Figura 37), observou-se que o aumento do peso impresso as amostras não resultou em aumento significativo da espalhabilidade das formulações, apesar dos valores de espalhabilidade serem estatisticamente diferentes. E houve uma redução da mesma quando comparado com a loção polawax®

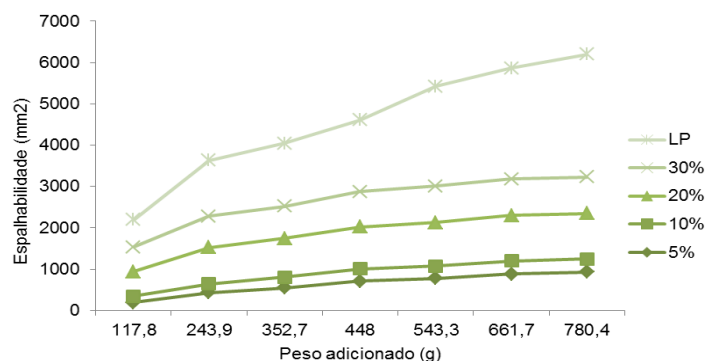


Figura 37: Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo EEMM em diferentes concentrações

#### 4.2.6.2 Determinação do FPS

A figura 38 mostra os resultados de FPS de formulações contendo EEMM. Para este estudo, considerou-se que as formulações com um FPS  $\geq 6$  tem atividade fotoprotetora, o que corresponde ao valor mínimo necessário para um produto a ser considerado fotoprotetor de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2012b)

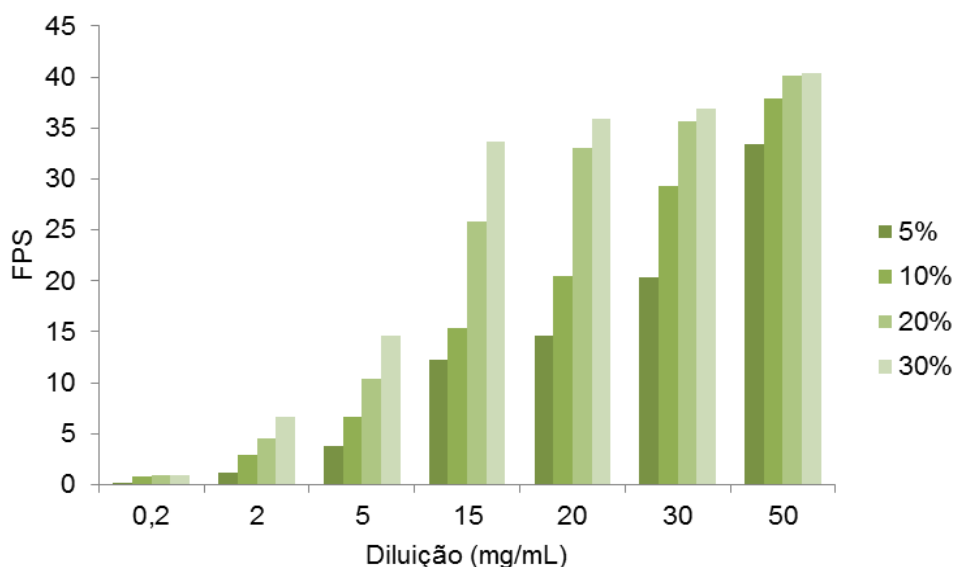


Figura 38: Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo EEMM

As formulações contendo o extrato etanólico quando diluída para 0,2 mg/mL mostrou FPS  $\leq 6$ . Os valores de FPS aumentaram a proporcionalmente ao aumento da concentração de EEMM em cada formulação. Todas as concentrações de 10,0 a 50,0 mg/mL mostraram atividade fotoprotetora

satisfatória ( $SPF \geq 6$ ), inclusive, quando comparado com a formulação padrão de BZ3. Isso confirma que o FPS é dose-dependente (PROENÇA *et al.*, 2009)

Observou-se para as diluições de 30,0 mg/mL e 50,0 mg/mL, que as formulações com extrato de EEMM em 20% (FPS 33,00 e 35,67) e 30% (FPS 35,88 e 36,90) foram estatisticamente iguais. Isto indica que as formulações podem ser adequadas para pele muito sensível a queimadura solar, devido ao seu alto FPS já na concentração de 20%, como demonstrado na metodologia *in vitro*.

#### 4.2.6.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA

A avaliação do perfil fotoprotetor das formulações com o extrato etanólico de *M. macrophylla* (Figura 39), no t20 foi entre 92,33 – 83,44% e na metade do experimento (t60) o teor do *trans*-RVS ficou entre 73,53 – 71,29%, a qual foi decaindo gradativamente até uma faixa de 59,65 – 58,56% (t120), ou seja, valor cerca de 20% superior ao CC, no mesmo intervalo de tempo, 40,49%.

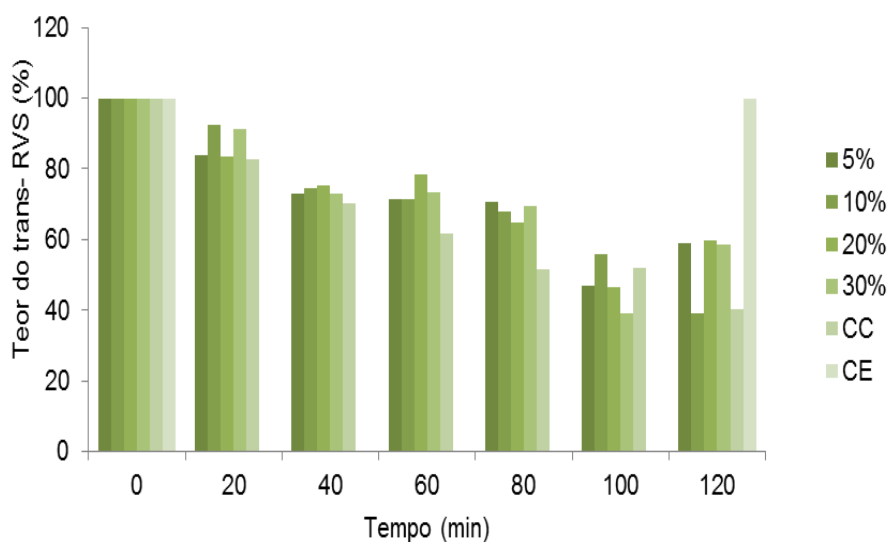


Figura 39: Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo EEMM

### **4.3 Extrato Etanólico *Marcetia latifolia***

#### 4.3.1 Análise do EEML por CLAE-DAD no EEML

As características flavonoídicas apresentadas pelo extrato etanólico de *M. latifolia* é semelhante um estudo recente na mesma espécie em que as análises CLAE-DAD demonstraram os picos flavonoídicos aparecem na faixa de 8 a 10 minutos. Em análise usando padrões artificiais constatou-se que os flavonoides glicosilados (hesperidina, naringina e rutina) eluem próximo a 10 minutos, enquanto quercetina e a calicopterina tiveram Tr acima dos 12 minutos. Assim, três regiões de eluição foram determinadas neste sistema: flavonoides glicosilados (entre 8 e 10 minutos), hidroxilados (aproximadamente 12 minutos) e polimetoxilados (14-17 minutos) (LEITE *et al.*, 2012).

No cromatograma (Figura 40) e espectros de UV (APÊNDICES N, O e P) do EEML observa-se que nos Tr 10 a 13 min, picos 01 – 07 têm-se um perfil de flavonol (banda II: 250 -280 nm e banda I: 350 – 385 nm) e flavonas (banda II: 250 -280 nm e banda I: 310 – 350 nm) glicosilados, uma região de flavonol hidroxilado entre 14 – 17 mim. No Tr em 17,04 min tem-se um fenol simples. No Tr: 18 – 21 min tem-se uma região de flavonas polimetoxiladas. Os picos 08 (Tr 14,43) e 16 (Tr: 18,40 min) foram identificados como QUE e calicopterina, respectivamente, utilizando-se padrões.

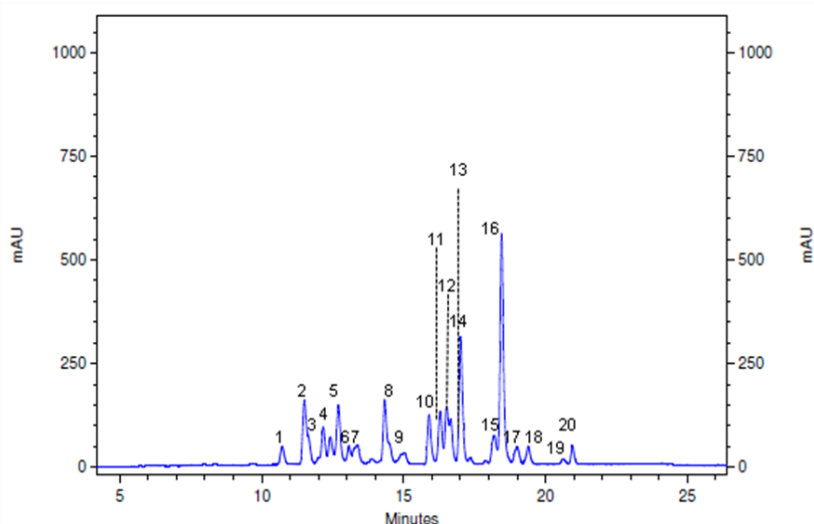


Figura 40: Cromatograma CLAE-DAD do EEML

Observa-se que os grupos hidroxilas nas posições C3, C5 ou C4' dos núcleos flavonas ou flavonóis são metilados ou glicosilados, ocorrem desvios hipsocrômico, principalmente na banda de maior comprimento de onda (banda

l), fato este que pode ser observado nos espectros de UV das espécies de *Marcetia* (LIANDA, 2009)

Após a constatação da presença dos flavonoides quercetina e calicopterina no EEML (Tabela 15), a quantificação da QUE foi feita usando mesma a equação da reta que permitiu a quantificá-la nos EEMT e EEMM. A calicopterina, quantificada segundo a equação  $y = 70000000x + 86268$ . Os resultados da quantificação da calicopterina foram dentro do LD (0,0037) e do LQ (0,0123) enfatizando a confiabilidade do método. A precisão e exatidão das medições estavam dentro dos valores admissíveis.

Tabela 15: Quantificação da quercetina e calicopterina em no EEML por CLAE-DAD

Espécie	Quantificação*	Teor de QUE**	Quantificação*	Teor de calicopterina**
	QUE ( $\lambda=251, 375$ )		Calicopterina ( $\lambda=277, 338$ )	
<i>M. latifolia</i>	0,28	16,48	0,089	5,23

\*Em 20  $\mu$ L de amostra; \*\*Em g por Kg de planta seca.

As diferenças individuais entre os subgrupos, flavanóil, flavanonas, flavononas, flavonas, resulta de uma variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, pelo grau de metilação e glicosilação, que tem como sítio preferencial de ligação a posição 3, as quais se refletem em diversos aspectos dos flavonoides, em especial, a hidrofobicidade das moléculas. Aspectos estes que são bastante evidentes no cromatograma da *M. latifolia*. E nas outras espécie, *M. taxifolia* e *M. macrophylla*, os subgrupos, flavona e flavonol, hidroxilados nas posições 3' e 4' do anel B, foram os mais facilmente encontrados e com substituições hidroxilas na posição 3, como descrito na literatura (CALIXTO e YUNES; 2001).

A diferença entre as quantidades de flavonoides nas espécies de *Marcetia* pode ser atribuída a fatores ambientais que influenciam na produção de flavonoides nas plantas, como, por exemplo, temperatura, nutrição, injúria e qualidade de radiação. Sendo que este último é um dos fatores que, geralmente, está relacionado á variação quantitativa (SANTOS e BLATT, 1998)

Em plantas terrestres primitivas a produção de flavonoides pode ter sido demasiadamente baixa para a captura dos radicais livres e filtração da radiação UV. Então com a evolução das espécies, o metabolismo vegetal foi ficando mais

eficiente e os flavonoides passaram a exercer a função de sequestro de RL e fotoproteção, isto pode ser explicado pelos flavonoides hidroxilados, os quais tiveram sua rota de síntese intacta e são quase, que exclusivamente, envolvidos na respostas a alta exposição solar (SANTOS e BLATT, 1998; AGATI *et al.*, 2013)

Trabalhos relatam uma elevação no quantitativo de flavonoides em órgãos expostos à luz quando comparados com aqueles não expostos, apesar de estudos recentes mostrarem que os raios UVB não são pré-requisitos para a biossíntese de flavonoides, mas os mesmos fazem relato que alguns flavonoides são, realmente sensíveis a radiação elevada, estes são os caracterizados pela presença do grupamento catecol no anel B do esqueleto flavonoídico (SANTOS e BLATT, 1998; AGATI *et al.*, 2013).

Especula-se que o metabolismo de flavonoides podem ter evoluído, principalmente, para evitar e combater o excesso de estresse oxidativo induzido por luz, independentemente de diferentes comprimentos de onda solar que atinge a superfície da terra, os quais foram os primeiros desafios enfrentados plantas em terra (AGATI *et al.*, 2013).

#### 4.3.2 Teor de flavonoides total (TFT) e atividade antioxidante (AA)

O TFT no EEML foi  $98 \pm 0,75 \mu\text{g} / \text{mL}$  de quercetina a cada 10 mg do extrato etanólico. O resultado da avaliação da atividade antioxidante pode se visto na tabela 16. Os valores  $\text{CE}_{50}$  para EEML, BHT e ácido ascórbico foram  $2,948 \pm 0,625$ ;  $8,152 \pm 0,365$ ;  $1,857 \pm 0,280 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Estes resultados indicam que EEML mostrou uma atividade antioxidante mais pronunciada do que o BHT.

Tabela 16: Atividade antioxidante (%) do EEML

	SRL(%)					
	250*	125	50	25	10	5
EEML	$95,45 \pm 0,058$	$94,22 \pm 0,073$	$93,52 \pm 0,820$	$86,73 \pm 0,016$	$58,70 \pm 0,052$	$27,55 \pm 0,092$
BHT*	$94,64 \pm 0,068$	$94,07 \pm 0,075$	$86,58 \pm 0,017$	$57,16 \pm 0,054$	$30,20 \pm 0,084$	$18,38 \pm 0,010$
AA**	$97,03 \pm 0,037$	$96,62 \pm 0,043$	$96,98 \pm 0,038$	$96,57 \pm 0,046$	$74,32 \pm 0,032$	$24,60 \pm 0,091$

\* $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; \*\* di-terc-butil metil fenol; \*\*\* ácido ascórbico

### 4.3.3 Fator de Proteção Solar

A avaliação do FPS *in vitro* do EEML mostrou atividade fotoprotetora contra a radiação UVB (concentrações 125 – 250 µg/mL), com valores de FPS > 6 (BRASIL, 2012b), sendo 7,12 e 13, respectivamente (Figura 41). Pela análise do gráfico é possível inferir que o FPS é um valor dependente da concentração das amostras, assim como as demais espécies de *Marsetia* estudadas. De acordo com a ANOVA, o FPS do EEML nas concentrações 12,5 (FPS: 0,92) e 25 µg/mL (FPS: 1,11) não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

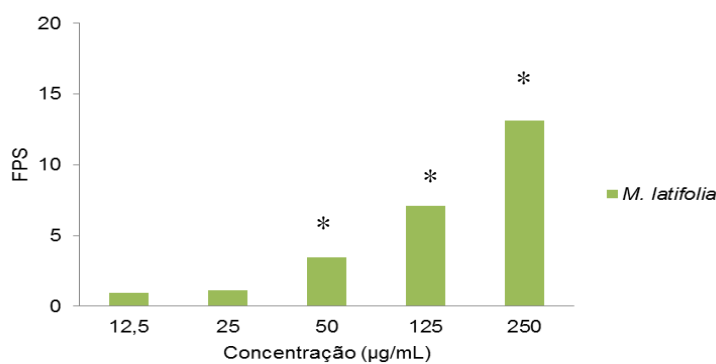


Figura 41: Perfil de fotoproteção UVB do EEML

O EEML apresentou valores de FPS superiores a outras espécies vegetais. Extratos aquosos a 10% de *Achillea Millefolium* e *Sonchus oleraceus* apresentaram atividade fotoprotetora com valores de FPS de 8 e 6, respectivamente (ROSA *et al.*, 2008). Ainda em estudos recentes foi possível verificar que entre *Azadirachta indica*, *Oscimum sanctum*, *Aloe vera*, *Carica papaya*, *Lycopersicon esculantum* e *Mentha piperita*, apenas as duas últimas apresentaram FPS acima do mínimo recomendado pela ANVISA, com valores de 6,08 e 8,18, respectivamente (GUPTA, 2013) e outros estudos avaliando-se a atividade fotoprotetora de extratos aquosos de frutas (mamão, melão, morango coco) apenas o coco teve atividade fotoprotetora, FPS: 7,28 (MALSAWMTLUANGI *et al.*, 2013). O extrato etanólico de *Garcinia brasiliensis*, rico em benzofenonas e biflavonoides, também apresentou um bom resultado de FPS (18,5) em uma solução de 100 mg/mL (FIGUEREDO *et al.*, 2014). A espécie que mostrou valor de FPS, próximos ao de *Marsetia* ssp foi a



*Pothomorphe umbellata*, na qual o extrato EtOH: H<sub>2</sub>O, sob avaliação *in vitro*, apresentou um FPS de 21,53 (DA SILVA *et al.*, 2005)

#### 4.3.4 Atividade fotoprotetora UVA

Dentre as espécies de *Marsetia* investigadas a que apresentou melhor desempenho foi a *M. latifolia*, na qual a solução degradou apenas 7,62% da solução de RVS, ou seja, ao final da exposição ainda tinha uma concentração de 92,38% do *trans*-RVS. Valores são satisfatórios quando comparados com os controles claro (CC) e escuro (CE), que apresentaram, respectivamente, ao final dos 120 min, 40,49% e 99,78%, permitindo inferir que a fotoproteção contra a radiação UVA pode ser proveniente das amostras estudadas (Figura 42).

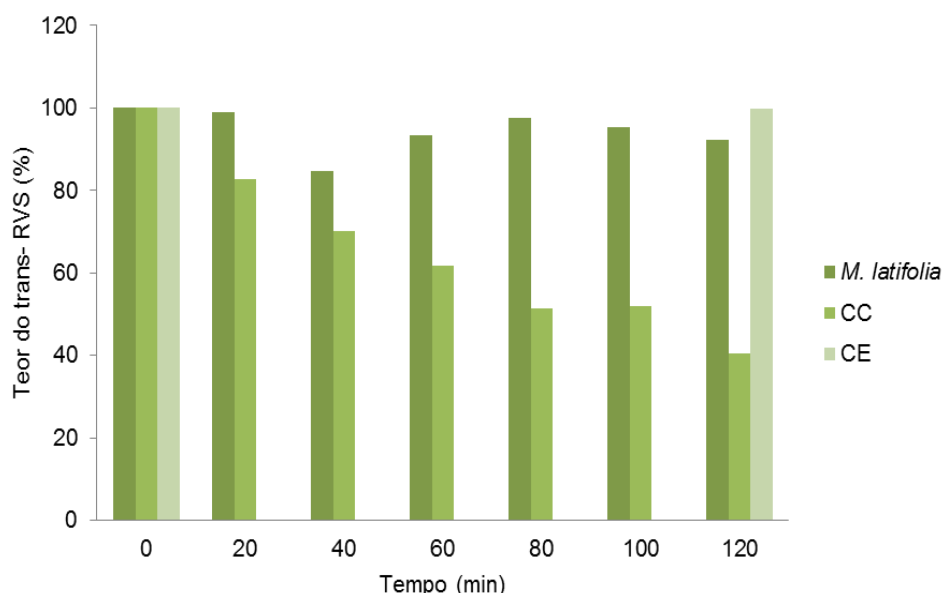


Figura 42: Perfil de fotoproteção UVA do EEML

O teste de Tukey foi aplicado para avaliar as formulações no decorrer de 120 minutos com o intuito de sugerir qual o extrato minimizou a transformação do *trans*-resveratrol em *cis* por meio da degradação pela radiação UVA. Desta forma podem-se constatar que o EEML teve um bom desempenho frente a proteção UVA foi o EEML, pois proporcionou proteção UVA constante durante todo o experimento. Para o EEML não diferiram estatisticamente, com valor de  $p < 0,05$  os tempos  $t_{40}/t_{60}$ ,  $t_{80}/t_{100}$ ,  $t_{120}/t_{80}$  e  $t_{120}/t_{100}$ .

#### 4.3.5 Avaliação da toxicidade do EEML

##### 4.3.5.1 Teste em membrana corionalantóide de ovos de galinha (HET-CAM)

Ao comparar os valores de graduação dos fenômenos irritantes obtidos em função do tempo decorrido para sua ocorrência e concentração das amostras com a tabela de classificação do grau de irritação do extrato avaliado (Tabela 17), obtém-se a classificação final de *M. latifolia* como irritante fraco a não irritante.

Tabela 17: Classificação do Potencial de Irritação Ocular do EEML pelo ensaio HET-CAM

	Concentração (µg/mL)	PI	Classificação
EEML	250	2,43	irritação fraca
	125	1,17	irritação fraca
	62,5	0,26	não irritante
NaOH 0,1 M*	0.1M	12,6	irritante
Água destilada**	-	0, 0	não irritante

\*controle positivo; \*\*controle negativo

##### 4.3.5.2 Atividade hemolítica

As amostras de *M. latifolia* apresentaram uma atividade hemolítica de  $23,51 \pm 0,032$  e  $21,56 \pm 0,015$  % para as concentrações de 250 e 125 µg/mL, respectivamente (Figura 43). Análise estatística revelou que o percentual hemolítico o EEML foi estatisticamente diferente, para as concentrações utilizadas neste estudo, com  $p < 0,05$

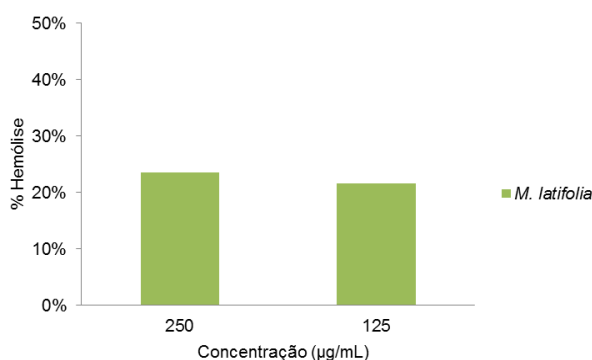


Figura 43: Avaliação da atividade hemolítica do EEML

#### 4.3.6 Avaliação do potencial fotoprotetor das formulações contendo EEML

##### 4.3.6.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações

As formulações desenvolvidas com o EEML apresentaram coloração castanho escuro, coloração correspondente ao extrato etanólico bruto. E assim como nas outras formulações desenvolvidas, estas também foram apresentando coloração mais intensa a proporção que uma concentração maior do EEML foi sendo incorporado à loção polawax<sup>®</sup> (Figura 44).

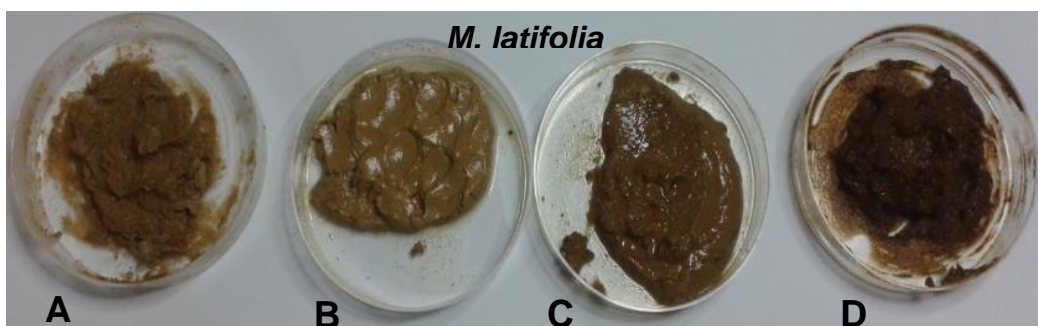


Figura 44: Apresentação do aspecto visual cores das formulações contendo diferentes concentrações do EEML: 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)

Todas as formulações apresentaram um pH ácido (Tabela 18) e tiveram seus valores corrigidos com trietanolamina para ajuste a valores biocompatível com a pele.

Tabela 18: Média e desvio padrão dos valores de pH das formulações contendo EEML

Formulação (%)	pH sem correção	pH com correção*
5	4,35 ± 0,151 <sup>a</sup>	6,75 ± 0,0187
10	4,09 ± 0,051 <sup>b</sup>	6,56 ± 0,296
20	3,47 ± 0,052 <sup>d</sup>	6,58 ± 0,119
30	3,63 ± 0,098 <sup>c</sup>	6,55 ± 0,340

\*Não apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ). a, b, c, d: as médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey

As amostras foram submetidas ao teste de centrifugação e as mesmas não exibiram separação de fases, não existindo, portanto, a necessidade de reformulação de reformulação. A Figura 45 demonstra o aspecto físico das formulações após teste de centrifugação.

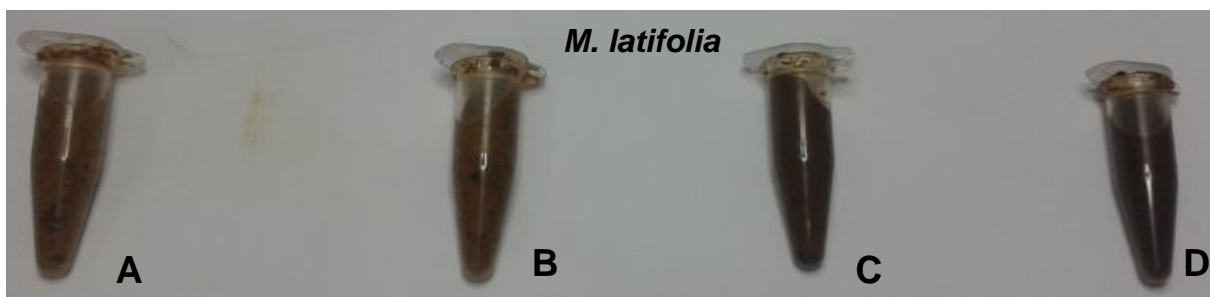


Figura 45: Características das formulações contendo diferentes concentrações do EEML após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)

Foi possível observar que com o aumento da concentração do EEML nas formulações o Fator de Espalhabilidade aumentou, de modo geral, após adição das frações, houve um aumento na relação entre a área e o esforço limite ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ), quando comparada com a loção polawax<sup>®</sup>. Sugere-se que a diminuição da espalhabilidade ocorreu após a incorporação das frações, pois a mesma proporcionou uma maior consistência que a loção, diminuindo consequentemente sua espalhabilidade (LANGE *et al.*, 2009). Apesar da diminuição da espalhabilidade após adição do extrato, a formulação apresentou bons resultados, visto que essa variação não modificou bruscamente a consistência e fluidez (Tabela 19) (Figura 46).

Tabela 19: Fator de espalhabilidade ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ) das formulações contendo EEML em diferentes concentrações

Formulação EEML (%)	Fator de espalhabilidade
5	$0,40 \pm 0,054$
10	$0,42 \pm 0,245$
20	$0,45 \pm 0,002$
30	$0,48 \pm 0,055$
Loção polawax <sup>®</sup>	$0,26 \pm 0,230$
*Loção BZ3	$6,89 \pm 0,085$

\*5%

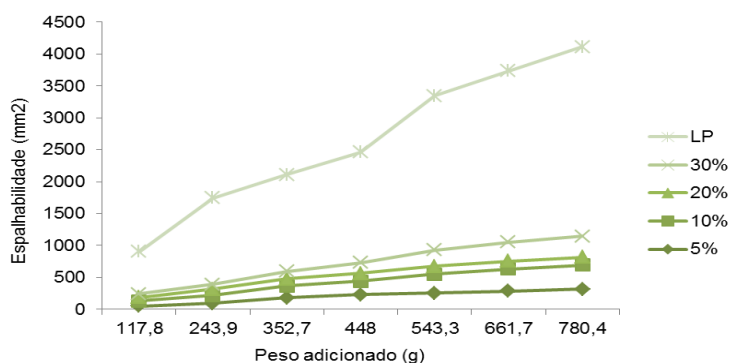


Figura 46: Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo EEML em diferentes concentrações

#### 4.3.6.2 Determinação do FPS

As formulações contendo 5, 10, 20 e 30% do EEML apresentaram valores de FPS  $\geq 6$  para todas as concentrações na diluição acima de 2,0 mg/mL. Sendo que a partir da diluição 15 mg/mL todas as formulações apresentaram valores de FPS  $> 31$ , podendo ser consideradas de alta proteção. Também foi constatado que a partir da diluição 20 mg/mL não houve um aumento significativo do FPS, o FPS máximo alcançado para a formulação com 30 % de EEML foi 43,10 (alta proteção), como pode ser observado na figura 47.

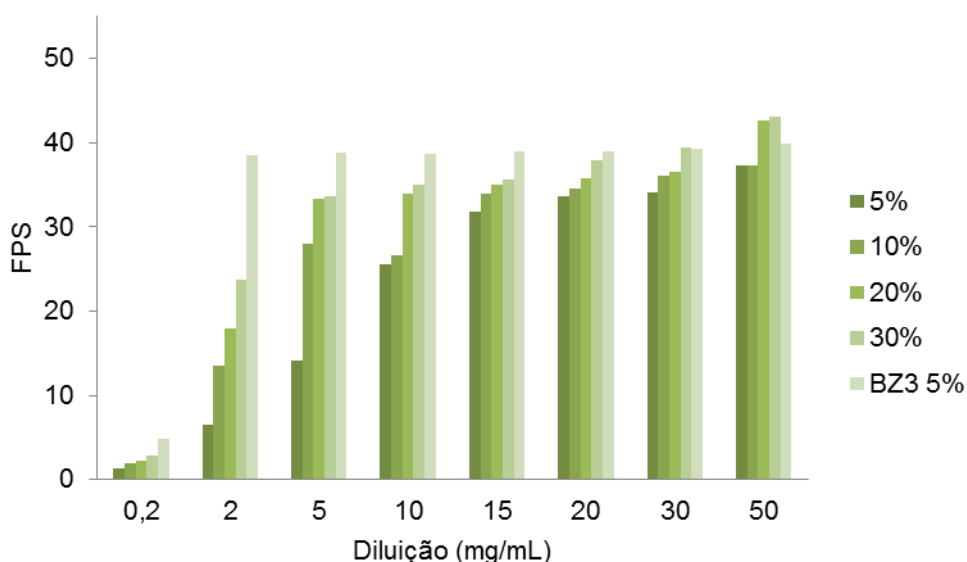


Figura 47: Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo EEML

#### 4.3.6.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA

As formulações contendo o EEML apresentaram uma atividade fotoprotetora bastante significativa, a formulação contendo 5% do extrato, no t120 ainda apresentou um teor de 68,54% do *trans*-RVS e a proteção UVA foi aumentado a proporção que se aumentou a concentração do EEML para 10, 20 e 30%, no t120 o teor do *trans*-RVS, foram, respectivamente, 75,70, 81,27 e 82,93 % (Figura 48). Este bom resultado pode ser comprovado quando observa-se que ao final o tempo de observação a amostra CC teve, aproximadamente, 60% do *cis*-RVS.

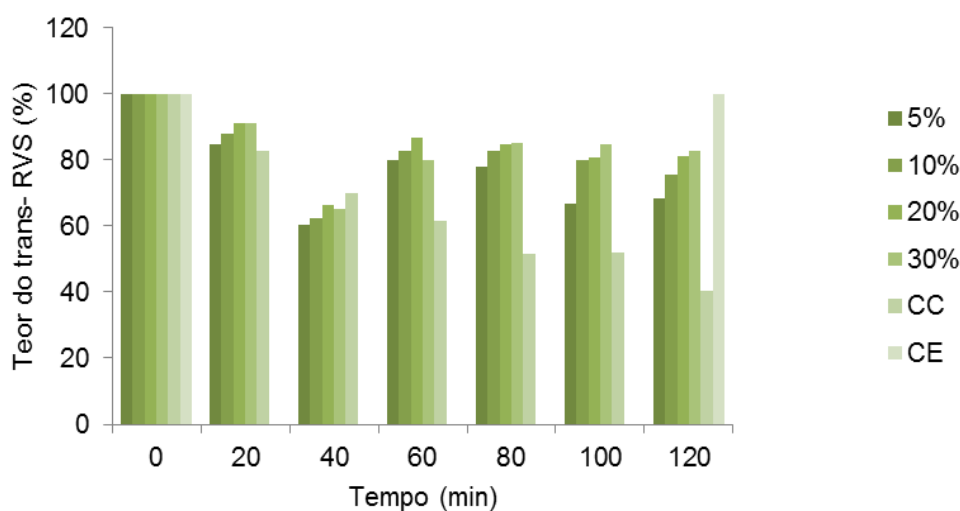


Figura 48: Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo EEML.

#### **4.4 Investigação do Potencial Fotoprotetor da Espécie de *Marcetia* com maior Potencial para Aplicabilidade em Fitocosmético**

Após avaliação dos extratos de *M. latifolia*, *M. taxifolia* e *M. macrophylla* verificou-se que *M. latifolia* se mostrou mais segura conforme os ensaios de toxicidade (Tabela 20), mesmo *M. macrophylla* apresentando os melhores resultados quanto aos ensaios de fotoproteção para o extrato bruto. Desta forma o extrato etanólico de *M. latifolia* foi fracionado. As frações obtidas também foram avaliadas por CLAE-DAD sob as mesmas condições cromatográficas dos extratos brutos. Foram determinados, ainda, o TFT e AA. Foram investigadas, *in vitro*, a segurança toxicológica e propriedades fotoprotetoras UVB e UVA, sendo que as frações de *M. latifolia* foram incorporadas em loção polawax<sup>®</sup>, tiveram alguns parâmetros de estabilidade de estabilidade avaliados. As que se mostraram estáveis foram, então submetidas aos testes de fotoproteção contra radiação UVB/UVA e, então o EEML apresentou o melhor potencial fotoprotetor UVA (Tabela 21), o que corroborou para escolha desta espécie a ser estudada a seguir.

Tabela 20: Comparação dos resultados obtidos a partir das análises dos extratos etanólicos das espécies de *Marcetia*

	EEMT	EEMM	EEML
Quantificação da QUE (g)	55,78	40,66	16,48
TFT (µg/mL)	168	122	98
EC <sub>50</sub>	5,132 ± 1,078	2,948 ± 0,625	2,297 ± 1,267
FPS**	15,52	20,25	13,12
Fotoproteção UVA (%)***	92,38	86,04	78,09
HET-CAM*	Irritabilidade fraca	Irritabilidade severa	Irritabilidade fraca
Hemólise (%)**	66,55	54,36	23,51

\*por Kg de planta seca; \*\* 250µg/mL, \*\*\* t120

Tabela 21: Comparação do potencial fotoprotetor das formulações contendo 30% dos extratos etanólicos das espécies de *Marcetia*

	EEMT	EEMM	EEML
FPS*	39,92	40,33	43,10
Fotoproteção UVA (%)#	46,27	58,56	82,93

\*50 mg/mL; # t120



#### 4.4.1 Fracionamento do EEML e análise das suas frações por CLAE-DAD

As frações resultantes do fracionamento do EEML foram cromatografadas em CLAE-DAD nas mesmas condições cromatográficas aplicadas aos extratos brutos. Após análise do perfil cromatográfico UV das frações, as mesmas foram reunidas resultando em 5 frações denominadas: MLFR02, MLFR03, MLFR04, MLFR05, MLFR06.

As frações tiveram seu perfil flavonoídico analisado por CLAE-DAD obtendo-se os respectivos cromatogramas (Figura 49).

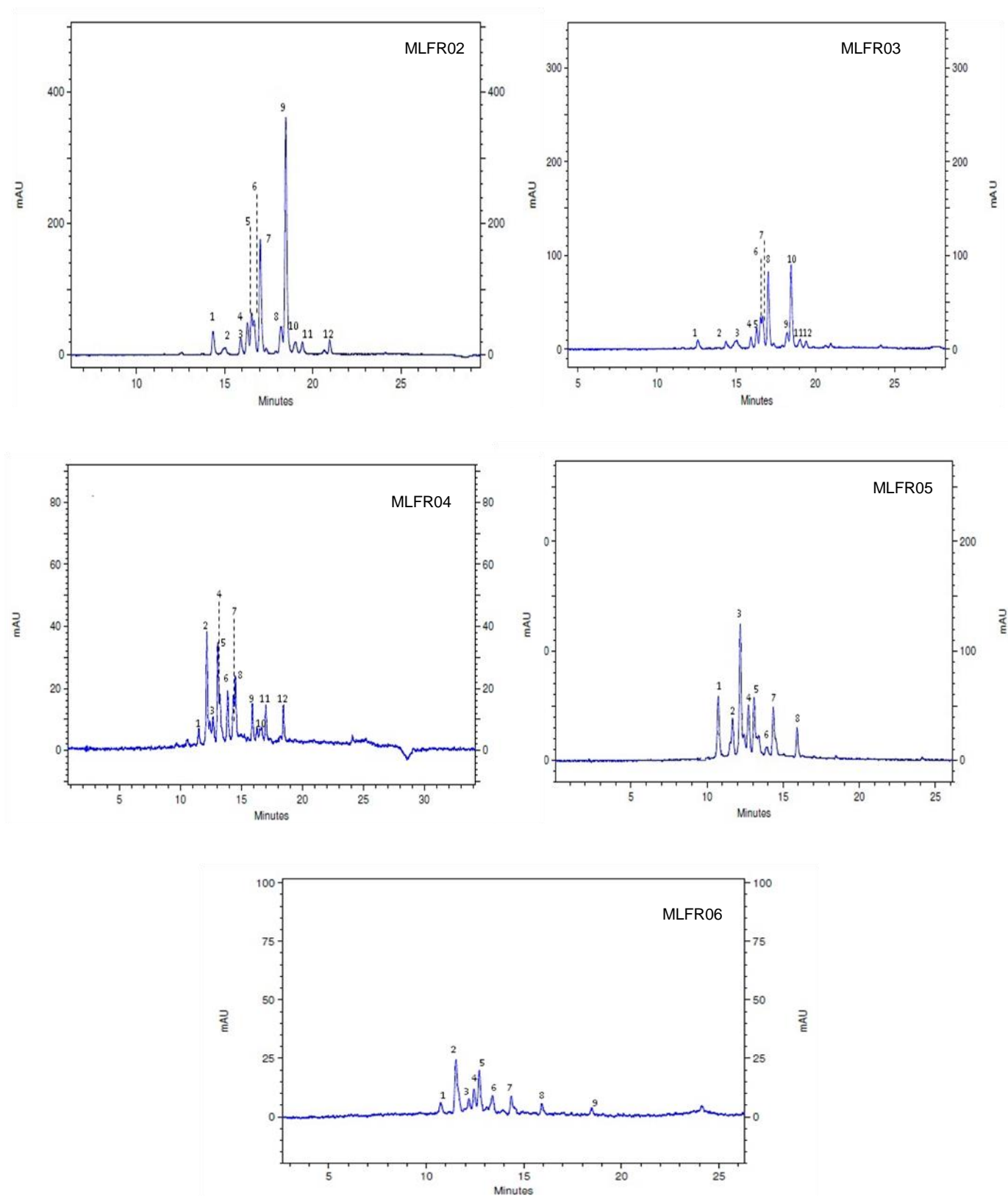


Figura 49: Cromatogramas CLAE-DAD das frações do EEML

O cromatograma da MLFR02 mostras que os flavonoides começaram a eluir em 14 min, apresentando, no Tr: 14,35 min, pico 1 a quercetina. Entre a faixa 15,0 – 18,0 min uma região de flavonol (banda II: 250 -280 nm e banda I: 350 – 385 nm) e flavona (banda II: 250 - 280 nm e banda I: 310 – 350 nm) hidroxilados. Em 18,47 min detectou-se a calicopterina e a partir da faixa entre 19,0 – 21,0, uma região contendo isoflavonas (banda II: 245-275 e banda I: 310-330). Pela análise dos espectros de UV da MLFR02 não foi observada a presença da região de flavonoides glicosilados (APÊNCICE Q e R).

A análise do perfil cromatográfico e espectros de UV (APÊNDICES S e T) da MLFR03 apresentaram perfil cromatográfico semelhante a MMFR02. Foi possível a identificação de uma região de flavonoides hidroxilados, Tr 12,0 - 18,00, flavonol (banda II: 250 -280 nm e banda I: 350 – 385 nm) e flavona (banda II: 250 -280 nm e banda I: 310 – 350 nm), com a quercetina em Tr: 14,33 min. Em 18,48 min detectou-se, assim como na MLFR02, a calicopterina. E entre 18,95 e 18,50, favanonas (banda I: 275 -295 nm e banda II: 310 -330 nm) e isoflavona (banda II: 245-275 e banda I: 310-330).

A MLFR04 apresentou, entre o Tr: 11,0 – 19,0, flavonol (banda II: 250 - 280 nm e banda I: 350 – 385 nm) e flavona (banda II: 250 -280 nm e banda I: 310 – 350 nm), com a quercetina em Tr: 14,36 min. Os espectros de UV estão dispostos no APÊNDICE U.

O perfil flavonídico apresentado no cromatograma e espectros de UV (ANEXO V) da MLFR05 mantem a presença de flavonol (banda II: 250 -280 nm e banda I: 350 – 385 nm) e flavona (banda II: 250 -280 nm e banda I: 310 – 350 nm), com a quercetina em Tr: 14,32 min. E ausência de flavonoides glicosilados até 10 min e flavonoides polimetoxilados a patir de 18 mim. Após analise do cromatogramae espectros de UV (APÊNDICE X) pode-se constatar perfil semelhante perfil flavonídico na MLFR06 quando comparado a MLFR05.

#### 4.4.2 Quantificação de quercetina e calicopterina por CLAE-DAD

Após a constatação da presença dos flavonoides quercetina e calicopterina em algumas frações, a quantificação da QUE foi feita usando mesma a equação da reta que permitiu a quantificá-las nos EEMT, EEMM e

EEML, da mesma forma que calicopterina, quantificada segundo a equação utilizada para o EEML (Tabela 22).

Tabela 22: Quantificação da quercetina e calicopterina nas frações de *M. latifolia* por CLAE-DAD

Fração	Quantificação*	Teor de QUE**	Quantificação*	Teor de calicopterina**
	QUE ( $\lambda=251, 375$ )		Calicopterina ( $\lambda=277, 338$ )	
MLFR02	0,90	52,96	0,18	10,59
MLFR03	0,08	4,71	0,04	2,35
MLFR04	1,60	94,2	-	-
MLFR05	0,80	47,08	-	-
MLFR06	-	-	-	-

\*Em 20  $\mu$ L de amostra; \*\*Em g por Kg de planta seca

Tanto nos extratos brutos de *Marsetia* ssp. quanto nas frações de *M. latifolia* a presença da quercetina justifica a elevada atividade fotoprotetora das amostras, pois esta é considerada o flavonoide com a mais potente propriedade antioxidante e potencial fotoprotetor, devido ao padrão de hidroxilação da molécula. Há poucas pesquisas sobre os seus efeitos fotoprotetores, mas algumas formulações tópicas contendo quercetina inibem o dano induzido pela radiação UVB em animais (GILABERTE e GONZÁLEZ, 2010).

#### 4.4.3 Teor de flavonoides total (TFT) e atividade antioxidante (AA)

Os resultados mostram que as frações MLFR02, MLFR03 e MLFR05, na concentração de 250  $\mu$ g/mL, foram as que mais se aproximaram das propriedades anti - radicalares dos padrões comerciais BHT e AA. E na menor concentração utilizada (5  $\mu$ g/mL), com exceção da MLFR05, as demais frações foram mais eficazes que os padrões utilizados (Tabela 23).

Tabela 23: Atividade antioxidante das frações obtidas do EEML

	SRL (%)					
	250	125	50	25	10	5
MLFR02	97,05 ± 0,066	93,93 ±0,017	87,90 ± 0,032	68,77 ± 0,083	68,47 ± 0,084	65,33 ± 0,005
MLFR03	98,88 ± 0,089	96,98 ± 0,024	80,88 ± 0,029	79,48 ± 0,050	69,97 ± 0,054	64,70 ± 0,008
MLFR04	87,39 ± 0,004	81,02 ± 0,009	79,67 ± 0,003	71,71 ± 0,001	67,56 ± 0,003	56,88 ± 0,001
MLFR05	94,51 ± 0,009	94,50 ± 0,008	70,71 ± 0,051	44,43 ± 0,124	21,13 ± 0,088	11,78 ± 0,105
MLFR06	73,47 ± 0,011	84,16 ± 0,015	88,66 ± 0,031	91,31 ± 0,02	91,59 ± 0,003	71,51 ± 0,89
BHT*	94,64 ± 0,068	94,07 ± 0,075	86,58 ± 0,017	57,16 ± 0,054	30,20 ± 0,084	18,38 ± 0,010
AA**	97,03 ± 0,037	96,62 ±0,043	96,98 ± 0,038	96,57 ± 0,046	74,32 ± 0,032	24,60 ± 0,091

\*µg/mL; \*\*di-terc-butil metil fenol; \*\*\* ácido ascorbico;

O conteúdo total do teor de flavonoides existentes na amostra obteve valor de 0,240 – 0,410 µg de quercetina/ µg de extrato. Foi possível constatar que o aumento no TFT provoca uma melhor resposta na AA com a redução da EC<sub>50</sub> (Tabela 24).

Tabela 24: TFT e AA das frações do EEML

Amostra	TFT*	AA (EC <sub>50</sub> )
MLFR02	0,126	41,08
MLFR03	0,195	51,60
MLFR04	0,041	44,42
MLFR05	0,240	31,72
MLFR06	0,063	50,82

\*µg de quercetina/ µg de extrato

Assim a AA das espécies de *Marcetia* e suas frações pode ser atribuída, provavelmente à presença de substâncias com um grupo hidroxila disponível, estas, por sua vez, podem está relacionadas a presença de flavonoides que já tem sua presença bem descrita na família Melastomataceae (LEITE *et al.*, 2012).

Assim, a presença de diversos flavonoides e outras substâncias polifenólicas isoladas em diversas espécies vegetais sugerem a possibilidade de estes componentes estarem envolvidos diretamente no mecanismo antioxidante das espécies, diversos estudos envolvem o conteúdo de polifenóis totais, flavonoides e seu potencial antioxidante. Na literatura são descritos inúmeros

trabalhos: Santos *et al.* (2009) demonstraram excelentes resultados da atividade de varredura dos radicais livres DPPH• com a isoquercetina ( $CE_{50} = 11,8 \mu\text{g/mL}$ ), o extrato hidroalcoólico das folhas de *B. microstachya* Macbride demonstraram o potencial antioxidante do  $CE_{50}$  igual a  $5,50 \mu\text{g/mL}$  (MENEZES *et al.* 2004). Extrato etanólico das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl teve uma  $CE_{50}$  igual a  $62,21 \mu\text{g/mL}$  para a atividade antioxidante pelo método de varredura do radical DPPH• (SOUZA *et al.* 2010), O extrato etanólico das folhas de *I. juruensis* valor de  $CE_{50}$  encontrado foi de  $28 \mu\text{g/mL}$  (SANTOS *et al.*, 2009). Estudos realizados em *Passiflora coccínea* (AUBL.), espécie ricas no flavonoide isovitexina Apresentou  $EC_{50} 13 \pm 2 (\mu\text{g/mL})$  para o extrato metanólico (SILVA, 2012)

Propriedades antioxidantes também foram investigadas no gênero *Bauhinia*, sendo o extrato cetato de etila das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* apresentou  $CE_{50}$  de  $3,37 \mu\text{g/mL}$  (SILVA e CECHINEL-FILHO, 2002). Outros estudos com a *Bauhinia* realizados em extratos e frações obtidos de folhas e caules de *B. microstachya* (Raddi) JF. Macbr. demonstraram acentuadas AA: extrato das folhas apresentou  $CE_{50}$  de  $2,75 \mu\text{g/mL}$  e o extrato dos caules,  $CE_{50}$  de  $2,86 \mu\text{g/mL}$  (BIANCO e SANTOS, 2010). Ainda em estudos de AA com extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz realizado por Mansur (2001), os resultados também foram satisfatórios, o extrato hexânico apresentou um  $EC_{50}$  de 23,16 superior a uma padrão de padrão de *Ginkgo biloba* ( $EC_{50}$ : 31,16). O extrato etanólico também apresentou boa AA ( $6,06 \mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.4.4 Fator de Proteção Solar

As frações de *M. latifolia* também apresentaram perfil fotoprotetor semelhante os dos extratos brutos visto que todas as amostras também apresentaram FSP > 6 nas duas maiores concentrações aplicadas, o FPS encontrado para as frações foi MLFR02: 14,88 e 17,57, MLFR03: 9,69 e 17, 82, MLFR04: 10,96 e 19,34, MLFR05: 15,47 e 27,08 e MLFR06: 7,08 e 12, 63 para as concentrações de 125 – 250  $\mu\text{g/mL}$ . A exceção foi a MLFR05 que apresentou um FPS de 6,23 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo também a que apresentou melhores resultados (Figura 50).

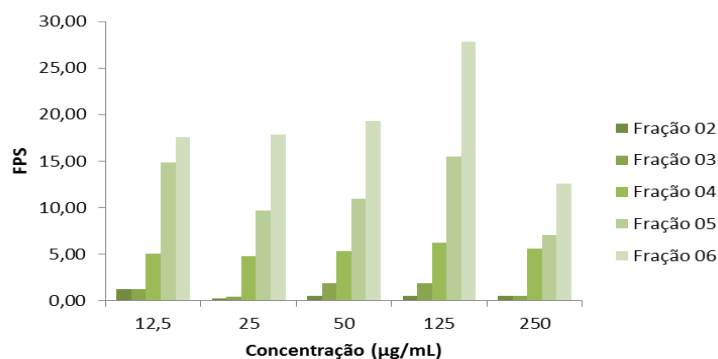


Figura 50: Perfil de fotoproteção UVB das frações de *M. latifolia*

A análise estatística mostrou que MLFR02 e MLFR06 não foram estatisticamente diferentes as concentrações 12,5 e 25 µg/mL, as demais foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). E para as frações MLFR03, MLFR04 e MLFR05, todas as concentrações foram estatisticamente distintas ( $p < 0,05$ ).

Esperava-se que as frações 02 e 03 apresentassem os maiores valores de FPS devido a presença da calicopterina. Flavonoide este comum na superfície das plantas, principalmente na cutícula foliar, onde se encontram dispersos na cera exercendo efeito protetor contra a incidência de raios solares (LI *et al.*, 2009). Entre as espécies que produzem este flavonoide está a *M. latifolia*. Os flavonoides encontrados na cera cuticular apresentam caráter apolar e podem variar de planta para planta, mas quase sempre se referem à agliconas. A lipofilia destes compostos é incrementada pela metilação de grupos hidroxila, como é o caso da calicopterina (HARBONE *et al.*, 1992; BRUNETON, 2001; WALLE, 2007). Desta forma esperava-se que a calicopterina presente nas frações 02 e 03 produzissem um maior FPS, o que não foi observado.

O maior FPS apresentado pelas frações MLFR04 e MLFR05 e pelas *M. taxifolia* e *M. macrophylla* pode ser atribuído ao sinergismo entre os compostos presentes nestas frações e extratos etanólicos que apresentam espectro de absorção na faixa da radiação UVB/UVA. Estudos, ainda, demonstraram que a atividade fotoprotetora, depende da capacidade de absorção de energia radiante atribuída aos grupos cromóforos, que é proporcional à sua concentração, intervalo de absorção e comprimento de onda onde ocorre absorção máxima. (SILVA FILHO, SENA e PIRES, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2004; MAILLAN *et al.*, 2005).

#### 4.4.5 Atividade fotoprotetora UVA

O mesmo resultado satisfatório foi observado na avaliação das frações de *M. latifolia* quando estudadas frente a fotoproteção UVA. No t20 a proteção foi entre 99,92 – 98,41 % para as frações. No t40 a proteção ficou entre 99,84 – 96,09%. No t60 entre 97,90 – 93,64%, t80 a proporção de proteção da solução foi 95,30 – 88,79%. No t100 foi verificada uma faixa entre 91,11 - 83,65% e, finalmente no t120 ainda havia uma faixa entre 90,52 – 60,73% de RVS nas placas protegidas com as frações de *M. latifolia*. Estes valores são satisfatórios quando comparados com os controles claro (CC) e escuro (CE), que apresentaram, ao final dos 120 min, 40,49% e 99,78%, permitindo inferir que a fotoproteção contra a radiação UVA é proveniente das amostras estudadas (Figura 51).

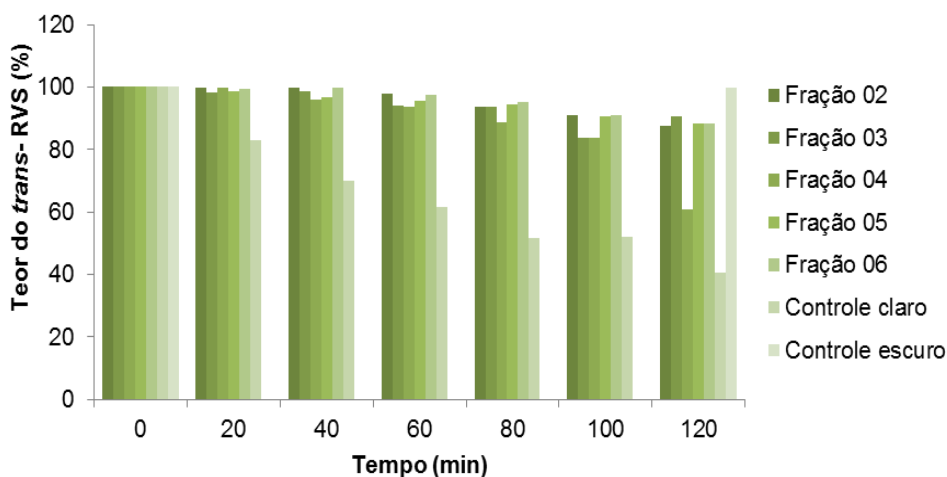


Figura 51: Perfil de fotoproteção UVA das frações de *M. latifolia*

De acordo com a ANOVA, a proteção contra a radiação UVA, para a fração 02, só diferiram estatisticamente, com valor de  $p < 0,05$ , entre o t120 e os t0, t20, t40 e t60. Para a fração 03, as diferenças estatísticas foram observadas entre t0 e t80/t100; t20 e t100/t120; t40 e t100/t120; t60 e t80/t100; t120 e t100. São estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) a atividade fotoprotetora entre o T0 e t20/t40/t60; t20 e t40/t60; t40 e t60 e t80; t100 e t80. Também foram estatisticamente iguais a atividade fotoprotetora os t0 e t20/t40; t20 e t40/t60; t60/t100 e t100 e t120 para a fração 05. Ao analisar estatisticamente, também,



os resultados apresentados para a fração 06 diferiram estatisticamente, com valor de  $p < 0,05$ .

#### 4.4.6 Ensaio de toxicidade

O teste HET-CAM e taxa de hemólise foram aplicados para as frações obtidas a partir do EEML com o objetivo de confirmar ou não, de forma preliminar, a segurança para uso em formulações fotoprotetoras, mesmo sabendo-se que não existe nenhuma substância química 100% segura.

##### 4.4.6.1 Teste em membrana corionantóide de ovos de galinha (HET-CAM)

A mesma metodologia foi aplicada para as frações do extrato etanólico de *M. latifolia*. A classificação HET-CAM sugere que as frações não possuem potencial irritante (Tabela 25).

Estudos utilizando a metodologia HET-CAM para a avaliação inicial das propriedades de irritação ocular de extratos vegetais comprovaram que esta metodologia pode ser útil na seleção de espécies naturais para avaliação das suas propriedades anti-irritantes ou testes para triagem em animais (WILSON e STECK, 2000; MURILLO *et al.*, 2003). O método HET-CAM tem o potencial de reduzir e refinar o uso de animais nos testes de irritação ocular. As substâncias identificadas como irritantes seriam excluídas dos testes *in vivo*, reduzindo, desta forma o número de coelhos para o teste de Draize, por exemplo (ICCVAM, 2006).

Tabela 25: Classificação do Potencial de Irritação Ocular das frações do EEML pelo ensaio HET-CAM

	Concentração (µg/mL)	PI	Classificação
MLFR02	250	0,88	não irritante
	125	0,56	não irritante
	62,5	0,42	não irritante
MLFR03	250	0,77	não irritante
	125	0,16	não irritante
	62,5	-	não irritante
MLFR04	250	0,92	não irritante
	125	0,90	não irritante
	62,5	0,64	não irritante
MLFR05	250	0,74	não irritante
	125	0,56	não irritante
	62,5	0,42	não irritante
MLFR06	250	0,84	não irritante
	125	0,60	não irritante
	62,5	0,14	não irritante
NaOH 0,1 M*	0.1M	12,6	irritante
Água destilada**	-	0, 0	não irritante

\*controle positivo; \*\*controle negativo

#### 4.4.6.2 Atividade Hemolítica

As frações de *M. latifolia*, assim, como na avaliação HET-CAM se apresentaram mais seguras do ponto de vista de toxicidade, pois com exceção da MLFR04 a 250 µg/mL, que teve uma taxa de hemólise de  $64,22 \pm 0,044\%$ , sendo a fração mais tóxica e, portanto, não foi selecionada para ser incorporada à loção polawax<sup>®</sup>. As demais frações apresentaram uma taxa entre 32,50 – 19,01 a uma concentração de 250 µg/mL (Figura 52).

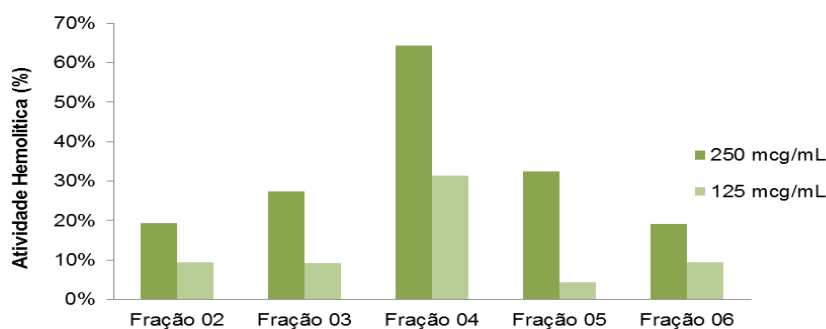


Figura 52: Avaliação da atividade hemolítica das frações de *M. latifolia*

#### 4.4.7 Avaliação do potencial fotoprotetor das formulações contendo frações de *M. latifolia*

##### 4.4.7.1 Avaliação das características físico-químicas das formulações

Cada fração do EEML apresentou características semelhantes já que foram obtidas a partir do mesmo extrato bruto. O que resultou, quanto incorporadas à loção polawax<sup>®</sup>, em formulações com coloração semelhantes, mas com aspecto sensorial distintos, uma vez que suas composições químicas são diferentes (Tabela 26).

Tabela 26: Características organolépticas das frações obtidas do EEML

	Aspecto físico	Coloração	Odor
MLFR02	flúido	marrom-escuro	característico
MLFR03	viscoso	marrom-escuro	característico
MLFR05	viscoso	marrom-escuro	característico
MLFR06	viscoso	marrom-escuro	característico

As formulações, de modo geral, apresentaram consistência adequada a um produto cosmético, sendo necessário melhorar o aspecto visual, o qual pode ser obtido por meio de obtenção dos extratos por percolação.

Após o repouso de 24 horas as formulações foram analisadas macroscopicamente. Todas as características organolépticas das formulações estão descritas na Tabela 27 e demonstradas na figura 53.



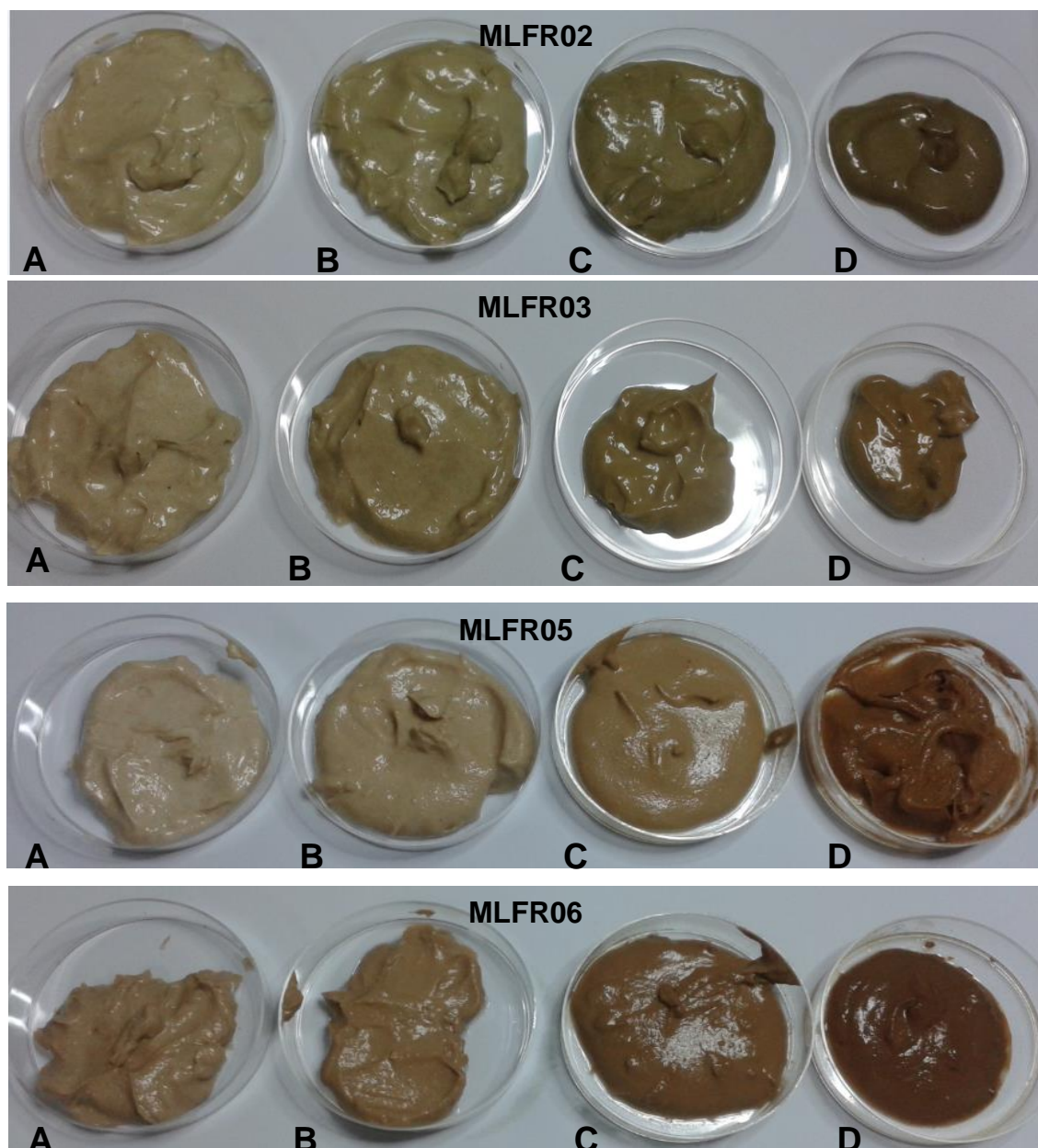


Figura 53: Apresentação do aspecto visual das formulações contendo MLFR02, MLFR03, MLFR05, MLFR06 em diferentes concentrações: 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D).

Segundo Milese e Guterres (2002), a emulsão é a melhor forma farmacêutica para emprego de fotoprotetores, e ela deve ser homogênea, estável e não gordurosa, aspectos estes observados nas formulações contendo as frações etanólicas de *M. latifolia*.

A medição do pH ocorreu logo após a preparação da formulação e adição dos extratos em suas devidas concentrações. Para que as loções ficassem mais

próximas do pH cutâneo, foi utilizada a trietanolamina como agente modificador de pH.

Todas as formulações apresentaram um pH ácido (Tabela 28). Estes valores merecem uma atenção especial para otimização do processo farmacotécnico já que como foi mencionado antes, tal parâmetro deve ser biocompatível com a pele.

Tabela 28: Média e desvio padrão dos valores de pH da formulação contendo frações do EEML

Formulação (%)	pH sem correção	pH com correção*
	MLFR02	
5	4,42 ± 0,104 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,070
10	4,36 ± 0,043 <sup>a</sup>	6,39 ± 0,221
20	4,19 ± 0,043 <sup>b</sup>	6,34 ± 0,171
30	4,20 ± 0,015 <sup>b</sup>	6,58 ± 0,378
MLFR03		
5	3,88 ± 0,130 <sup>a</sup>	6,66 ± 0,323 <sup>a</sup>
10	3,62 ± 0,026 <sup>b</sup>	6,44 ± 0,098 <sup>a</sup>
20	3,65 ± 0,030 <sup>c</sup>	6,23 ± 0,045 <sup>b</sup>
30	3,62 ± 0,026 <sup>c</sup>	6,83 ± 0,195 <sup>a</sup>
MLFR05		
5	3,85 ± 0,115 <sup>a</sup>	6,36 ± 0,226
10	3,72 ± 0,066 <sup>a,b</sup>	6,66 ± 0,187
20	3,31 ± 0,065 <sup>b</sup>	6,37 ± 0,231
30	3,60 ± 0,060 <sup>c</sup>	6,62 ± 0,147
MLFR06		
5	3,82 ± 0,165 <sup>a</sup>	6,84 ± 0,102
10	4,09 ± 0,065 <sup>a</sup>	6,37 ± 0,256
20	3,51 ± 0,072 <sup>b</sup>	6,52 ± 0,360
30	3,27 ± 0,066 <sup>b</sup>	6,35 ± 0,119

\* Não apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ). a, b, c: as médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Há certa divergência entre na literatura científica no referente a faixa de pH ideal para a pele humana, Leonardi e colaboradores (2002) afirmaram que o manto ácido da pele apresenta pH entre 4,5 e 5,8. Os estudos já chamam atenção para o fato de os valores de pH dependem da área do corpo aferida, variando de 4,2 a 5,9 prevalecendo valores maiores em áreas como axila, região genitoanal e interdigital (VOLOCHTCHUK *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou valores de pH baixo, entre 3,6 e 3,8 para fotoprotetores que continham octilmetoxinamato (BORGHETTI e KNORST, 2006). Por outro lado, estudo mais recente considera o valor de pH fisiológico: 6,0-7,2 (BABY, 2008). Diante

de tais informações nota-se que a correção deste pH para um valor um pouco maior com um agente como uma base fraca seria um artifício farmacotécnico.

Em relação ao modelo estatístico utilizado, a análise ANOVA seguida de teste de Tukey de múltipla variância, com significância de 5% foi calculado no o software Graphpad Prism<sup>®</sup> para os valores de pH acima, indicou que não há diferença estatística entre formulações, exibindo  $p > 0,05$ . Isto infere que os fatores em diferentes níveis dispostos no planejamento fatorial não interferem neste parâmetro físico- químico.

Todas as amostras formuladas foram submetidas ao teste de centrifugação. Após 30 minutos a 3.000 rpm, foi observado que nenhuma amostra possuía separação de fases nem precipitações, considerando assim as formulações aptas a futuros testes de estabilidade. Não foi observado separação de fases, não exitindo, portanto, a necesidadede reformulação das formulações. A Figura 54 mostra o aspecto físico das formulações após teste de centrifugação.

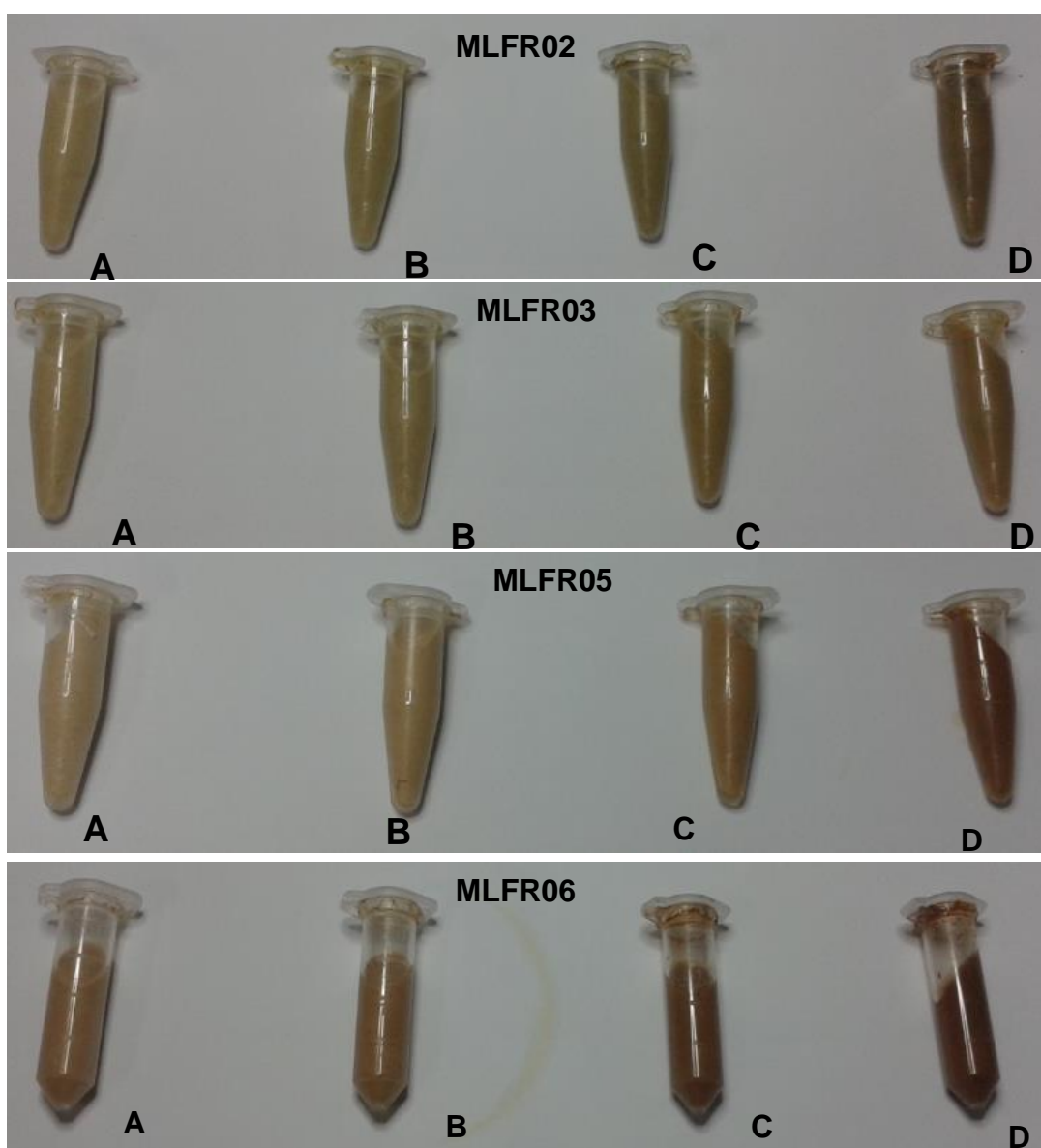


Figura 54: Características das formulações MLFR02, MLFR03, MLFR05, MLFR06 após centrifugação. 5% (A), 10% (B), 20% (C) e 30% (D)

Os resultados da Tabela 29 correspondem ao Fator de espalhabilidade das formulações contendo as frações do EEML, loção polawax<sup>®</sup> e loção BZ3.



Tabela 29: Fator de espalhabilidade ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ) das formulações contendo frações de *M. latifolia* em diferentes concentrações

Formulação MLFR02 (%)	Fator de espalhabilidade
5	$2,01 \pm 0,181$
10	$2,22 \pm 0,010$
20	$2,62 \pm 0,162$
30	$2,72 \pm 0,307$
Formulação MLFR03 (%)	Fator de espalhabilidade
5	$0,41 \pm 0,076$
10	$0,48 \pm 0,046$
20	$1,38 \pm 0,025$
30	$1,73 \pm 0,082$
Formulação MLFR05 (%)	Fator de espalhabilidade
5	$0,46 \pm 0,0408$
10	$0,76 \pm 0,002$
20	$1,34 \pm 0,469$
30	$1,45 \pm 0,020$
Formulação MLFR06 (%)	Fator de espalhabilidade
5	$0,51 \pm 0,036$
10	$0,68 \pm 0,006$
20	$1,13 \pm 0,023$
30	$1,20 \pm 0,127$
Loção polawax®	$0,26 \pm 0,230$
*Loção BZ3	$6,89 \pm 0,085$

\*5%

Nota-se que, de modo geral, após adição das frações, houve uma redução na relação entre a área e o esforço limite ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ), quando comparada com a LP. Sugere-se que a diminuição da espalhabilidade ocorreu, pois a incorporação das frações proporcionou uma maior consistência à loção, diminuindo conseqüentemente sua espalhabilidade (LANGE, HEBERLE e MILAO, 2009). Apesar da diminuição da espalhabilidade após adição do extrato, a formulação apresentou bons resultados, visto que essa variação não modificou bruscamente a consistência e fluidez das amostras (Figura 55).

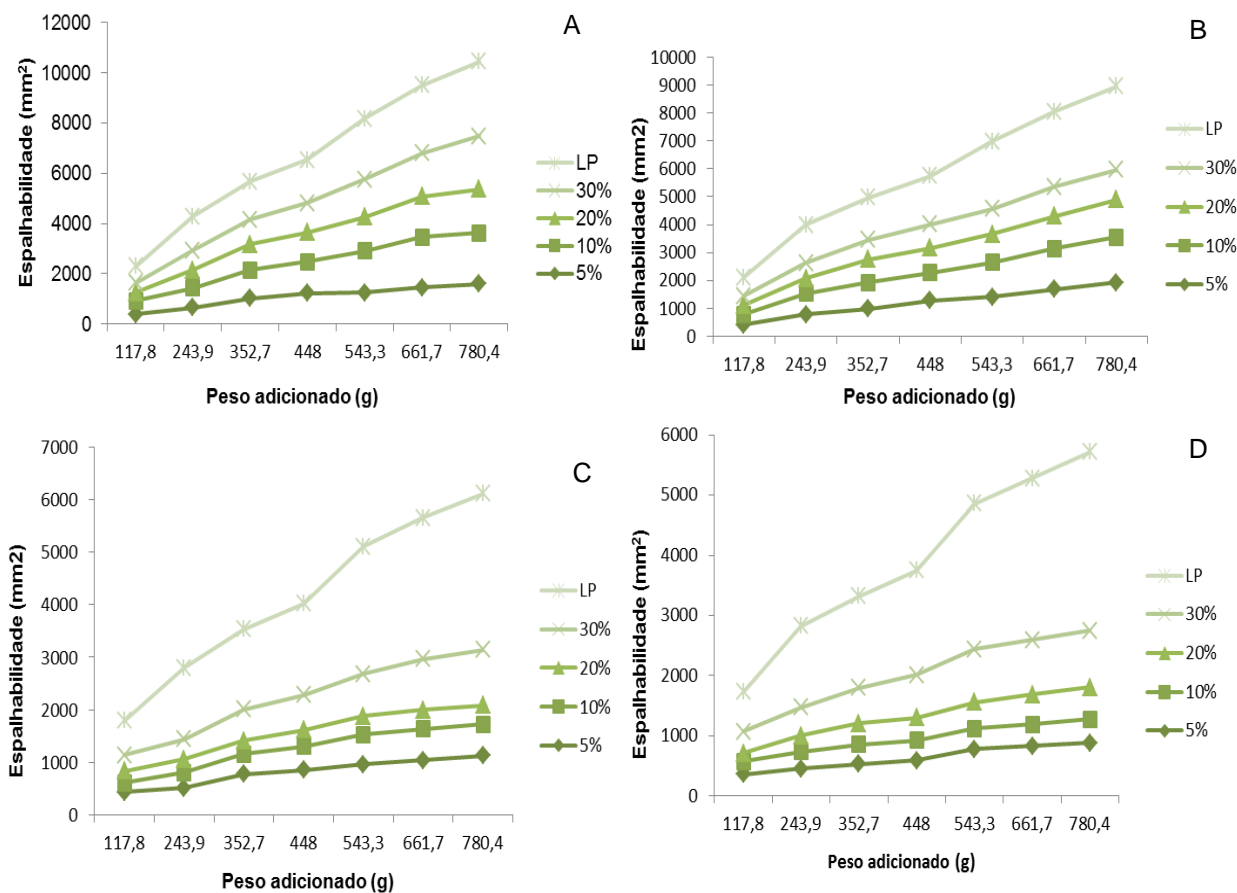


Figura 55: Espalhabilidade das emulsões (25°C) contendo frações do EEML em diferentes concentrações: MLFR02 (A), MLFR03 (B), MLFR05 (C) e MLFR06 (D)

Ao observar as formulações MLFR02 percebe-se uma aumento gradual da espalhabilidade a proporção que aumenta a concentração das amostras e a força aplicada a espalhabilidade do produto aumenta.

A análise estatística demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os valores de espalhabilidade das formulações contendo diferentes concentrações de MLFR02, ou seja, o modelo não pode ser usado para aperfeiçoar tal parâmetro nas formulações MLFR02 desenvolvidas, já que  $p > 0,05$ . Já para as formulações MLFR03 e MLFR06 os valores de espalhabilidade foram estaticamente diferentes para todas as concentrações de frações utilizadas. Para as formulações MLFR05 só não foram estatisticamente diferente as formulações contendo 5 e 10% da fração 05, o modelo pode ser usado para otimizar tal parâmetro nas formulações desenvolvidas, já que  $p < 0,05$ .

Porém observa-se que a espalhabilidade destas formulações estão abaixo de emulsões contendo protetores solar como octilmetoxinamato (OMC) e

metilbenzilidenocânfora (MBC), que ficaram, respectivamente, entre 7000 – 1200 mm<sup>2</sup> e 6000 – 8000 mm<sup>2</sup> para um peso total de 2000g (BORGHETTI e KNORST, 2006), o que pode levar a uma variação nominal do FPS das formulações desenvolvidas, pois se sabe que o mesmo também é influenciado pela espalhabilidade do produto.

Como todas as formulações responderam bem à avaliação inicial da estabilidade as mesmas foram avaliadas frente ao potencial fotoprotetor UVB/UVA

#### 4.4.7.2 Determinação do FPS formulações

As espécies estudadas apresentaram flavonoides em sua composição tanto no extrato bruto, quanto nas frações obtidas a partir do EEML. Em ambas situações, o FPS apresentado foi bastante promissor, justificando sua incorporação em formulações farmacêuticas de uso tópico

O perfil fotoprotetor das formulações desenvolvidas pode ser observado na Figura 56.

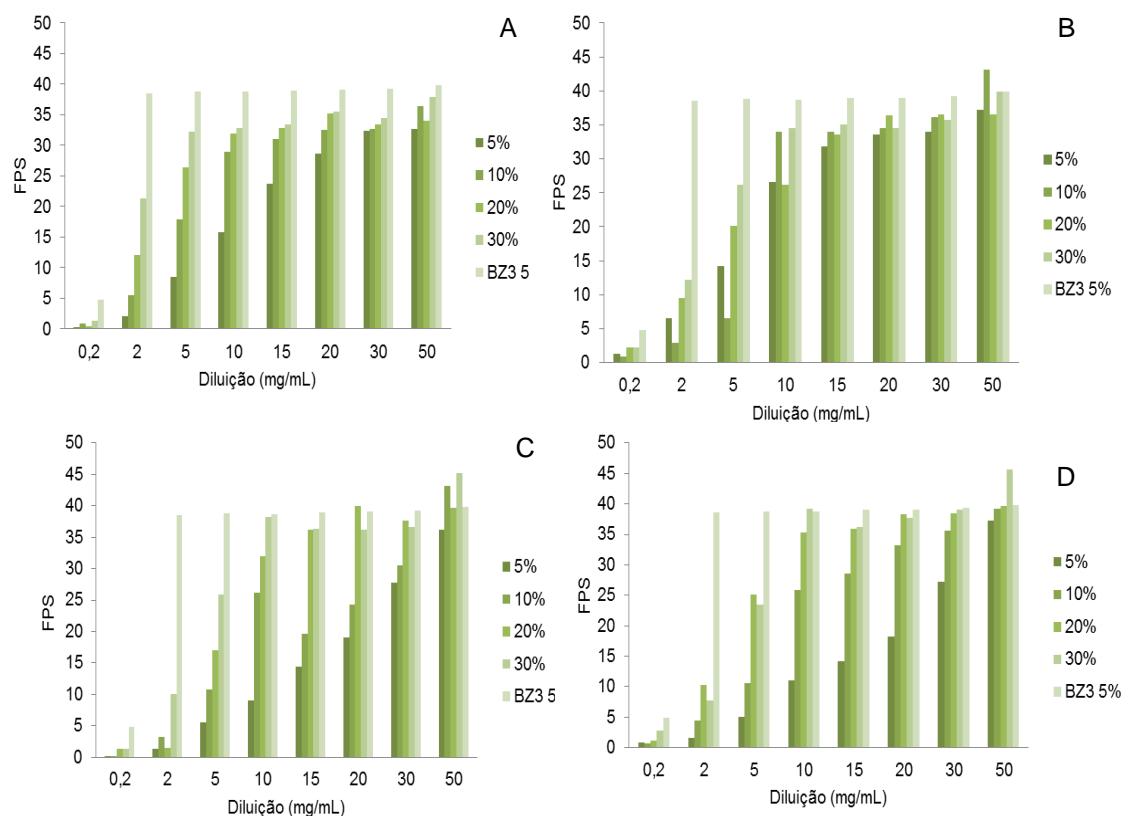


Figura 56: Perfil de fotoproteção UVB das formulações contendo frações do EEML. MLFR02 (A), MLFR03 (B), MLFR05 (C) e MLFR06 (D).

Para as formulações contendo entre 5 a 30% da fração 02, na diluição 0,2 mg/mL o FPS < 6. Na diluição 2,0 mg/mL somente a formulação a 10% teve FPS < 6, mas as demais oferecem baixa proteção já que a faixa de FPS esta entre 6,53 – 12,23. A partir da diluição de 10 mg/mL todas as formulações podem ser consideradas de alta proteção pois o FPS destas, estão entre 31,82 – 43,10.

Para as formulações contendo entre 5 a 30% da fração 03, na diluição 0,2 mg/mL o FPS < 6. Na diluição 2,0 mg/mL somente a formulação a 10% teve FPS < 6, mas as demais oferecem baixa proteção já que a faixa de FPS esta entre 6,53 – 12,23. A partir da diluição de 10 mg/mL todas as formulações podem ser consideradas de alta proteção pois o FPS destas, estão entre 31,82 – 43,10.

Para as formulações contendo entre 5 a 30% da fração 04, na diluição 0,2 mg/mL o FPS < 6. Na diluição 2,0 mg/mL somente as formulações a 20% e 30% tiveram FPS > 6, mas oferecem baixa proteção já que a faixa de FPS foi 8,03 e 10,0 respectivamente. A partir das formulações a 20 e 30% na diluição de 5

mg/mL todas as formulações podem ser consideradas de alta proteção pois o FPS destas, estão entre 29,87– 39,60.

Para as formulações contendo entre 5 a 30% da fração 05, na diluição 0,2 e 2 mg/mL o FPS < 6, com exceção da formulação a 30% (FPS = 10,00). Na diluição 5,0 mg/mL somente as formulações a 5% teve FPS < 6, mas oferecem média proteção já que a faixa de FPS foi 10,77 – 25,83. As formulações 20 e 30% a partir da diluição 10 mg/mL todas as formulações podem ser consideradas de alta proteção pois o FPS destas, estão entre 31,92 – 45,17.

Para as formulações contendo entre 5 a 30% da fração 06, na diluição 0,2 mg/mL o FPS < 6, com exceção da formulação a 30% (FPS = 10,00). Na diluição 10,0 mg/mL todas as formulações apresentaram um FPS > 6. Porém somente as formulações contendo a fração 06 nas concentrações entre 10 - 30%, diluição 20 mg/mL, podem ser consideradas de alta proteção pois o FPS destas, estão entre 33,26 – 45,58.

Após a incorporação, foi observado um acréscimo no FPS *in vitro*, que pode ser devido às características físico-químicas do extrato ao compara com o FPS obtido com as frações, o que ressalta a efetividade da atividade fotoprotetora apresentada pela espécie, pois outras espécies que também apresentaram potencial fotoprotetor promissor em forma de extrato bruto, após incorporação em formulação cosmética tiveram um decréscimo de atividade podem ser citadas como o *Ginkgo biloba* (BELO, 2008), extrato do vinho de uvas *Jacquez* (SPAGNA *et al.*, 2002) e a rutina (BALOGH *et al.*, 2011). Estudos utilizando o extrato seco de *Malpighia glabra* L. (acerola) na concentração de 10% (p/p) em emulsão mostraram que a mesma não tem propriedades fotoprotetoras, mas recomenda a associação da mesma em formulações cosméticas devido a boa atividade AA (SOUZA, CAMPOS e PACKER, 2013)

Os resultados apresentados foram superiores a outras espécies vegetais que também tiveram sua atividade fotoprotetora testada, como exemplo tem-se o óleo de andiroba (*Carapa guianensis*), que quando incorporado a emulsão teve um FPS (6,64) um pouco acima do determinado pela ANVISA, por outro lado os mesmos estudo demonstram a boa correlação dos resultados da avaliação do FPS *in vitro* e *in vivo*, para a emulsão contendo o óleo de andiroba os valores de FPS *in vivo* foi 6,24 (FERRARI *et al.*, 2007). Formulações contendo própolis verde e vermelha, em gel de carbopol, tiveram FPS 4,8 e 5,8 (própolis verde) e

2,4 e 3,5 (própolis vermelha) nas concentrações de 5 e 8%, respectivamente (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

O óleo de *Calendula Officinallis* quando incorporado a uma emulsão apresentou, *in vitro*, FPS de 14,84 (MISHRA, MISHRA e CHATTOPADHYAY, 2012). Avaliação da mistura de frações contendo flavonoides, quando incorporadas na proporção de 10% em uma emulsão O/A, de *H. arenarium* e *C. monogyna* apresentou valores de FPS e fator de proteção-UVA de 19,51 e 16,58. *C. monogyna* e *S. nigra*, 18,21 e 7,54, *S. nigra* e *H. arenarium* 16,94 e 11,57. O que reafirma que frações contendo misturas de flavonoides apresentam um bom potencial fotoprotetor. Os mesmos autores também relatam forte atividade antioxidante das três espécies (JARZKYCKA *et al.*, 2013).

Como já descrito foi identificada a QUE nas três espécies estudadas e nas frações de *M. latifolia*, a presença desta contribuiu para a atividade fotoprotetora das espécies de *Marsetia*. Pesquisadores já vêm investigando o uso da quercetina como agente protetor solar para uso tópico, os resultados relatam que as formulações contendo quercetina inibiram dano induzido por UVB em ratos (CASAGRANDE *et al.*, 2006). Estudos mais recentes relatam os flavonoides quercetina e rutina, isolados e incorporados a emulsão O/A na concentração de 2,5% p/p, apresentam perfis de absorção similares ao óxido de zinco (5% p/p), ou seja, os flavonoides citados, mesmo em concentrações inferiores ao filtro inorgânico, comprovaram capacidade de absorver ao longo do espectro de UV (290 – 400 nm) (NISHIKAWA, 2012), o que dá embasamento aos bons resultados apresentados tanto pelas espécies de *Marsetia*, quanto pelas frações de *M. latifolia*.

Vale ressaltar que o método espectrofotométrico para determinação do FPS *in vitro* quantifica a capacidade absorptiva na região UVB, sendo necessário, desta forma, avaliar o potencial fotoprotetor na região UVA (VELASCO *et al.*, 2008). Desta forma, as formulações foram submetidas ao a avaliação da atividade fotoprotetora contra a radiação UVA.

#### 4.4.7.3 Determinação da atividade fotoprotetora UVA das formulações

Acreditava-se que a radiação UVA não provocava danos para a pele. No entanto, os estudos mostram que esta radiação também promove o surgimento

do fotoenvelhecimento e de tumores de pele, por penetrar mais profundamente nas camadas dérmicas. Esta provoca de maneira mais intensa a peroxidação lipídica, gerando mais stress oxidativo do que a radiação de UVB, conduzindo, desta forma, danos na membrana plasmática. O stress oxidativo desencadeado pela radiação UVA é dez vezes mais eficiente do que os UVB (DAMIANI *et al.*, 2006; CERETTA *et al.*, 2012)

Os benefícios da incorporação de antioxidantes em fotoprotetores estão relacionados diretamente a capacidade de neutralização de radicais livres e incluem redução do eritema, da incidência de câncer cutâneo, do fotoenvelhecimento e de fotoimunossupressão, sendo estas atividades biológicas estritamente relacionadas à proteção contra a radiação UVA (WANG e HU, 1998).

Logo, é pertinente a busca de formulações fotoprotetoras que também sejam capazes de proteger a pele contra os danos induzidos pela radiação UVA. Assim, como as frações de *M. latifolia* demonstraram boa capacidade fotoprotetora UVA, a mesma metodologia foi aplicada para as formulações contendo as diferentes concentrações das frações. A comparação da capacidade fotoprotetora das amostras se deu em relação ao CC e ao CE. Também como forma de confirma a atividade das frações foram avaliados também a loção polawax<sup>®</sup> e o protetor solar contendo BZ3 a 5%. Os resultados estão podem ser observados na figura 57.

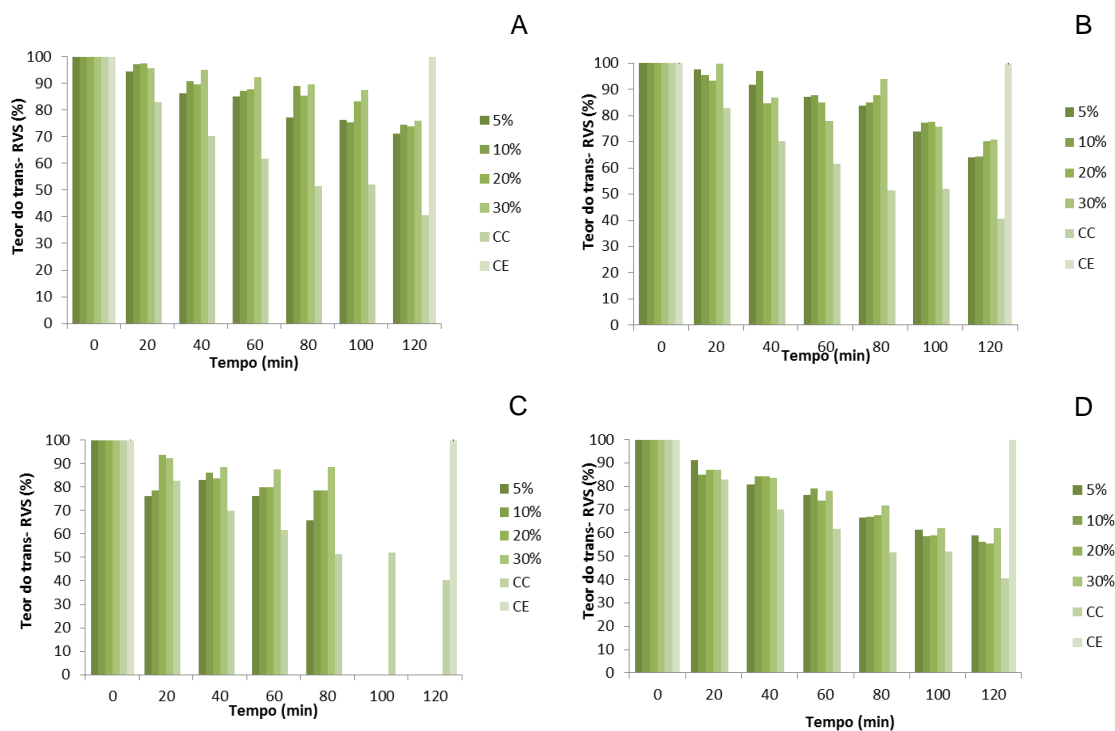


Figura 57: Perfil de fotoproteção UVA das formulações contendo frações do EEML: MLFR02 (A), MLFR03 (B), MLFR05 (C) e MLFR06 (D).

Na MLFR02 percebe-se uma degradação progressiva do RVS, mas que ao final dos 120 min de observação as formulações contendo MLFR02, nas concentrações de 5 a 30%, conseguiram preservar o RVS na faixa de 71,22 a 75,99 %. A análise estatística mostrou que, MLFR02 a 5%, os resultados foram estatisticamente significante para grande maioria dos intervalos de tempo, exceto entre os  $t_{40}/t_{60}$  e  $t_{80}/t_{100}$ . Para MLFR02 a 10%, só foram estatisticamente iguais os  $t_{100}/t_{120}$ . Para MLFR02 a 20% todos os resultados foram estaticamente significantes e para MLFR02 a 30%, só foram estaticamente iguais os  $t_{20}/t_{40}$  ( $p < 0,05$ )

Ao observar a proteção contra a degradação UVA do RVS promovida pela MLFR03 observou-se que a mesma também protegeu de forma satisfatória a solução de RVS numa faixa entre 64, 13 a 73,31 % para o  $t_{120}$ . E a análise estatística, com nível de significância  $< 0,05$ . Mostrou que a proteção promovida pela MLFR03 (5%) durante os intervalos de tempo,  $t_0 - t_{120}$  foram estatisticamente significantes. Na MLFR03 10% só não foram estatisticamente significantes os  $t_{20}/t_{40}$ , o mesmo sendo observado para MLFR03 20%, na qual os  $t_{40}/t_{60}$  também não foram estatisticamente significantes. E para MLFR03



30%, a análise mostrou significância estatística para grande maioria dos intervalos temporais, com exceção t1/t20 e t100/t120. O que demonstra que a incidência de UVA altera a concentração de RVS nas amostras com o passar do tempo

Os resultados obtidos com MLFR05 revelou menor efetividade destas formulações para a fotoproteção UVA ao longo dos 120min de observação, visto que a partir do t80 houve uma queda brusca do teor de RVS na solução. Ao final do t120 só havia 4,19 e 3,61% de RVS nas formulações a 20 e 30%, respectivamente, sendo que todos os resultados para estas concentrações foram estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ). Para MLFR05 a proteção da solução de RVS só aconteceu até t80, no qual a fotoproteção foi satisfatória, encontrado-se um teor de RVS entre 65,72 – 88, 64%. Deste ponto em diante todo o RVS foi degradado. Na MLFR05 5% só foram estatisticamente iguais os t20/t60 e t100/t120. MLFR05 10% os tempos em que a concentração de RVS encontrada não foi estatisticamente significante foram: t20/t60, t20/t80, t60/t80, t100/t120. Para MLFR05 20% a maior parte das concentrações foram estatisticamente significantes, não sendo somente entre t60/t80e t100/t120, para  $p < 0,05$ .

Já na MLFR06 o perfil fotoprotetor voltou a apresentar bons resultados ao final dos 120min de experimento, mesmo não sendo tão bons quanto as formulações MLFR02, as formulações conseguiram apresentaram uma faixa de proteção entre 55,60 – 61,96% do RVS. E os resultados foram todos estatisticamente significantes para MLFR06 5 e 20%. E para MLFR06 10 e 30%, somente não foram estatisticamente significantes t20/t40 e t100/t120 para 10 e 30%,respectivamente, com  $p < 0,05$ .

E ao observar no t120 o controle positivo BZ5% conseguiu proteger 73,97% do RVS na solução e as formulações contendo MLFR02, apresentou também limites superiores a 70%, confirma-se o bom resultado fotoprotetor da referida fração, sendo de MLFR02 a 30%, a fotoproteção foi superior a da formulação com BZ3, com uma preservação de 75,99% do RVS na formulação. O bom resultado também foi observado MLFR03 20 e 30% com uma fotoproteção UVA também superior a 70%. Já a MLFR05, só apresentou resultados superiores a BZ3 até o tempo t60. E todas as formulações MLFR06 tiveram desempenho inferior ao BZ3. E com a loção polawax<sup>®</sup> e o CC

apresentaram ao término do ensaio um teor, respectivamente, de 41,43 e 40,49% de RVS permitindo inferir que a fotoproteção contra a radiação UVA é proveniente das amostras estudadas (Figura 58).

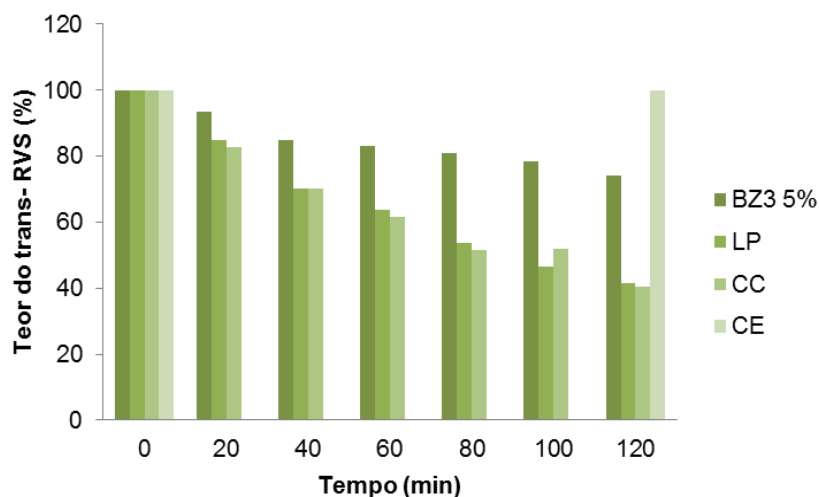


Figura 58: Perfil de fotoproteção UVA da loção com BZ3 5%, loção polawax® e controles

Estudos desenvolvidos para avaliar a fotodegradação de protetores solar sob exposição a radiação UVA natural e sintética, lâmpadas de UVA, mostraram que ambas radiações oferecem ritmo semelhante de fotodegradação dos filtros testados, mesmo sendo a fluência dos raios UVA artificial maiores do que os naturais (GONZALEZ, 2007)

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A busca de novas moléculas com potencial fotoprotetor é extensivamente realizada e, atualmente, se destaca um interesse crescente no desenvolvimento de filtros solares com princípios ativos naturais. A escolha destes novos ativos envolve, principalmente, a capacidade de absorção da luz ultravioleta pelos cromóforos de cada molécula. Existe uma grande quantidade de produtos naturais que podem preencher estes requisitos, tais como os flavonoides.

As análises por CLA-DAD dos extratos etanólicos de *M. taxifolia*, *M. macrophylla* e *M. latifolia* e as frações desta última revelaram uma mistura de compostos flavonoidicos entre eles a QUE. No EEML e suas frações também foi identificado o flavonoide polimetoxilado (calicopterina). A CLAE-DAD mostrou-se um método analítico sensível e adequado para quantificação da QUE e calicopterina presente nas amostras. O perfil cromatográfico apresentado pelos extratos das espécies de *Marsetia* estudadas é condizente com estudos etnobotânicos realizados na família Melomastaceae, que relatam a presença de metabólitos secundários como: fenólicos simples, flavonoides agliconas e glicosilados e glicosídeos cianogenéticos (LOWRY, 1976; CALDERÓN *et al.* 2002; BONFIM-PATRICIO *et al.*, 2002; MIMURA; SALATINO; SALATINO, 2004; VENEZIANI *et al.*, 2006; LEITE, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2012)

A avaliação da atividade antioxidante demonstrou que os extratos etanólicos possuem atividade antirradicalar muito próximo ao controle BHT, o qual possui uma  $CE_{50}$  de  $8,152 \pm 0,365$ . Já as frações do EEML não apresentaram resultados tão elevados quanto os extratos brutos. A MLFR05 só apresentou AA a partir da concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$ . As frações de *M. latifolia* se mostraram bons antioxidantes, porém com valores de  $EC_{50}$  inferiores aos extratos brutos das espécies vegetais investigadas.

A atividade antioxidante da *M. latifolia* como também de *M. taxifolia* e *M. macrophylla* pode ser atribuída à mistura de flavonoides presente nos extratos etanólico, inclusive a quercetina, visto que este é um flavonoide com conhecida ação AA e muitos autores a utilizam como composto antioxidante de referencia a fim de avaliar a atividade de diferentes extratos. Como demonstrado por Vicentini e colaboradores (2007) a quercetina tem forte atividade antioxidante para inibição do DPPH•, com  $IC_{50}$  de  $0,8 \mu\text{g/mL}$ , em estudos com o extrato etanólico de *Psidium guajava* apresentou um  $IC_{50}$  de  $0,15 \text{ mg/mL}$ . E estudos

com a *Calendula officinalis* também apresentou boa atividade antioxidante ( $IC_{50}$ : 4,4  $\mu\text{g/mL}$ ) ambos resultados atribuídos a ação da QUE contra o radical DPPH• (ILHA *et al.*, 2008, FONSECA *et al.*, 2010)

Nas espécies de *Marcetia* o TFT ficou entre 0,098 – 0,168  $\mu\text{g}$  de quercetina/  $\mu\text{g}$  de extrato, o EEMT apresentou um maior TFC para a quercetina. Corroborando os resultados obtidos por CLAE-DAD. Para as frações o TFT ficou entre 0,240 - 0,063  $\mu\text{g}$  de quercetina/ $\mu\text{g}$  de extrato.

Ao comparar os valores de graduação dos fenômenos irritantes obtidos em função do tempo decorrido para sua ocorrência e concentração das amostras com a tabela de classificação do grau de irritação dos extratos avaliados, obtém-se a classificação final de *M. latifolia* e *M. Taxifolia*: irritante fraco e *M. macrophylla*: irritante severo.

A *M. taxifolia* e *M. macrophylla* provocaram atividade hemolítica superior a 50%. Assim a espécie considerada mais segura, de acordo com estes primeiros testes realizados, foi a *M. latifolia*. Desta forma são necessários outros estudos para confirmar a toxicidade do extrato, como também de investigação dos componentes que provocam estas respostas.

Os resultados fornecidos pelas metodologias utilizadas para mensurar as atividades fotoprotetoras *in vitro*, apesar de não serem metodologias oficiais adotada pela ANVISA, que preconiza a metodologia para determinação do FPS pela indução de eritema solar *in vivo*, foram uma boa alternativa para avaliação preliminar do potencial fotoprotetor das espécies de *Marcetia*, visto que estes foram os primeiros estudos desta atividade neste gênero.

Após análise dos perfis fotoprotetores, verificou-se que os EEMT, EEMM e EEML possuem média proteção solar, segundo a ANVISA, pois seus valores de FPS ficaram na faixa de 13,0 – 21,0. A fotoproteção contra a radiação UVA também foi significativa, já que a maior porcentagem de degradação do *trans*-RVS foi de 21,91 % observada no EEML. Quando os extratos foram incorporados a loção polawax<sup>®</sup> todos apresentaram alta proteção solar e também maior proteção UVA, certamente, esta elevação da fotoproteção foi devido ao aumento o teor de flavonoides, visto que a maior concentração dos extratos etanólicos foi de 250  $\mu\text{g/mL}$  e para as formulações a concentração do

extrato chegou a 30%. Todas as formulações tiveram um FPS maior do que a loção BZ3 a 5% e também maior fotoproteção UVA.

A partir de todas as análises, foi possível inferir que as frações de *M. latifolia* apresentaram bons resultados frente às análises a que foram submetidas. A MLFR02, além de comprovada propriedade fotoprotetora UVB/UVA, sendo indicada para indivíduos muito sensíveis a queimadura solar, evidenciou-se por ser mais segura do ponto de vista toxicológico. Apesar da QUE não ter sido detectada na MLFR06 outros flavonols e flavonas podem ser responsáveis pela atividade fotoprotetora da amostra, além de ser, de acordo com os ensaios realizados, segura do ponto de vista toxicológico.

A avaliação dos aspectos físico-químicos das formulações contendo extratos de *Marcetia* e frações de *M. latifolia* evidenciou que as loções são potencialmente viáveis. Os testes de centrifugação, pH, espalhabilidade e características organolépticas foram positivos mas requerem estudos mais aprofundados de estabilidade para comprovação da manutenção de suas propriedades originais, pois foram feitos somente após 24 h da manipulação. Além de buscar um método extrativo que possibilite melhorar o aspecto visual das formulações, pois aspecto de um fitocosmético, em relação a homogeneidade e coloração do produto, é importante do ponto de vista comercial, uma vez que pode influenciar a compra, por parte do consumidor, que não se sente atraído pela aparência do produto, assim as formulações aqui desenvolvidas necessitam de um aprimoramento do ponto de vista.

Estudos complementares *in vivo* devem ser realizados para comprovação da suposição e ratificação da atividade fotoprotetora e aspectos toxicológicos do gênero *Marcetia*, tendo como perspectiva a sua utilização como princípio ativo para formulações fitocosméticas inovadoras.

## REFERENCIAS

- AGATI, G. et al. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. **Plant Physiol. Biochem.**, v.72, p. 35-45, 2013.
- ALVES C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 30, p. 2202-2210, 2010.
- AQUINO-NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- AULTON M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AZZELLINI, S. C. Agentes potencializantes de fotoprotetores. **Cosmetics&Toiletries** (edição em português), p. 34-37.
- BABY, A. R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n. 2, 2008.
- BABY, A. R. et al. UVA I-protection effectiveness of bioactive compound and organic UV filters: an in vitro assessment. **Química Nova**, v. 32, p. 1321-1323, 2009.
- BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 64-70, 2004.
- BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 86, p. 732-742, 2011.
- BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor**. 2011, 267p. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, USP, São Paulo, 2011.
- BARTH, A. L. **Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos**. 2000. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
- BASTUJI-GARIN, S. et. al. Melanoma prevention: evaluation of a health education campaign for primary schools. **Archives of Dermatology**. v.40, p. 135-936, 1999.

- BATISTUZZO, J. A. O.; ETO, Y.; ITAYA, M. **Formulário médico-farmacêutico**. 3 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.
- BEBER, T. C.; SCHNEIDER, N. **Determinação do FPS *in vitro* de filtros solares combinados**. XIV Congresso Nacional de Cosmetologia. São Paulo, 2000.
- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The Journal of nutrition**. v. 133, p. 3248-3254, 2003.
- BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **British Journal off Dermatology**. v. 149, n. 4, p. 841-849, 2003.
- BELO, S. D. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Gingkobiloba***. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.
- BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International journal of pharmaceutics**, v. 426, n. 1, p. 271-279, 2012.
- BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 238-241, 2010.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics & Toiletries**, v. 109, p. 63-78, 1994.
- BOEGER, M. R. T.; POULSON, M. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 329-338, 2006.
- BONDET, V.; MARCA-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Cinética e mecanismos de atividade antioxidante utilizando o DPPH. método radical livre. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.
- BONFIM-PATRÍCIO, M. C. et al. Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya*(Melastomataceae) and their taxonomic meaning. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, p.711-726, 2001.
- BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidatives kindamage. **International Journal of Pharmaceutics**, v.145, n.1-2,p.87-94,1996.



- BORELLA, J. C. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semi-sólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n.2, 2010.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 4, dez. 2006.
- BRASIL, 2012a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, DF. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 01 nov. 2015.
- BRASIL, 2012b. **Resolução RDC n.30 de 01 de junho de 2012**. 04 de junho 2012. Diário Oficial da União, Brasília.
- BRASIL, Resolução RE. n 899, 29 de maio de 2003. **Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. DOU – Diário Oficial da União, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004.
- BRASIL. **Resolução – RDC nº 47, de 16 de março de 2006**. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word=>>>. Acesso em: 28 jan. de 2015.
- BROWN, J. E. et al. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. **Biochemical Journal**, v. 330, p. 1173-1178, 1998.
- BROWN, S.; DIFFEY, B. L. The effect of applied thickness on sunscreen protection: In vivo and in vitro studies. **Photochemistry and photobiology**, v. 44, p. 509-519, 1986.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia, fitoquímica plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2001.
- CALDERÓN, A. I. et al. Isolation and structure elucidation of an isoflavone and a sesterterpenoic acid from *Henriettella fascicularis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1949-1953, 2002.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 500.
- CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Lausanne, v. 84, p. 21-27, 2006.

- CERETTA, R. D. S. R. et al. Câncer de pele: incidência na população residente na região noroeste do Rio Grande do Sul no ano de 2009. **Vivencias**, v.8, p. 86-91, 2012.
- CHEN, L.; H. U, J. Y.; WANG, S. Q. O papel dos antioxidantes na fotoproteção: Uma revisão crítica. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n.5, p. 1013-1024, 2012.
- CHIARI, B. G. et al. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicae Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.
- CHIU, A. et al. Double-blinded, placebo-controlled trial of Green Tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. **Dermatologic surgery**, v. 31, p. 855-859, 2005.
- CHOI, E.J.; CHEE, K.M.; LEE, B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.482, n.1-3, p.281- 285, 2003.
- CHORILLI, M. Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo GranluxGAI-45 TS<sup>®</sup>. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicae Aplicada**, v. 27, n. 3, p. 237-246, 2009.
- CHORILLI, M. Toxicologia dos cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 144, 2007.
- COHEN, C. et al. Episkin: an in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties. **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 4, p. 669-671, 1994.
- COLIPA, G. International sun protection factor (SPF) test method. **Colipa**, mai.2006.
- CREVELIN, E. J. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 8, p. 827, 2006.
- CRUZ, A. V. M; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47 – 52, 2004.
- CUADRA, P.; HARBORNE, J. B.; WATERMAN, P. G. Increases in surfacflavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1377-1383, 1997.
- CUNHA, W. R. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, p. 47-49, 2003.

- CUNHA, W. R. et al. In vitro inhibition of tumor cell growth by *Miconiafallax*. **Pharmaceutical Biology**. v. 46, p. 292-294, 2008.
- CUNHA, W. R. et al. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconiaspecies*. **Planta Medica**, v. 69, p. 115-119, 2003.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Optimização de um método de cromatografia líquida baseada em simultâneo ionização por electrospraye por espectrometria de massa fotodiodo detecção ultravioleta matriz para análise de flavonoides glicosidos. **Comunicações rápidas em espectrometria de massa**, v. 16, n. 24, p. 2341-2348, 2002.
- DAMASCENO, P. K. F. **Atividades Biológicas e Caracterização de Flavonoides por CLAE-DAD-EM/EM de *Marcetia macrophylla* Wurdack (Melastomataceae)**. 2014. Monografia (TCC) – Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2014.
- DAMIANI, E. et al. Changes in ultravioletabsobanceand hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 82, p. 204-213, 2006.
- DEBBASCH, C. et al. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 155-165, 2005.
- DETONI, C. B. et al. Photostabilityand Skin Penetration of Different E-Resveratrol-Loaded Supramolecular Structures. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 4, p. 913-921, 2012.
- DÈVÈHAT, F. L. et al. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, p.400-405, 2002.
- DIFFEY, B. L. Humanexposureto solar ultravioletradiation. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 1, p. 124-130, 2002.
- DORIA, S. R. **Avaliação da qualidade dos produtos cosméticos, protetores solares, em uso no Brasil**.2008. 117 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicæ Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.
- DRAELOS, Z. D. Compliance and sunscreens. **Dermatologic clinics**, v. 24, p. 101–104, 2006.
- DUMAY, O.; KARAM, A.; VIAN, L. Ultraviolet exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presentingcellfunction: Partial protection by a broad spectrum sunscreen. **British Journal of Dermatology**, v.144, p. 1161-1168, 2001.

- DURANGO, E. J. O. **Búsqueda de Sustancias Bioactivas a partir de dos especies de la Flora Colombiana: Alcaloides de *Phaendranassa dúbia* (Amarillidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Cluseaceae)**. 2008. Tese (Doctoramento en Medicamentos, Alimentación y Salud)-Universidad de Barcelona, Barcelona, 2008.
- EDEVRA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.106, p. 135-146, 2005.
- EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in dermatology**, v. 13, p. 375-380, 1995.
- EL-BURY, S. et al. Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 1-5, 2006.
- ENJELKE, M. et al. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. **British Journal of Dermatology**, v. 137, p. 219-225, 1997.
- EVANS J.A; JOHNSON E. J. **The Role of Phytonutrients in Skin Health Nutrients**, v. 2, n. 8, p. 903-928, 2010.
- FARRIS, P. Idebenone, green tea, and Coffeeberry<sup>®</sup> extract: new and innovative antioxidants. **Dermatologic therapy**, v. 20, n. 5, p. 322-329, 2007.
- FAUCONNEAU, B. et al. Estudo comparativo do limpador do radical e propriedades antioxidantes de compostos fenólicos de *Vitis vinifera*, utilizando culturas de células em ensaios *in vitro*. **As ciências da vida**, v. 61, n. 21, p. 2103-2110, 1997.
- FAURSCHOU, A.; WULF, H. The relation between sun protection factor and amount of sunscreen applied *in vivo*. **British Journal of Dermatology**, v.156, n. 4, p. 716-719, 2007.
- FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexilae óleo de andiroba (*carapaguayanensis*)**. 2002. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002.
- FERRARI, M. et al. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapaguianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 626-630, 2007.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FIGUEIREDO, S. A. et al. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/ photochemo preventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.131, p. 65-73, 2014.

- FISHER, G.J; XU, Y. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 1, p. 1-8, 2005.
- FLOR, J; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153, 2007.
- FONSECA, Y. M. et al. Efeito protetor do extrato de *Calendula officinalis* contra o estresse oxidativo induzido por UVB na pele: Avaliação dos níveis de glutatona reduzida e secreção de metaloproteinases da matriz. **Jornal de Etnofarmacologia**, v.127, n. 3, p. 596-601, 2010.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bio flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n.12, p.1061-1080, 1995.
- FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. J. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 263-271, 2009.
- GÁLVEZ, M. V. Antioxidants in Photoprotection: do They Really Work?. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 101, n. 3, p. 197-200, 2010.
- GARCIA, C. R. O Farmacêutico e a Proteção solar. **Pharmacia Brasileira**, v. 13, n.11/12, p. 81- 86, 2001.
- GARCIA, S.; SANTOS, E. P. Avaliação do FPS de produtos comerciais por método *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 71, n. 4, p. 99, 1990.
- GARDONI, L. C. P.; ISAIAS, R. M. S.; VALE, F. H. A. Morfologia e anatomia foliar de três morfotipos de *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae) na Serra do Cipó, MG. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 6, p. 487-500, 2007.
- GARG, A. et al. Spreading of semisolid formulations: an update. **Pharmaceutical technology**, v. 26, p. 84- 105, 2002.
- GASPARRO, P. F.; MITCHNIC, M.; FRANK, J. N. A review of sunscreen safety and efficacy, **Photochem and Photobiology**, v. 3 n. 68 p. 243-256, 1998.
- GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas**. v. 101, n. 8, p. 659-672, 2010.
- GIULIETTI, A. M. Diversidade das Fanerógamas do Semiárido Brasileiro. Recife. **Associação Plantas do Nordeste**, v. 1, 2006.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. R. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. **Rodriguésia**, v.63, n. 1, p. 145-161, 2012.
- GONÇALVES, R. A. **Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. 2000. Dissertação(Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- GONZALES, S.; FERNÁNDES-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-626, 2008.
- GONZALEZ, H. et al. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. **BMC dermatology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2007.
- GONZALEZ, H.; FARBROT, A.; LARKÖ, O.; WENNERG, A. M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **Photobiology**, v. 154, p. 337-340, 2006.
- GOUVÊA, C. M. C. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 531-536, out./dez. 2006.
- GREGORIS, E. et al. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 97-101, 2011.
- GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.
- Guidelines for evaluating sun product water resistance**. Disponível em: <[association/guidelines.html?view=item&id=18](http://www.association/guidelines.html?view=item&id=18)>. Acesso em: 26 mai. 2015.
- GUPTA, D. UV absorbing properties of some plant derived extracts. **Research Journal of Chemical and Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 34-36, 2013.
- GURSOY, N. et al. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2381-2388, 2009.
- HABIF, T. P. **Dermatologia Clínica: guia colorido para diagnóstico e tratamento**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

- HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 49-52, 1997.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, n. 6, p. 845-850, 1994.
- HARBONE, J. B. et al. Six. **Phytochemistry**, v. 31, p. 305, 1992.
- HARBONE, J. B; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HEIM, K. E; TAGLIAFERRO, A. R; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p. 572–584, 2002.
- HEINRICH, U. Comparison of sun protection factors determined by an in vivo and different in vitro methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 26, p. 79-89, 2004.
- HOMMOSS, A. Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations. Department of Biology, Chemistry and Pharmacy of the Freie Universität Berlin (2008): 202.
- HOJEROVA, J.; MOVCIKOVA, A.; MIKUL, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 408, p. 27-38, 2011.
- HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.
- HU, G.; WANG, X.; Research on a natural sunscreen from Chinese herbs. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 175-181, 1998.
- ICCVAM, 2010. Recommended Test Method Protocol. “Hen’s eggtest – chorioallantoic membrane (HET-CAM) test method”.
- IGNAT, I; VOLF, I; POPA, V. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.
- ILHA, S. M. et al., Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

- Instituto do Milênio do Semi-Árido (IMSAR) "Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido brasileiro". **Associação de Plantas do Nordeste**, Recife, v. 2, 2006.
- ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaio físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.
- JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in Europe. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 215-225.
- JARZYCKA, A. et al. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 50-57, 2013.
- KALITA, P.; TAPAN, B. K.; PAL, T. K.; KALITA, R. Estimation of total Flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sessitivum* linn. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**. v. 3, p. 33-37.
- KALOGEROPOULOS, N. et al. Composição química, atividade antioxidante e propriedades antimicrobianas de extratos de própolis da Grécia e Chipre. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 452-461, 2009.
- KERRILEE, E. et al. UV Light Stability of  $\alpha$ -Cyclodextrin/Resveratrol Host-Guest Complexes and Isomer Stability at varying pH. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, p. 921-926, 2009.
- KHAN, M.; PRAY, W. Why patients need protection from the sun. **US Pharm.**, v. 34, n. 7, p. 14-19, 2009.
- KIM, E.; WON NAM, G.; KIM, S.; LEE, H.; MOON, S.; CHANG, I. Influence of polyol and oil concentration in cosmetic products on skin moisturization and skin surface roughness. **Skin Research and Technology**, p. 1- 8, 2007.
- KIRCHOFF, V. W. J. H. **Ozônio e radiação UV-B**. São José dos Campos, São Paulo: Transtec, 1995.
- KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides***. 1991. 228 p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
- KORKINA, L. G.; AFANAS, E. V. I. B. In: SIES, H. **Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 151-163.
- KRURY, E.; BORGES, E. Protetores Solares. **Especial Dermatologia e Cosmiatria**, v. 68, 2011.



- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, 2005. p. 937-958.
- LANGE, M. K.; HEBERLE, G.; MILAO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, n. 1, 2009. p.145-151
- LEITE T. C. C. et al. Antimicrobial activity of *Marcetia* DC species (Melastomataceae) and analysis of its flavonoids by reverse phase-high performance liquid chromatography coupled-diodearray detector. **Pharmacognosy Magazine**. v. 8, p. 209-214, 2012.
- LEITE, T. C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero *Marcetia* (Melastomataceae)**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. Medfarma, 1. ed., p. 56-57. 2000.
- LEONARDI, G. R. Produtos para a face. In: \_\_\_\_\_. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004. p. 147-155
- LEONARDI, G. R.; GASPARI, L. R.; CAMPOS, PMBGM. 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 Brasileiro de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.
- LI, S. et al. Chemistry and health effects of polymethoxy flavones and hydroxylated polymethoxy flavones. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 1, p. 02-12. 2009.
- LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 2009. 156 f. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais) –, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRR, Seropédica, Rio de Janeiro –RJ. 2009.
- LIMA, R. G. G. et al. Avaliação da potencial fotoprotetora *in vitro* contra raios UVB E UVA de espécies de *Marcetia*. **Infarma**. v. 27, p. 263, 2015.
- LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; RINALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 889 – 897. 2009.
- LOWRY, J. B. Anthocyanins of the Melastomataceae, *Myrtaceae* and some allied families. **Phytochemistry**. v. 15, p. 513-516, 1976.
- LUCCI, A.; CITRO, H.W.; WILSON, L. Assessment of knowledge of melanoma risk factors, prevention, and detection principles in Texas teenagers. **Journal of Surgical Research**, v. 15, p. 83-179. 2001.

- LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, **Food Chemical and Toxicology**, v. 23, p. 287-291, 1985.
- MAILLAN, P. e tal. Protecting against UV - induced degradation and enhancing shine. **Cosmetics & Toiletries**, v. 120, p. 65-71, 2005.
- MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; AHAMED, H.N.; SAHA, B.P.; MUKHERJEE, P.K. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in carbontetrachloride-induced a cuteliveri njury in rats: a comparative study. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v.4, n.2, p.84-90, 2005.
- MALSAWMTLUANGI, C.; NATH, D. K.; JAMATIA, I.; ZARZOLIANA, E.; PACHUAU, L. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 3, n. 9, p. 150-151, 2003.
- MANSUR M. C. P. P. R. **Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar**. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M.C. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.3, n. 61, p.121-124, 1986.
- MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. **Academic Press**, p. 113, 1982.
- MARKHAN, K. R.; RYAN, K.G.; BLOOR, S.J, MITCHELL, K. A. An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* UV-B enhancement. **Phytochemistry**, v. 48, p. 791-794, 1998.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v.17, n.6, 2002.
- MARTINS, A. B. **Revisão taxonômica do gênero *Marcetia***. 288p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas 1989.
- MARTORANA, M.; ARCORACI, T.; RIZZA, L.; CRISTANI, M.; BONINA, F. P., SAIJA, A.; TOMAINO, A. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. **Fitoterapia**, v. 85, p. 41-48, 2013.
- MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, n.4, p. 42-53, jul-ago. 2003.

- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 298-308, 2004.
- MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 44, n. 2, 2008.
- MENDONÇA, V. L. M. **Protetores solares de alta proteção. Estabilidade física e eficácia**. Tese de Doutorado, FCFA/SP - Curso de Pós-Graduação, 1998.
- MENEZES, P. R.; SCHWARZ, E. A.; SANTOS, C. A. M.; In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia*, v. 75, p. 398-400, 20
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 30- 127, 2001.
- MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A.; CORTE, T. W. F.; Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 649-657, 2007.
- MILESI, S.S.; GUTERRESS, S. S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v. 18, p. 81-87, 2002.
- MIMURA, M. R. M.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Distribution of flavonoids and the taxonomy of *Huberia* (Melastomataceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 32, v. 1, p. 27-34, 2004.
- MISHRA, A. K; MISHRA, A; CHATTOPADHYAY, P. Assessment of *In Vitro* Sun Protection Factor of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) essential oil formulation. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, p. 17-21, 2012.
- MOON, S.K. et al. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK 1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 4, p. 1069-1078, 2003.
- MUNHOZ, V. M. et al. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 225-232, 2012.
- MÜNDEL, K.; BUECHI, J.; SCHULTZ, O. E. (Hrsg.) **Galenisches Praktikum**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1959.
- MURILLO, G. et al. Estudio comparativo de tres variantes de ensayo de la membrana corioalantoide del huevo de lagallina para la evaluación de la irritación ocular. **Revista de Toxicología**, v. 20, p. 187- 192, 2003.

- MURPHY, G. M., An update on photoprotection. **Journal of Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 18, p. 1-4, 2002.
- NASCIMENTO, S. C. et al. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n.4, p. 334- 339, 2009.
- NASH, J. F.; TANNER, P. R.; MATTS, P.J. Ultraviolet A Radiation: testing and labeling for sunscreen products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 63-74, 2006.
- NEALE, R.; WILLIAMS, G.; GREEN, A. Application patterns among participants randomized to daily sunscreen use in a skin cancer prevention trial. **Archives of Dermatology**, v. 138, p. 1319-1325, 2002.
- NEVES, K. Efeitos do Sol sobre a pele. Proteção solar: edição temática. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 37, 2008.
- NEVES, K. Testes de eficácia: é o que caracteriza o produto. **Cosmetics & Toiletries**. n. 3, p.18-23, 2008.
- NEVES, S. P. S; CONCEIÇÃO, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botanica Brasilica.**, v. 24, n. 3, p. 697-707, 2010.
- NICHOLS, J. A; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v. 302 p. 71–83, 2010.
- NISHIKAWA, D. O. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de formulações fotoprotetoras bioativas**. 91p. 2012. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo. 2012.
- NÓBREGA, A. M.; ALVES, E.; PRESGRAVE, R. F.; DELGADO, I. F. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 6, n. 2, p. 103-120, 2008.
- NORVAL, M. Effects of solar radiation on the human immune system. **Journal of Photochemical and Photobiology**, v. 63, p. 28-40, 2001.
- NUNES, P. M. P. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e sua aplicação na área cosmética**. 2001. 175f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- OKEREKE, C. S.; BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Safety evaluation of benzophenone after dermal administration in rats. **Toxicology Letters**, v.80, p. 61- 67, 1995.

- OLIVEIRA, D. A. G. C. et al. Protetores solares, radiações e pele. **Cosmetics&Toiletries**, v. 16, n. 2, p. 68-72, 2004.
- OLIVEIRA, R. G. et al. Dried extracts of *Encholiriumspectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, p. 102-105, 2013.
- ORALLO, F. Estudos comparativos dos efeitos antioxidantes do cis-e trans-resveratrol. **Química medicinal atual**, v. 13, n. 1, p. 87-98, 2006.
- ORIÁ, R. B. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. 2008. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.78, n. 4, p. 425-434.
- OZER,O.; MENEMENLIOGLU, D.; ERTAN, G. Photostability of menthylanthranilate in diferente formulations. **Cosmetics & Toiletries**, v. 116, p. 67-72. 2001.
- PAOLA, M. V. R. V.; RIBEIRO, M. E. Interação entre filtros solares. **Cosmetics & Toiletries**, v. 10, p. 40-50, set-out. 1998.
- PARRISH, J. A.; JAENICKE, K. F.; ANDERSON, R. Eritema e espectros de pele humana normal acção melanogénese. **Photochemistry e Photobiology**, v. 36, n. 2, p. 187-191, 1982.
- PAULA I. C. et al. Development of Ointment Formulations Prepared with Achyrocline satureioides Spray-Dried Extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 3, p. 235 – 241, 1998.
- PEREZ, J. A. S. et al. Squamous cell carcinoma (SCC) secondary to recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB): clinical, genetic, and molecular correlations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 4, 158 p. , 2012.
- PERUGINI, P. S.; SIMEONI, S.; SCALIA, I.et. al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 37-45, 2002.
- PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreens. **Current Problems in Dermatology**.v.12, n. 6, p. 287-290, 2000.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Estética cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998.
- PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants.**Journal of natural products**, v.63, p.1035-1042, 2000.
- PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection.**Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

- POLONINI, H. C. et al. Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23. n. 6, p. 4506-4510, 2013.
- POULSON, M. E.; BOEGER, M. R. T.; DONAHUE, R. A. Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. **Photosynthesis Research**, v. 90, n.1, p. 79-90, 2006.
- PROENÇA, K. D. S. et al. 2009. Avaliação da estabilidade de emulsões O/A com fotoprotetores. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.90, p. 132-136.
- RAMOS, A. A. et al. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 177, p. 66-73, 2008.
- RANGEL, V. L. B. I. **Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas**. 1998. 138p. Tese(Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. 2010, 118p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química, UFBA, Salvador. 2010.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada à Dermoestética**. 2. ed São Paulo: Pharmabooks, 2010.
- RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais**. 104 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Rio de Janeiro Faculdade de Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, 2004.
- RIBEIRO, R. P.; SANTOS, V. M.; MEDEIROS, E. C. Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Pharmacia Brasileira**, v. 16, n. 7-8, p. 83-86, 2004.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Journal Biochemical pharmacology**, v.37, p. 837-841,1988.
- ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review. **The Analyst**, v.122, p.11-34, 1997.
- RODRIGUES, J. et al. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 1, p. 120-126, 2008.
- ROMERO, R. **Biodiversidade da flora dos campos rupestres de Goiás, sudoeste e sul de Minas Gerais**. In: Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil, (Sociedade Botânica do Brasil), UFRPE, Recife, p. 81-87, 2002.

- ROSA, M. B. et al. Estudo espectrofotométrico da atividade foto-protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* Var, *Capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Rorophyllum ruderale* (JACQ.). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.1, p. 101-110, 2008.
- ROSEN, M. R. **Delivery system handbook for personal care and cosmetic products**. William Andrew Inc, p. 77-100, 2005.
- ROY, C. R.; GIES, H. P.; TOOMEY, S. The solar UV radiation environment: Measurement techniques and results. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.31, p.21, 1995.
- RUFINO, M. et al. **Metodologia Científica**: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. EMBRAPA, n. 127, 2007.
- RUVOLO JÚNIOR, E. C. Proteção solar: comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (*in vivo*), FDA, COLIPA, SAA. **Cosmetics Online**, v. 19, n. 105, p. 37-46.
- SAID, T. et al. Cytoprotective effect against UV-induced DNA damage and oxidative stress: role of new biological UV filter. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 30, p. 203-210, 2007.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.175, n.1, p.85-94, 1998.
- SALGADO, C.; GALANTE, M. C.; LEONARDI, G. R. Filtros Solares: Mecanismo de ação e metodologias em preparações magistrais. **Jornal Internacional de Composição Farmacêutica**, v. 6, n. 4, p.224-236, Julho- Agosto, 2004.
- SALVADOR, A.; HENRIQUES, M. D. Determination of butyl methoxydibenzoylmethane, benzophenone-3, octyldimethyl PABA and octylmethoxycinnamate in lipstick. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 25, p. 97-102, 2004.
- SANTOS, A. B. et al. Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and spin trap DMPO. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n.8, p. 1483-1492, 2009.
- SANTOS, A. K. A. **A família Melastomataceae: Tribo Melastomataceae Bartl. no município de Rio de Contas – Bahia, Brasil**. Feira de Santana, 150p. 2005. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana. 2005.
- SANTOS, E. P. et al. *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1999.

- SANTOS, F. V. et al. Mutagenicity of *Mouriripusa* Gardner and *Mouririelliptica* Martius. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2721–2727, 2008.
- SARAF, S.; KAUR, C. D. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 7, p. 1, 2010.
- SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 559-565, 1979.
- SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. 2011, v. 86, n. 3, p. 1-507.
- SCHMITZ-HOERNER, R.; WEISSENBOCK, G. Contribuição de compostos fenólicos com a capacidade de triagem UV-B de desenvolvimento primário cevada deixa em relação a danos e reparação do DNA sob níveis elevados de UV-B. **Fitoquímica**, v. 64, n. 1, p. 243-255, 2003.
- SHAATH, N. A. Evolution of moderns sunscreen Chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: **Marcel Dekker**, p. 589-600, 1997.
- SHAATH, N. A. The chemistry of sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, v. 10, n. 3, p. 55-70, 1986.
- SHAATH, V. P. IV-IVC for topically applied preparations-a critical evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, n.2, p.309-314, 2005.
- SILVA FILHO, E. A.; SENA, G. L.; PIRES, J. M. Moléculas inibidoras de radiações UV. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 82-84, 2003.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94 -103, 1999.
- SILVA, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449- 454, 2002.
- SILVA, M.M.; SANTOS, M.R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v.36, n.11, p.1219-1227, 2002.
- SILVA, V. V. et al. Chemical stability and SPF determination of Pothomorphe umbellata extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, n. 1, p. 125-131, 2005.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004.

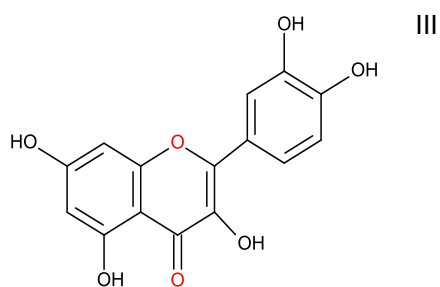
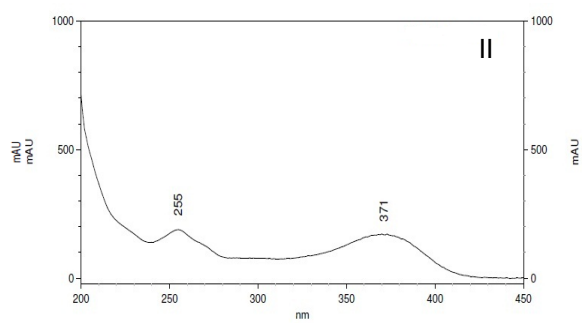
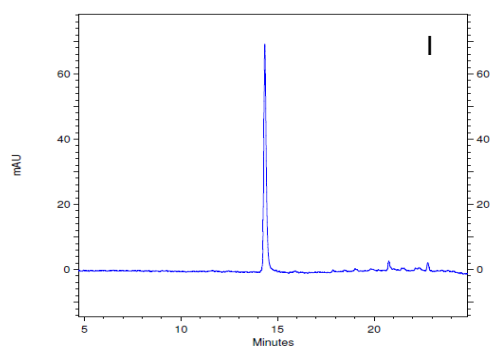


- SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.3-4, p.375-383, 2000.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. **Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 91-113, 1997.
- SOUZA, F. P.; CAMPOS, G. R.; PACKER, J. F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n.1, p.69-772, 2013.
- SOUZA, P. A. de. et al. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 922-928, 2010.
- SOUZA, S. R. P.; FISCHER, F. M.; SOUZA, J. M. P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 59-66, 2004.
- SOUZA, V. M. **Ativos dermatológicos**. 2. ed. São Paulo: Tecnopress, v. 1, p. 63-81, 2004.
- SPAGNA, G. et al. Chemical analysis and photoprotective effect of an extract of wine from *Jacquez* grapes. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 82, p. 1867–1874, 2002.
- STEINER, D. Temas dermatológicos: maioria da população não se protege do sol. **Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)**, v.17, p. 36, ago, 2005.
- STOKES, R.; DIFFEY, B. How well are sunscreen users protected? **Photodermatol Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 13, n. 5-6, p. 8-168, 1997.
- SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with  $\alpha$ -linolenic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.11-12, p.1313-1323, 1999.
- TERAHARA, N. et al. A diacylated anthocyanin from *Tibouchin aurvilleana* flowers. **Journal Natural Product** v. 56, p. 335-340, 1993.
- TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. 2009. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n.5, 445-459.
- TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food**, v. 44, p. 1253-1257, 1996.

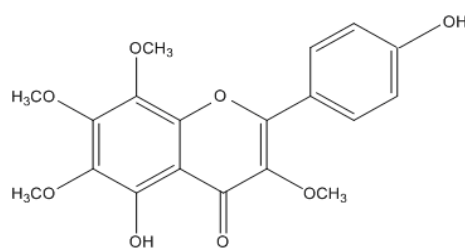
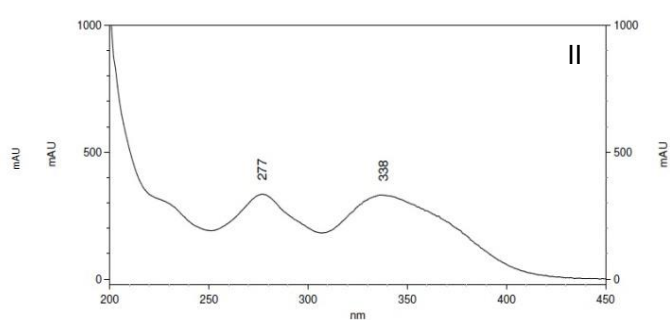
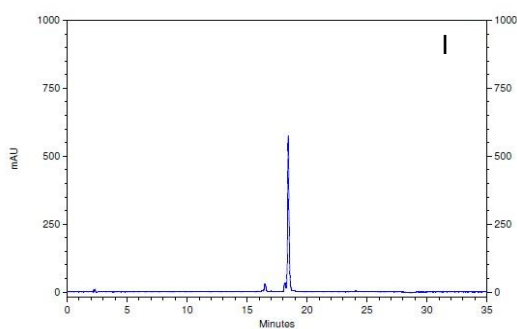
- UITTO, J. et al. Molecular aspects of photoaging. **European Journal of Dermatology**. v. 7, n. 3, p.210-214, 1997.
- URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, p. 99 -104, 2001.
- URSINI, F. et al. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, n.5, p.547-553, 1994.
- VASCONCELOS, M. A. L. et al. *In vivo* analgesic and antiinflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans*(Melastomataceae) . **Journal of Biosciences**, v. 61, p. 477-482, 2006.
- VASCONCELOS, P. C. P. et al. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriripus* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**. v.115, p. 293–301, 2008.
- VELASCO M. V. R. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, p.23-7, 2008.
- VENEZIANI, R. C. S. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution by gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827-830, 2006.
- VICENTINI, F. T. et al. Evaluation of protective effect of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin against UVB-induced damage in hairless mice skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v.13, p. 275-285, 2010.
- VICENTINI, F. T. M. C. Influência do veículo na atividade antioxidante de quercetina: uma formulação líquida cristalina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 805-810, 2007.
- VINARDELL, M. P.; GARCIA, L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p.551-556, 2000.
- VINARDELL, M.P.; MITJANS, M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation by commonly used laboratory solvents. **Toxicology In Vitro**, v.20, p. 1066-1070, 2006.
- VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n. 2A, p. 452-457, abr-jun. 2009.
- VOLOCHTCHUK, O. M. et al. Variações do pH dos sabonetes e indicações para sua utilização na pele normal e na pele doente. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 75, n. 6, p.697-703, 2000.

- WALLE, T. Methoxylatedflavones, a superior cancer chemo preventive flavonoidsubclass?. **Seminars in cancer biology**. v. 17, p. 354-362, 2007.
- WANG, S. Q.; OSTERWALDER, U.; JUNG, K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65. n. 3, 525-530, 2011.
- WULF, H. C.; STENDER, J. M.; LOCK-AUDERSEN, J. Sunscreen used at the beach does not protect against erythema: a new definition of SPF is proposed. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 13, n. 4, p. 2- 129, 1997.
- YESUDIAN, P. D.; KING, C. M. Urticária de contacto grave e anafilaxia de benzofenona-3 (2-hidroxi 4-metoxi benzofenona). **A dermatite de contacto**, v. 46, n. 1, p. 55-56, 2002.
- YOSHIDA, T. et al. Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multiflora*. **Phytochemistry**, v. 52, 1661p, 1999.
- YOSHIDA, T.; ITO, H.; ISAZA, J. H. Pentameric ellagitannin oligomers in melastomataceous plants-chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v.66, p. 1972-1983, 2005.
- YOSHIDA, T. et al. Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 79-106, 2010.

APÊNDICE A: Cromatograma (I), espectro de UV (II) e estrutura química (III) do padrão quercetina (Tr = 14,33 min)



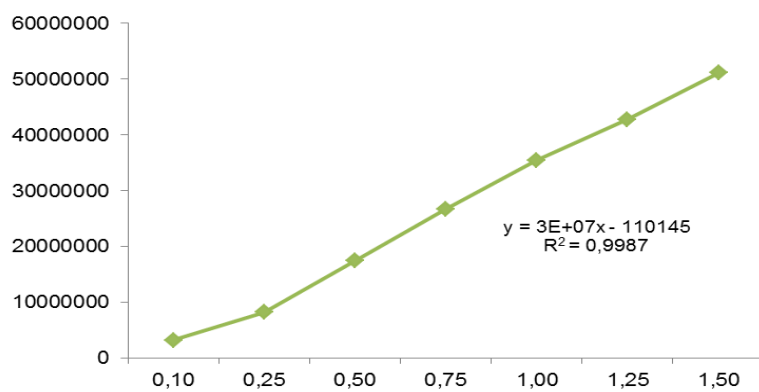
APÊNDICE B: Cromatograma (I), espectro de UV (II) e estrutura química (III) padrão calicopterina (Tr = 18,48 min)



## APÊNDICE C: Valores experimentais para construção da curva de calibração da quercetina

Concentração nominal (mg/mL)	Área de integração do pico (mAU)	Média da área de integração do pico (mAU)
0,1	325254	
0,1	320907	323303
0,1	323747	
0,25	867255	
0,25	801269	826392
0,25	810652	
0,5	1659224	
0,5	1745800	1749028
0,5	1752255	
0,75	2673998	
0,75	2677825	2676248
0,75	2676920	
1,0	3509921	
1,0	3564751	3547204
1,0	3566939	
1,25	4280376	
1,25	4276194	4279939
1,25	4283248	
1,5	4953222	
1,5	5217264	5112328
1,5	5166497	

## APÊNDICE D: Curva calibração da quercetina

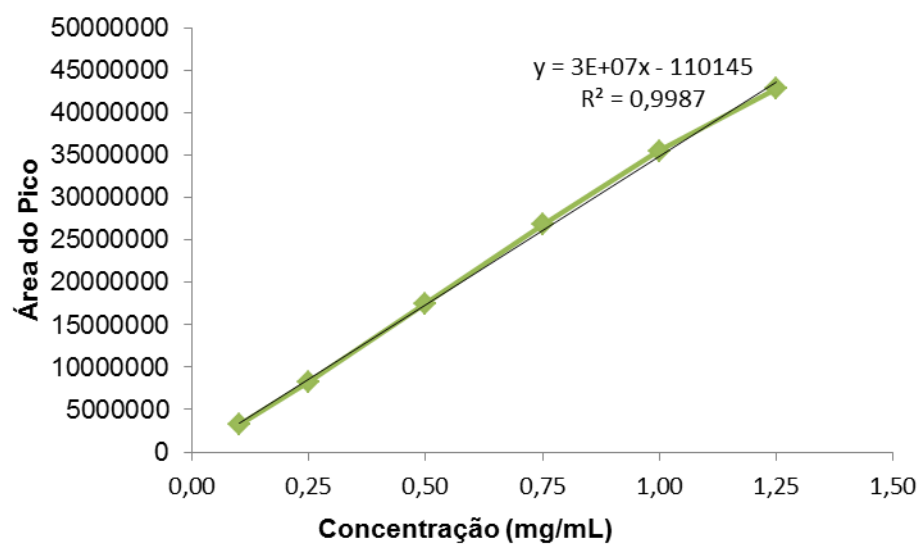


APÊNDICE E: Valores experimentais para construção da curva de calibração da calicopterina.

Volume Injetado ( $\mu\text{L}$ )	Concentração nominal (mg/mL)	Área de integração do pico (mAU)	Média da área de integração do pico (mAU)
2	0,01	1171160	
2	0,01	1145302	1156103
2	0,01	1151847	
5	0,025	1612943	
5	0,025	1612968	1610766
5	0,025	1606388	
10	0,05	3234778	
10	0,05	3374568	3311774
10	0,05	3325977	
15	0,075	4979614	
15	0,075	5058814	5009150
15	0,075	4989023	
20	0,10	5991400	
20	0,10	6550528	6406464
20	0,10	6677465	
25	0,125	8325196	
25	0,125	7999925	8211534
25	0,125	8309482	
30	0,15	10029678	
30	0,15	9990910	10041775
30	0,15	10104738	
40	0,20	13496822	
40	0,20	13598910	13552221
40	0,20	13560931	



## APÊNDICE F: Curva calibração da calicopterina



APÊNDICE G: Parâmetros para validação da quantificação da quercetina nos extratos de *Marsetia* ssp e frações de *M. latifolia*

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração experimental (mg/mL)	$\delta$	Precisão	Exatidão (%)
0,1 mg/mL	0,09	0,002	1,1614	95
0,25 mg/mL	0,28	0,003	0,955	110
0,75 mg/mL	0,90	0,002	0,257	119
1 mg/mL	1,14	0,009	0,751	137
1,5 mg/mL	1,77	0,037	2,185	115,33

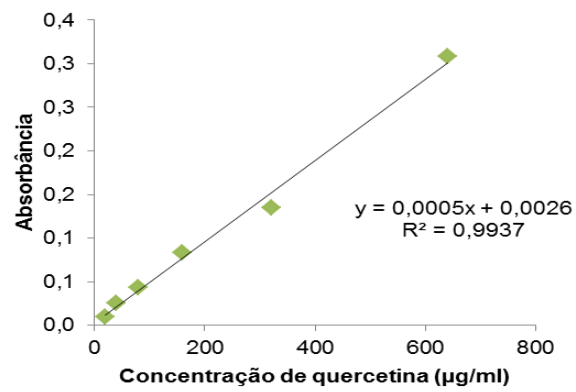
LD: 0,011 e LQ: 0,04

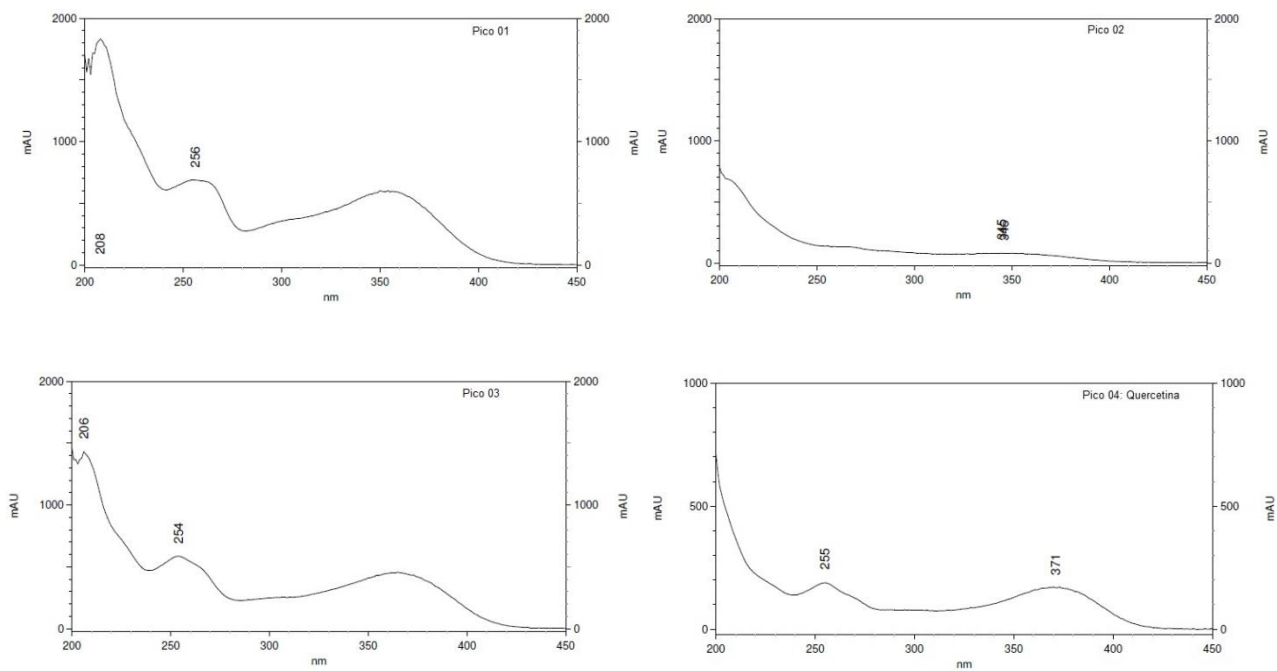
APÊNDICE H: Parâmetros para validação da quantificação da calicopterina no extrato de etanólico e frações de *M. latifolia*

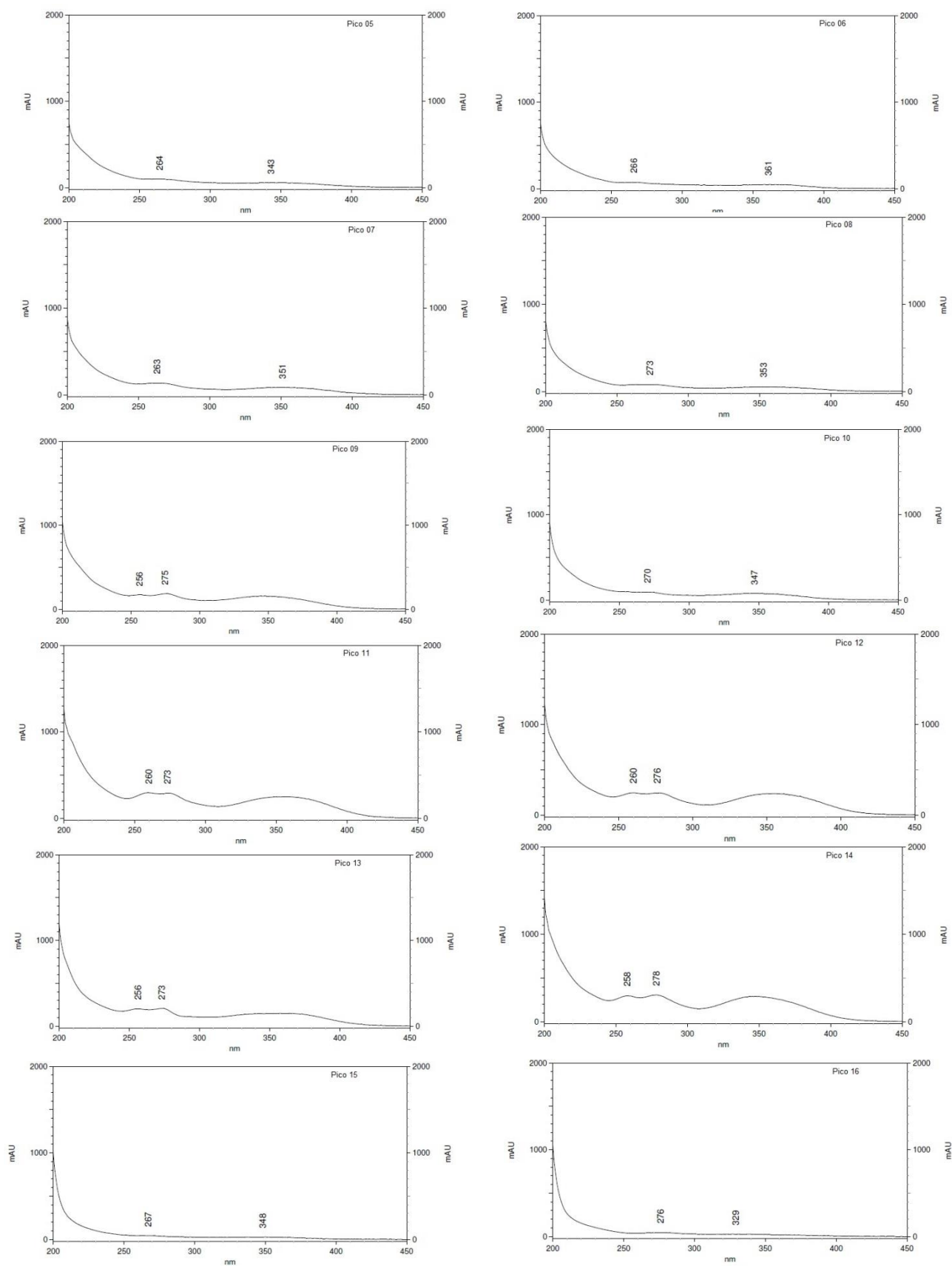
Concentração encontrada (mg/mL)	$\delta$	Precisão	Exatidão (%)
0,023	0,001	2,510	92
0,096	0,001	1,042	96
0,189	0,001	0,614	94,5

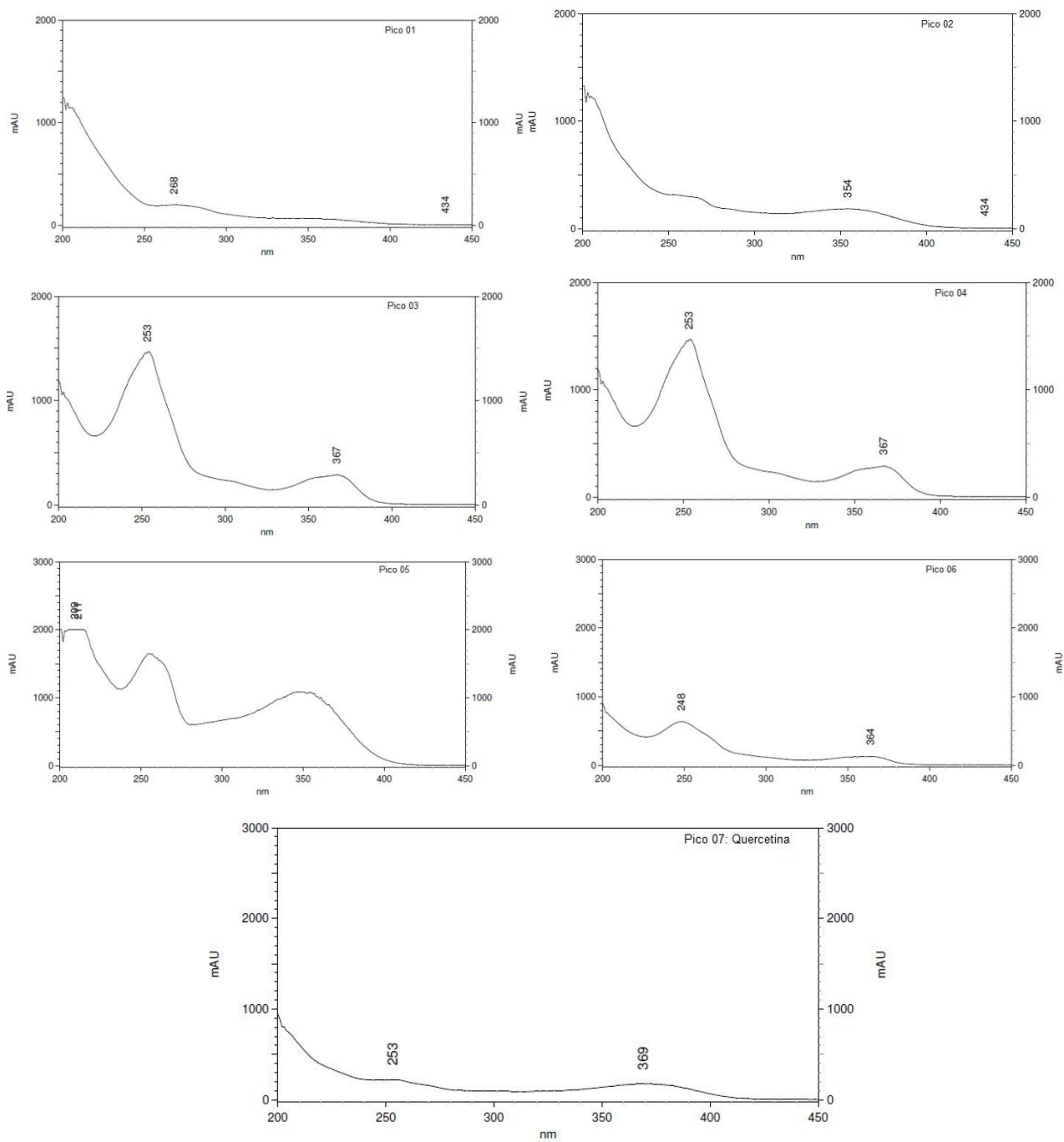
LD: 0,0037 e LQ: 0,0123

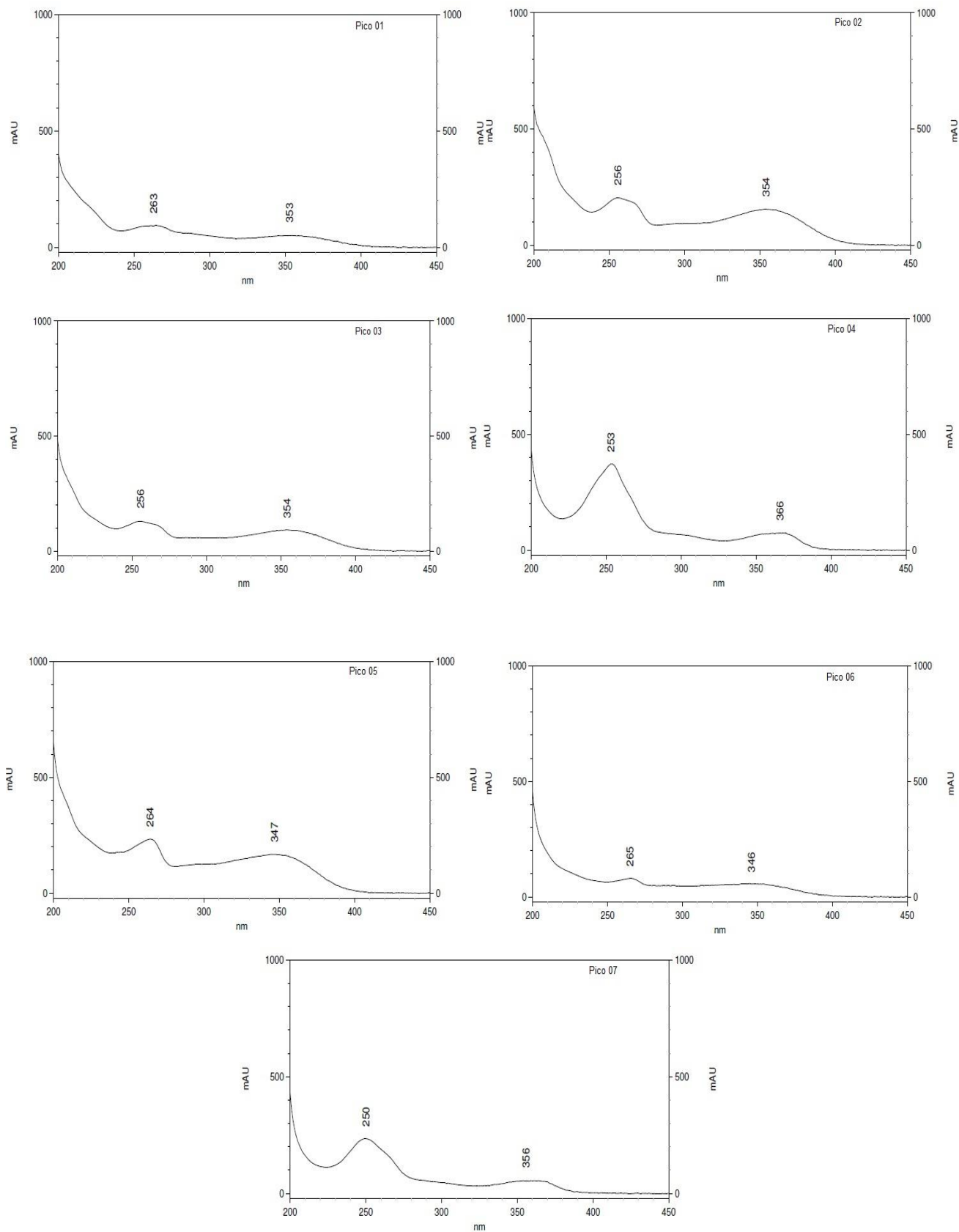
## APÊNDICE I: Curva analítica da quercetina padrão para quantificação do TFT



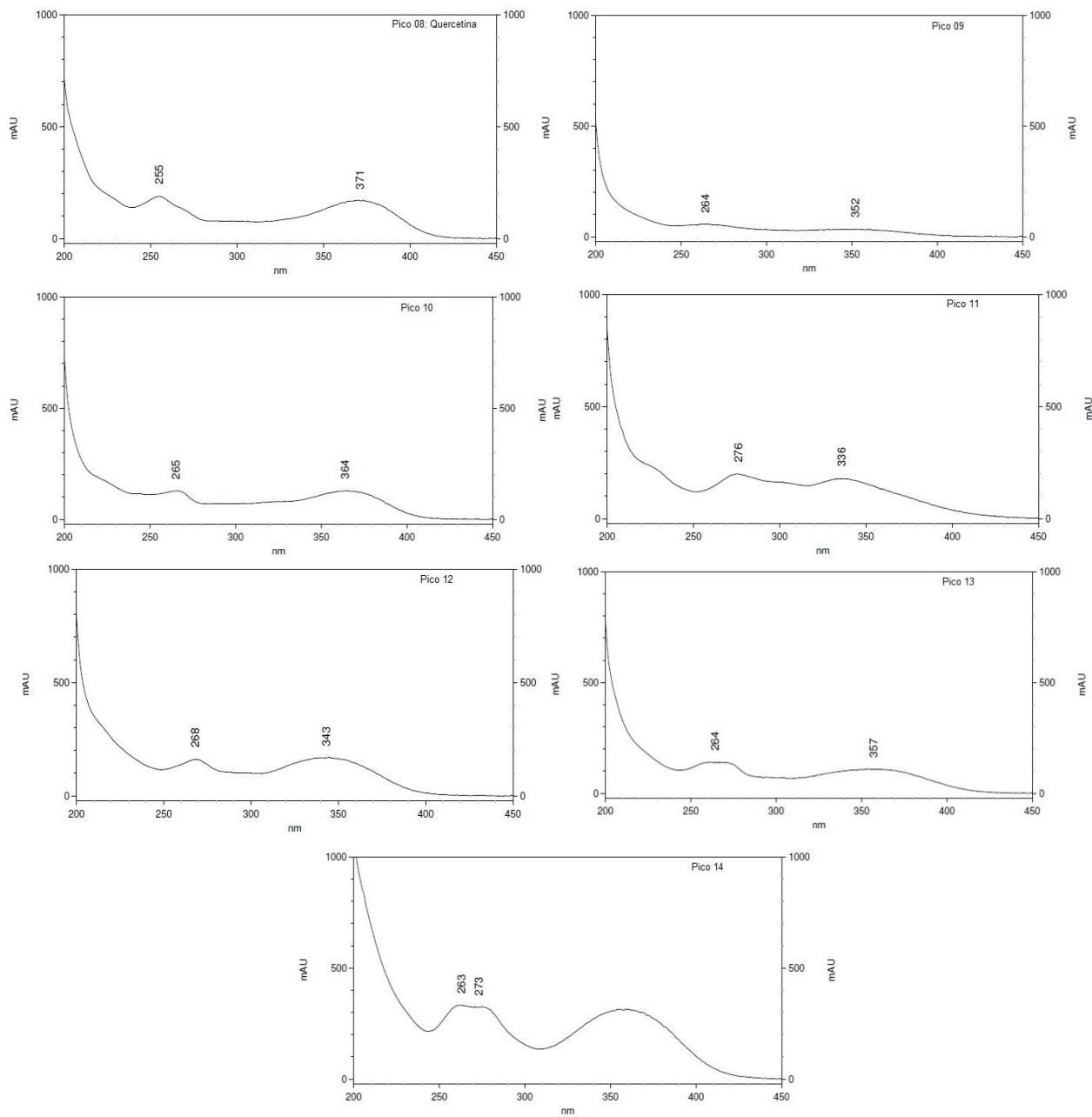
APÊNDICE J: Espectros de UV dos Tr 11-14 min. de *M. taxifolia*

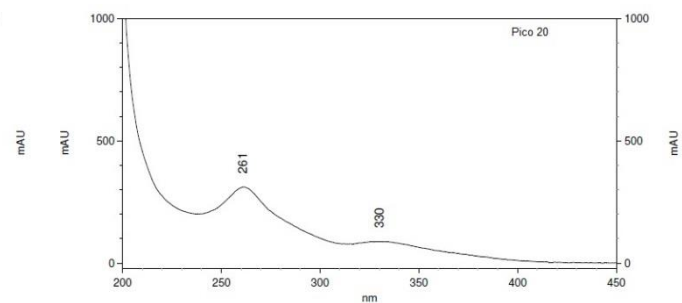
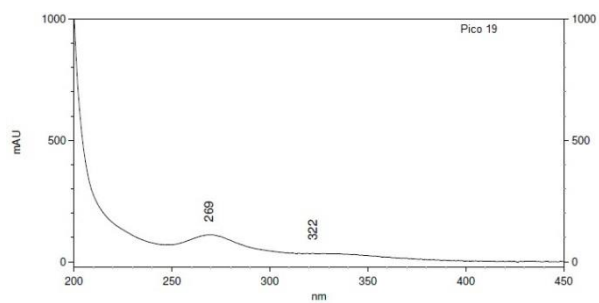
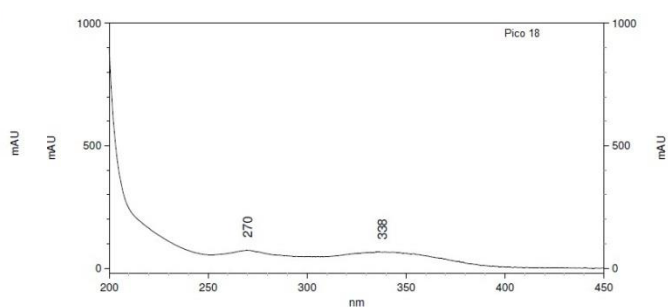
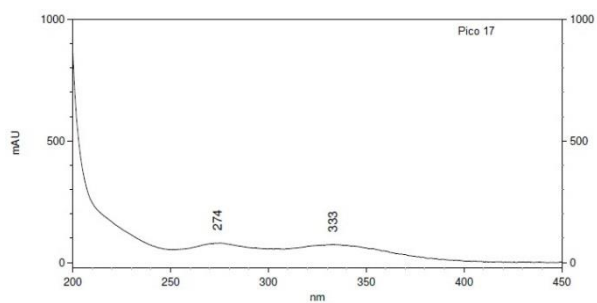
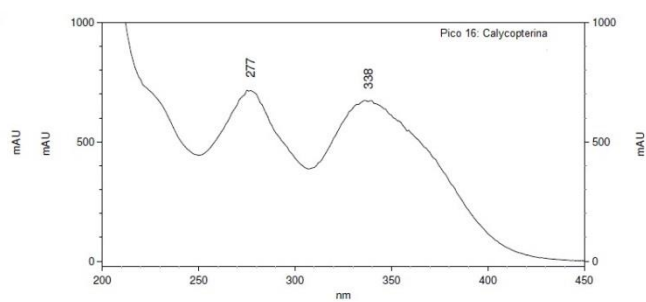
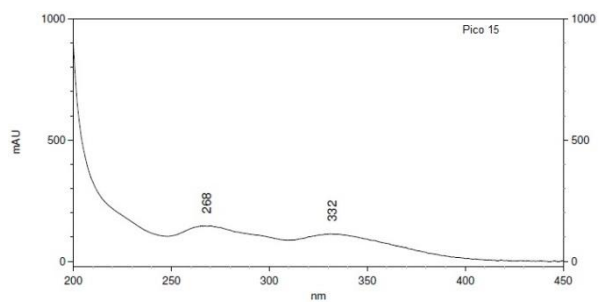
APÊNDICE L: Espectros de UV dos Tr 15 -21 min de *M. taxifolia*

APÊNDICE M: Espectros de UV de *M. macrophylla*

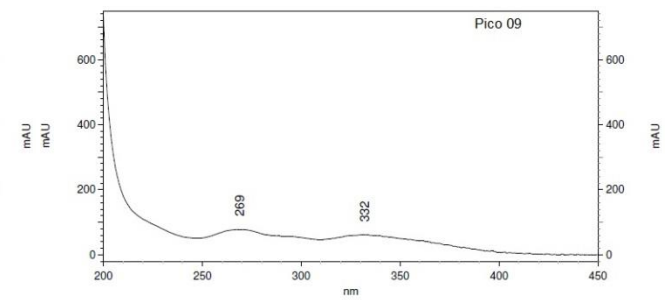
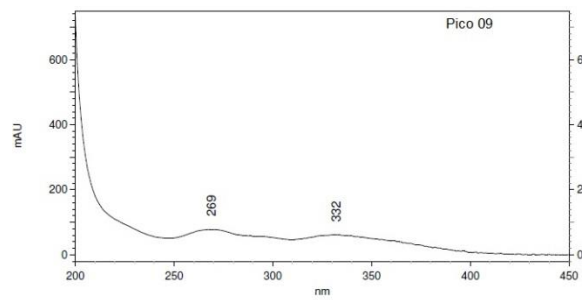
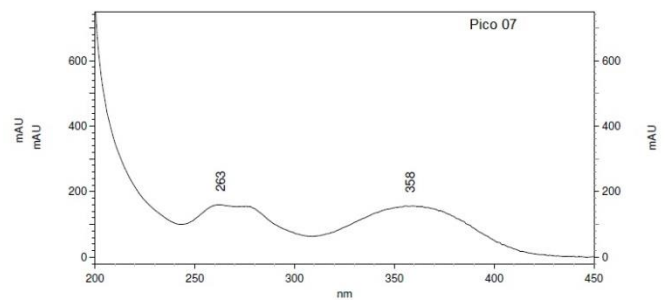
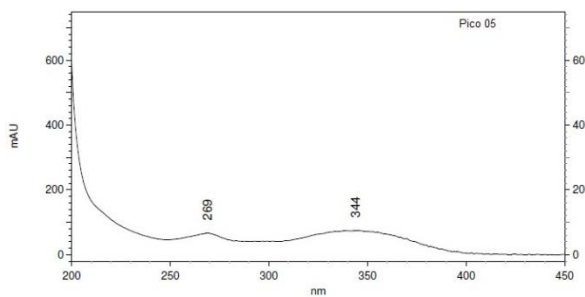
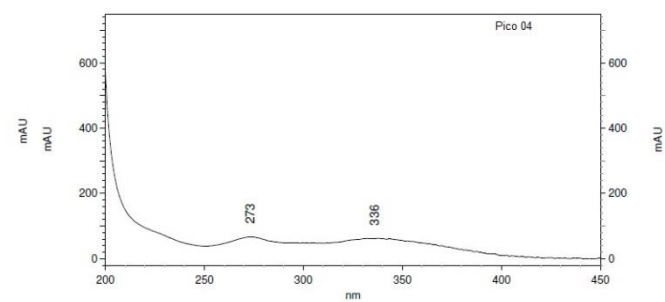
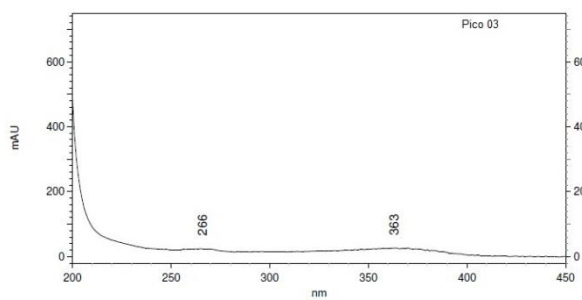
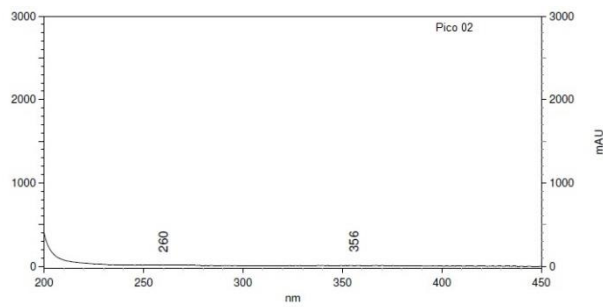
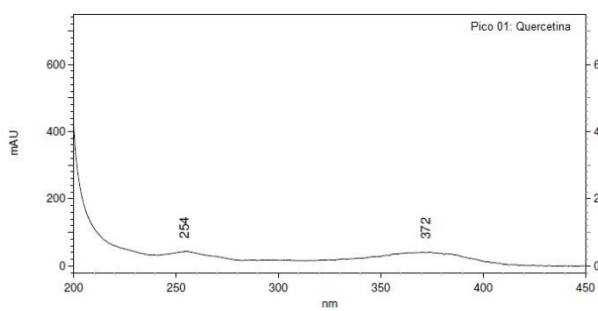
APÊNDICE N: Espectros de UV de *M. latifolia*



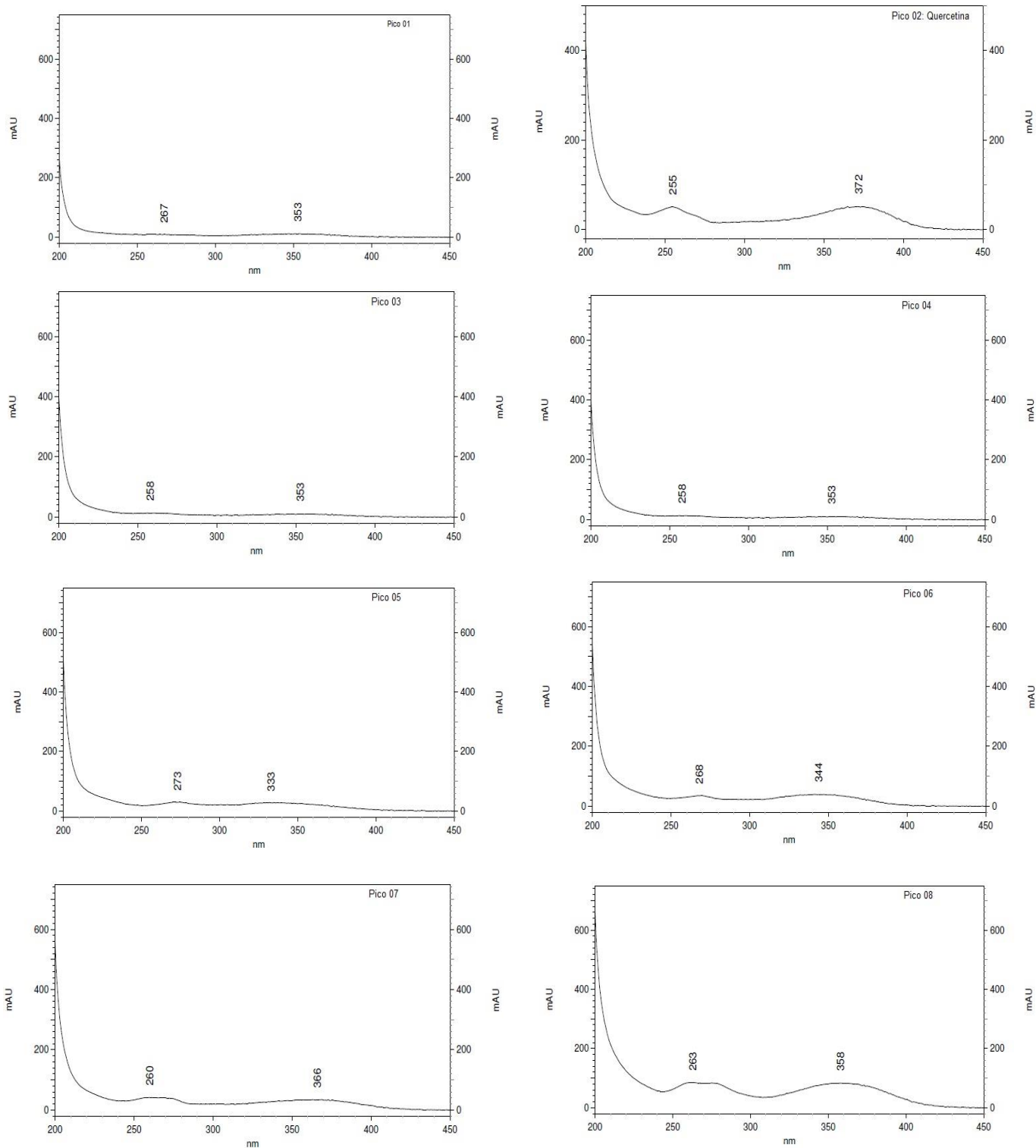
APÊNDICE O: Espectros de UV de *M. latifolia*

APÊNDICE P: Espectros de UV de *M. latifolia*

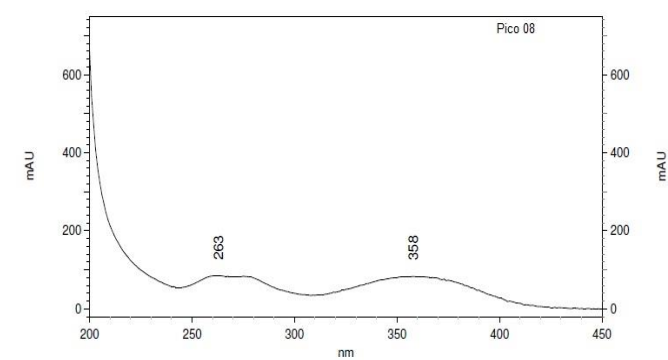
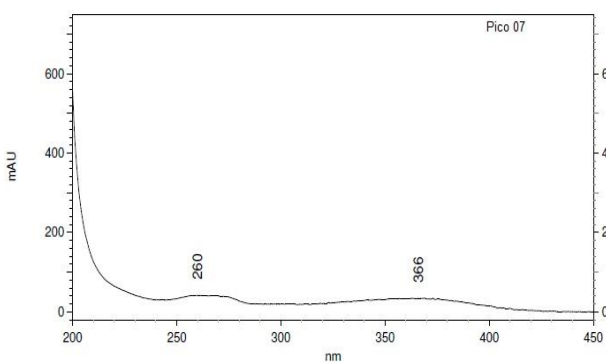
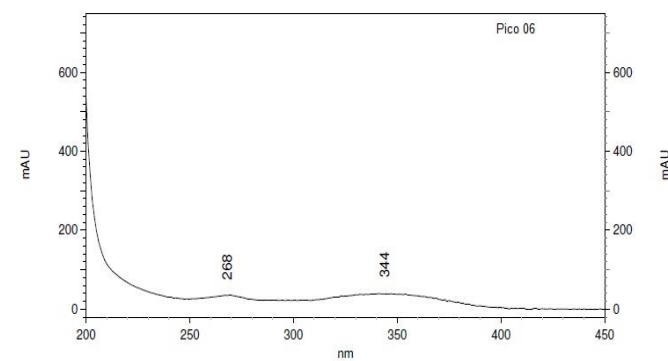
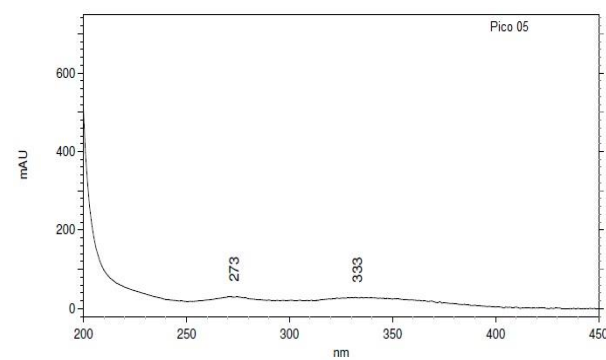
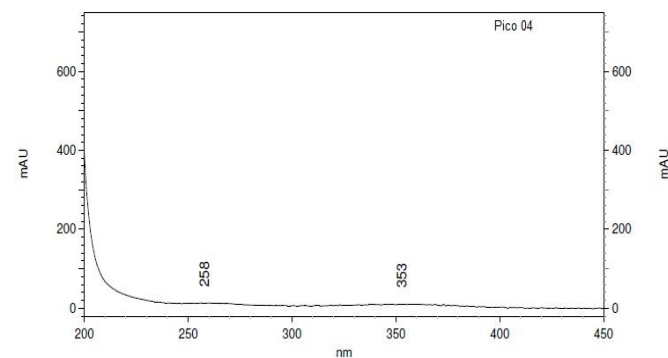
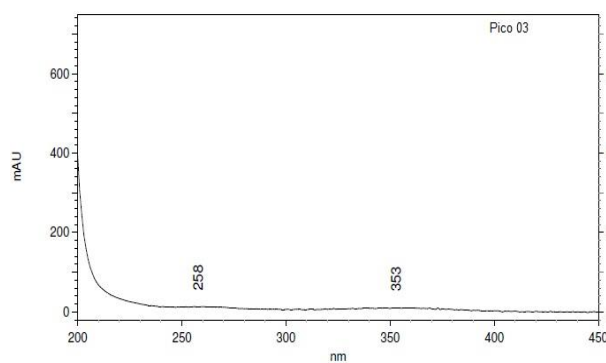
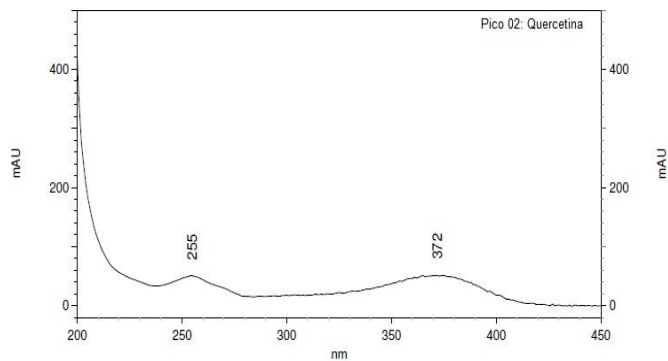
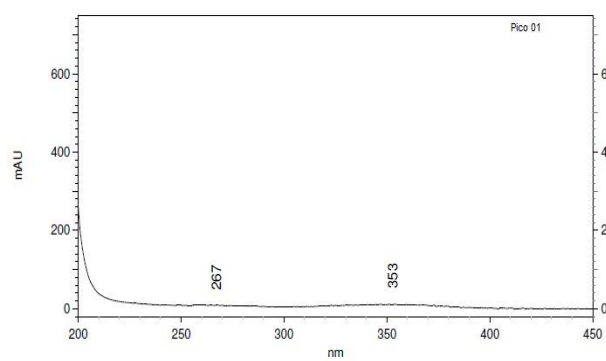
## APÊNDICE Q: Espectros de UV MLFR02



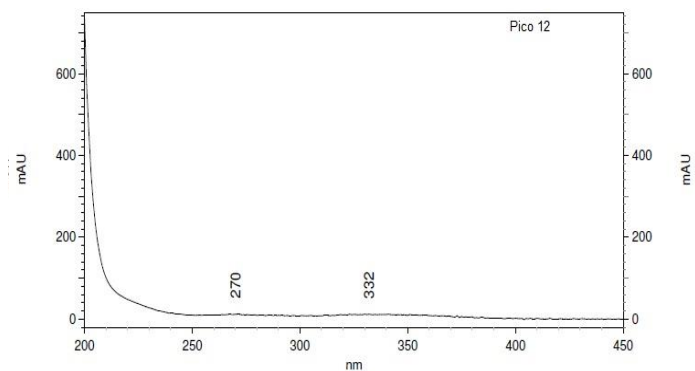
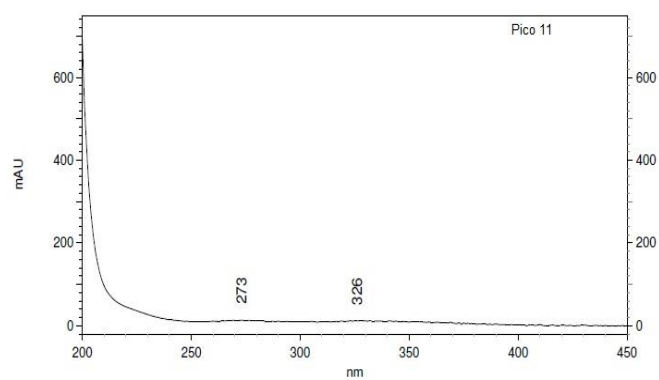
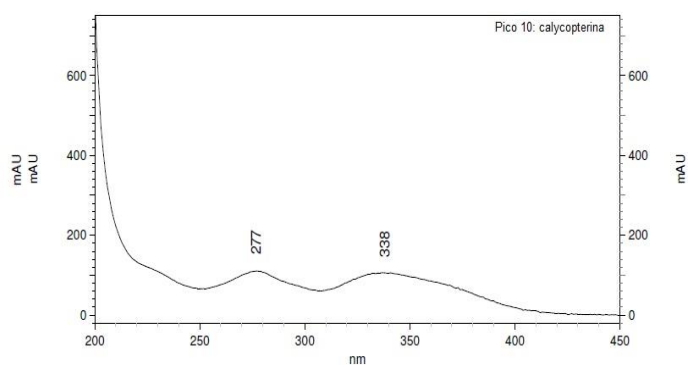
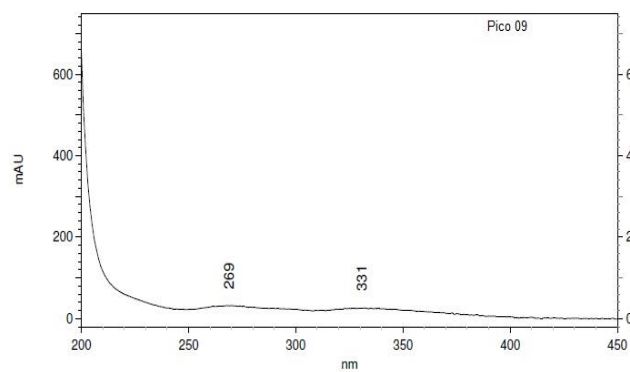
## APÊNDICE R: Espectros de UV da quercetina e isoflavonas de MLFR02



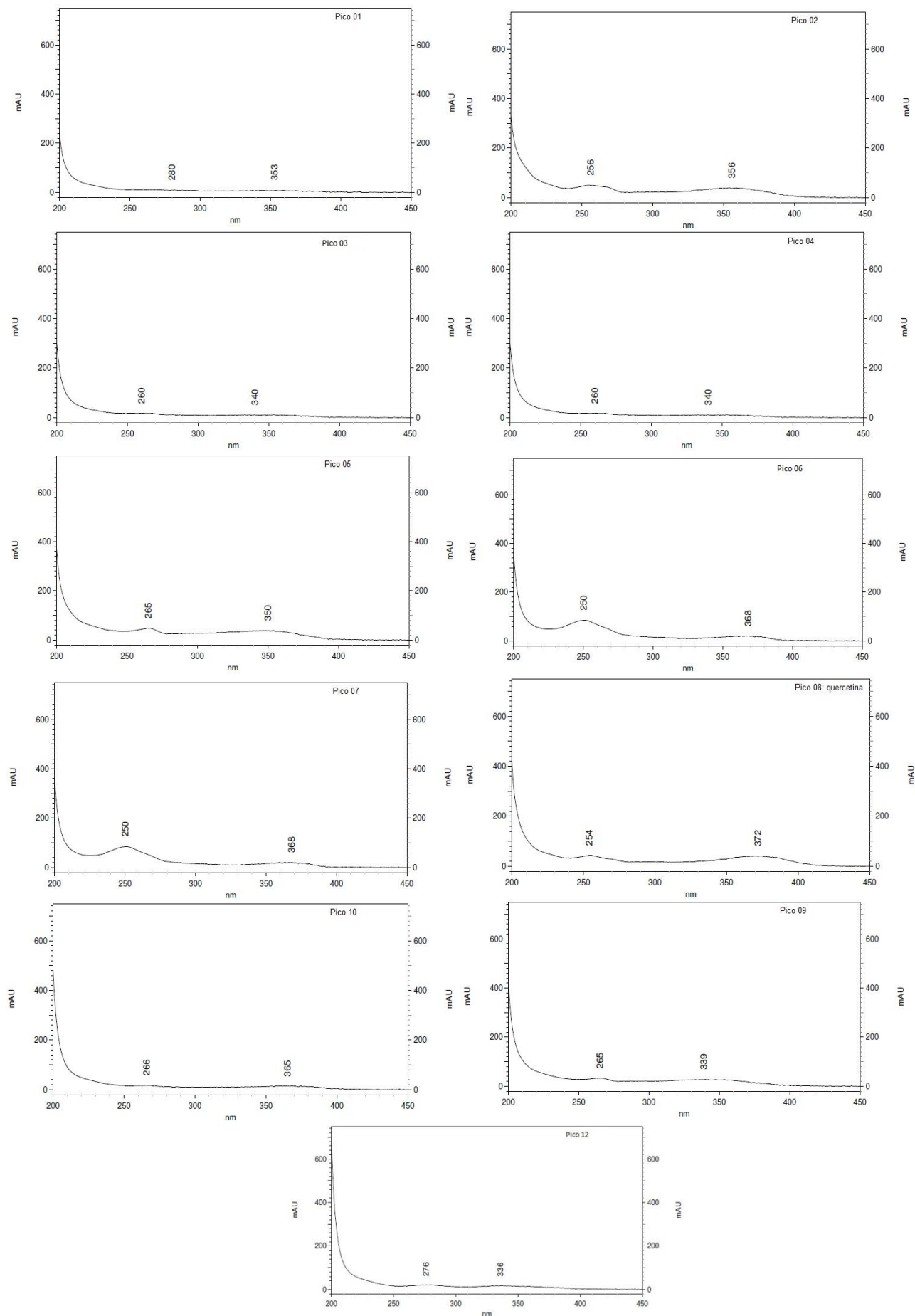
## ANEXO S: Espectros de UV de flavonoides hidroxilados de MLFR03



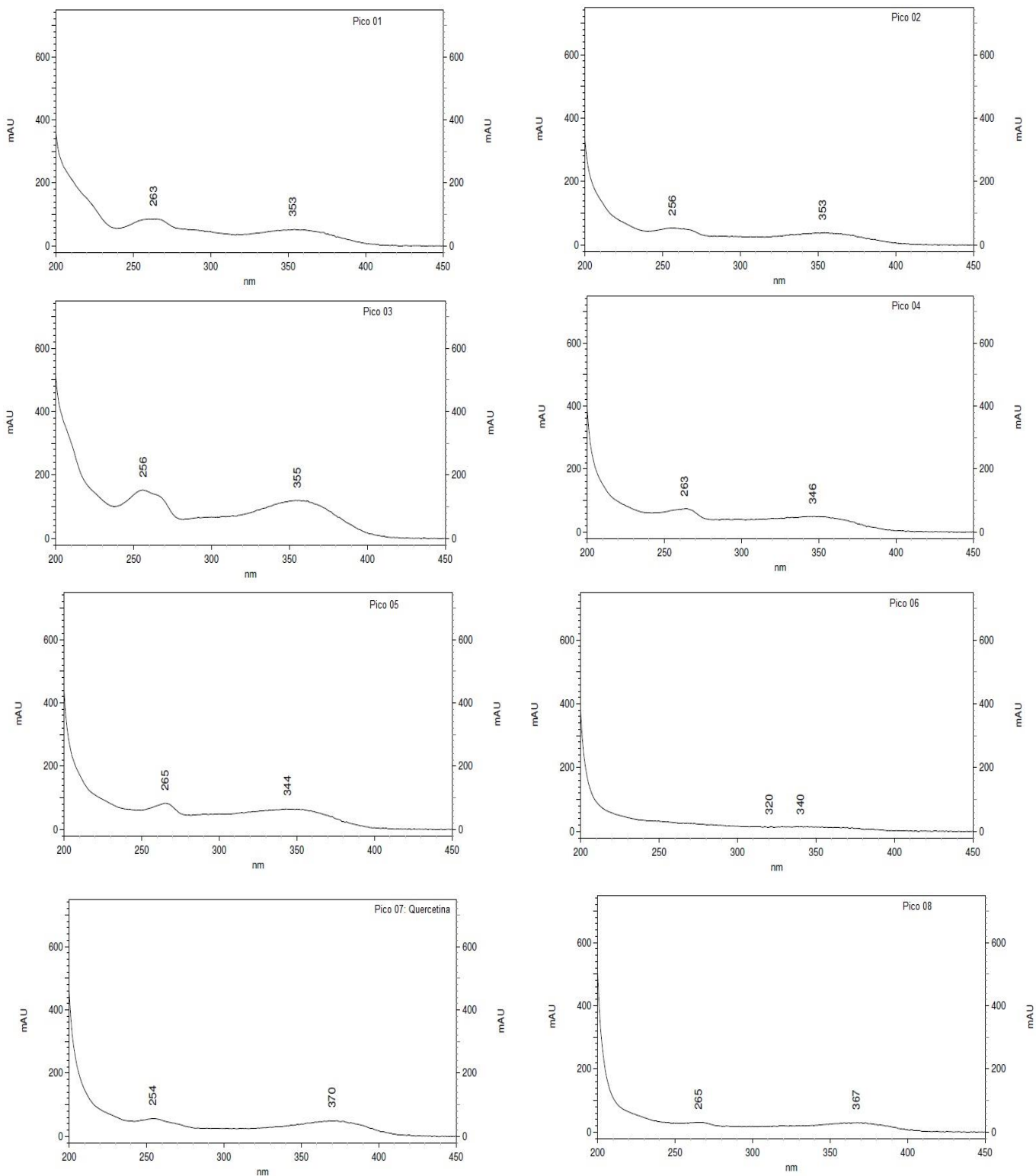
## APÊNDICE T: Espectros de UV da calicopterina e isoflavonas em MLFR03



## APÊNDICE U: Espectros de UV de MLFR04

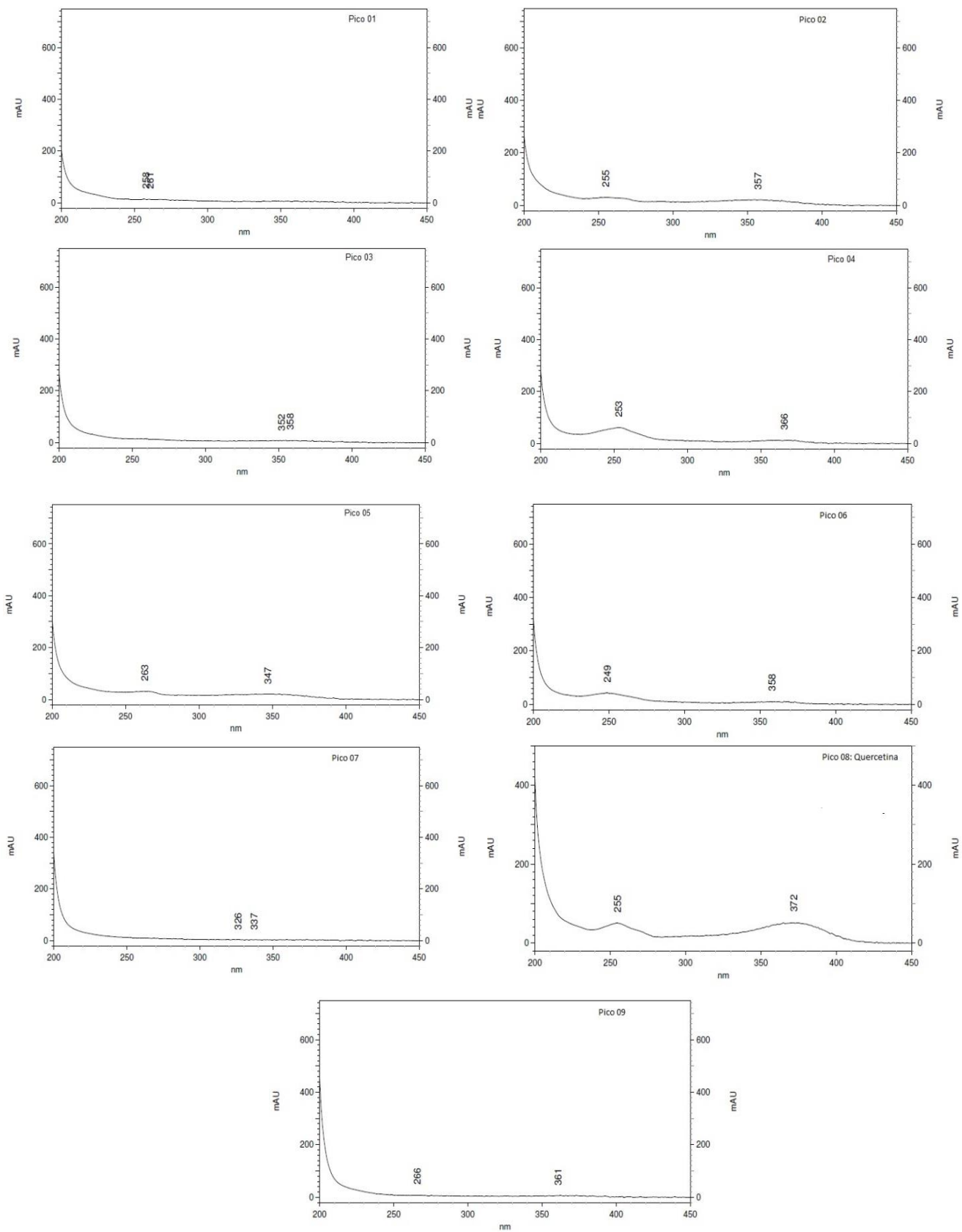


## APÊNDICE V: Espectros de UV de MLFR05





## APÊNDICE X: Espectros de UV de MLFR06



**ANEXO 01. Articulo publicado: “*In vitro* photoprotective effects off *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations”**