



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MARIA CRISTINA PINHEIRO PEREIRA REIS MANSUR**

Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante  
dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var.  
*massambabensis* Vaz numa formulação antissolar

Rio de Janeiro  
2011

**MARIA CRISTINA PINHEIRO PEREIRA REIS MANSUR**

Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Pereira dos Santos

Co-orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzana Guimarães Leitão

Rio de Janeiro  
2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

**M289e** Mansur, Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis.

Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar/ Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis Mansur; orientadora Elisabete Pereira dos Santos; co-orientadora Suzana Guimarães Leitão. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.

145f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Bauhinia. 2. Extratos vegetais. 3. Atividade antioxidante.  
4. Fotoproteção. 5. Formulação antissolar. I. Santos, Elisabete Pereira dos.  
II. Leitão, Suzana Guimarães. III. Título.

**CDD 615.42**

## MARIA CRISTINA PINHEIRO PEREIRA REIS MANSUR

Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29/08/2011.

### **Orientadora e Co-orientadora:**

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Elisabete Pereira dos Santos  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Suzana Guimarães Leitão  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

### **Banca Examinadora**

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Carla Holandino Quaresma  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Professor Dr. Leandro Machado Rocha  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Sheila Garcia  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

## DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho,**  
**Ao meu adorado Deus de Amor Incondicional,**  
**Aos meus amados pais Flávio *in memoriam* e Maria Rita,**  
**À minha estrela de Luz Daniella,**  
**Ao marido e grande amigo Marcelo,**  
**As queridas tia Tetê *in memoriam* e Dinda**  
**Porque a família é o pilar de tudo.**

## AGRADECIMENTOS

Aos verdadeiros tesouros,  
Meus queridos amigos presentes e ausentes,  
por tudo e por tanto.

### BONS AMIGOS

*Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir.*

*Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende.*

*Amigo a gente sente!*

*Benditos os que sofrem por amigos, os que falam com o olhar.*

*Porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende.*

*Amigo a gente entende!*

*Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar.*

*Porque amigo sofre e chora.*

*Amigo não tem hora pra consolar!*

*Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade.*

*Porque amigo é a direção.*

*Amigo é a base quando falta o chão!*

*Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.*

*Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.*

*Ter amigos é a melhor cumplicidade!*

*Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho,*

*Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!*

Anônimo

(de coração para os meus amigos)

## AGRADECIMENTOS

Ao Poder Superior, DEUS Clemente e Misericordioso, pela oportunidade do bem maior: A VIDA; pela possibilidade de tornar-me um ser humano melhor, lapidando meus conhecimentos, mostrando-me que com muito trabalho, disposição, tolerância e perseverança é possível alcançar os objetivos e realizar os sonhos.

Ao meu inesquecível pai, Flávio *in memoriam*, e mãe Maria Rita, pelo grande exemplo de honestidade, luta e boa vontade; por tanto amor, carinho e dedicação; pela educação. Sem vocês, chegar até aqui seria impossível. Muito obrigada!!!

À minha estrela de Luz; meu miosótis, minha filha Daniella, razão da minha amada vida, por tudo de bom que você representa. Por fazer-me crescer, por todos os dias de alegria, de dificuldades e de perseverança; por estar sempre ao meu lado, ajudando-me no computador, melhorando as imagens, dividindo conhecimentos sobre informática e inglês, além de afeto. Você é genial! O meu coração é seu!!! Muito obrigada por tudo!!!

Ao meu marido, Marcelo Costa Mansur, amigo e companheiro de todas as horas. Pelo suporte financeiro para que eu dedicasse meu tempo integralmente a este projeto, por sua perseverança, por “durar no esforço” e por me incentivar a ir em frente; por mostrar-me como ser grande com humildade. Muito obrigada pelo seu exemplo e por tudo!!!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Elisabete Pereira dos Santos: minha orientadora; meu exemplo a ser seguido pela Ética, retidão de caráter, boa-vontade, simplicidade e extraordinário conhecimento. Obrigada pela sua amizade, pelas tantas “broncas”, pelo seu tempo, pelo carinho, pela credibilidade e paciência que foram imprescindíveis para realização desta dissertação. Sempre estarás presente em meu coração, nos meus pensamentos e nas minhas palavras!!! Prof<sup>a</sup>. Elisabete, a você minha eterna gratidão!!!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Suzana Guimarães Leitão; pela co-orientação, pelos ensinamentos e oportunidades, pela credibilidade e conhecimento. Muito Obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior; por encorajar-me a seguir em frente, pelas horas de correção dos relatórios, discussão e elaboração de estratégias para que eu atingisse minha meta. Obrigada pela amizade!!!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nancy dos Santos Barbi pela amizade; por todas as correções, pela força ao longo do Mestrado e à minha querida amiga Gabriela, pela alegria, companheirismo, e pelas muitas horas no ensaio do DPPH. Também por todo nosso convívio ao longo das noites silenciosas nos corredores do CCS (*"Falling through the night"*). À Erica pelas dicas na utilização do rotaevaporador. Muito obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima pelo excepcional conhecimento, impressionante rapidez de raciocínio na hora "H", e por tanta paciência na hora dos ensinamentos sobre fluorescência; pela genialidade na validação do método ORAC e dicas na bancada. Aos colegas do Biotecfar: Guerreiro, Vivian, Maely, Raquel, Leo, Joana e Juliana. Obrigada por tudo!!!

Ao Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral pelo estímulo concedido para que eu me inscrevesse para a seleção do Mestrado, pela credibilidade, pela apresentação aos professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e uso dos equipamentos do LabTif. Aos meus amigos Arídio, Lidiane, Flávia Almada e Maísa, e a todos os colegas com quem tive a oportunidade de trocar tanto conhecimento. Muito obrigada pelo carinho e por fazerem com que eu me sentisse "em casa"!!!

Às Prof<sup>as</sup>. Naira, Rita, Marcia, Zaida, Gláucia e Fran pelos conselhos para que eu continuasse sem olhar para os obstáculos. Aos Amigos da Farmácia Universitária: Paulo, Carlinhos, Enoc, Juliana, Jocler, Michela, Cleo, Carol, Sr. Orcalino, Dr<sup>a</sup>. Adriana, Dr<sup>a</sup>. Iolanda, Zezé, Patrícia e Elizandra. Às amigas do LADEG: Aline, Mayre, Débora, Letícia, Mainara, Cristal e Flávia. Aos amigos Bryan Hudson e Gabriel pelas palavras de incentivo e força. Muito obrigada!!!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisela Maria Dellamora Ortiz; ao Prof. Samir; a querida Tathiana e todo pessoal do LabEnzInd. Muito obrigada pela disponibilidade e pela confiança!!!



Ao Prof. Dr. Alexandre Torres do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, no Instituto de Química (CT), por compartilhar conhecimento com uma aluna iniciante e pela disponibilidade dos reagentes para a realização de alguns testes. Obrigada!!!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilda Guimarães Leitão; pela confiança e disponibilidade na utilização de diversos equipamentos. Muito obrigada!!!

Aos funcionários do NPPN, Sr. Natal pela moagem dos galhos e folhas, e ao amigo Celso pelas incessantes horas no liofilizador. Muito obrigada!!!

Ao Prof. Danilo e aos colegas da Farmacognosia, André, Shaft, Mariana, Lisieux, João Paulo e Alex, pelo apoio na bancada. Obrigada!!!

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida; um grande incentivo para quem está iniciando no gratificante porém árduo horizonte da pesquisa no Brasil e fora dele.

Aos meus alunos de estágio e iniciação científica, Gil e Rayan, pela confiança e incentivo. Muito obrigada!!!

À bibliotecária Flor, que foi extremamente solícita na elaboração da ficha catalográfica. Obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Ricardo Vieira pela ajuda na coleta; ao amigo Jorginaldo do Herbário pela boa vontade; ao Prof. Dr. Rodrigo Leo pelo trabalho de campo e por todas as horas de incentivo, paciência e extrema espiritualidade. Muito obrigada!!!

Às Professoras Dr<sup>as</sup>. Mirian Ribeiro e Lúcia Jaeger pela imensa alegria, simpatia, força e pela parceria nos ensaios da atividade antioxidante pelo método ABTS. À minha amiga Daniela, Ediane e a todos do LabCBrom: Ângelo, Cláudia, Rafaela, Ana Carolina, Lara, Larissa. Muito obrigada!!!

À comadre Krika, porque aos cinquenta anos vamos rir disto tudo.....Obrigada!!!

Aos funcionários da nobre secretaria de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente ao amigo Thiago, por ouvir-me nas horas mais difíceis, e por sempre procurar ajudar-me em toda a parte burocrática. Desejo que realize suas mais justas aspirações e continues sempre com sua boa vontade em atender a todos. Muito obrigada!!!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Reis Giada, do Instituto de Nutrição, pela colaboração, por compartilhar todo seu conhecimento científico com humildade e tanta generosidade, pela paciência e por todas as correções dos cálculos da atividade antioxidante. Guardar-te-ei em meu coração. Muito obrigada pela sua atenção!!!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Rosaura Presgrave, ao Dr. Octávio Presgrave, Eloísa, Ronald e todo pessoal do setor de Farmacologia/Toxicologia do INCQS-FIOCRUZ pela excelência na transmissão do conhecimento e incansável dedicação para realização dos testes de segurança das formulações. Muito obrigada!!!

À amiga Roberta Alves Montes pelo meu primeiro caderno de protocolos, por sua atenção e carinho, por não me deixar desistir nunca e por acreditar na minha vitória. Obrigada por ajudar-me tanto a evoluir intelectualmente e por crer em mim!!!

Às amigas Cássia, Ismenia, Giovania e Fátima pela atenção, carinho e pela torcida constante. Quem tem amigos possui um verdadeiro tesouro. Obrigada por fazerem-me sentir afortunada!!!

Às amadas tias e amigas, Tetê, Dala, Bigo, Ruth, Isa, Gilda e ao meu dindo Luis *in memoriam* por todo carinho, apoio e amizade ao longo de toda minha vida. Muito obrigada!!!

Às amigas Gilce e Marlene que cuidaram de mim, da minha família e da minha casa. Sempre estarão em meu coração. Obrigada por tudo!!!

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste projeto. Muito Obrigada!!!

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu: há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou; tempo de matar e tempo de curar; tempo de derribar e tempo de edificar; tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar; tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de deitar fora; tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar; tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz.”

(ECLESIASTES 3: 1-8)

## RESUMO

MANSUR, Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis. Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O uso terapêutico de plantas do gênero *Bauhinia* pelas populações de diferentes partes do mundo tem sido confirmado em estudos científicos recentes – algumas atividades farmacológicas tem sido demonstradas, tais como: hipoglicemiante, antiviral, fungicida, anti-inflamatória e anticancerígena entre outras. *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz é uma planta com registros de coleta apenas para o Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foram investigados quatro extratos de suas folhas para avaliação da capacidade antioxidante por três diferentes métodos *in vitro*: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), ABTS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e ORAC (Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio) frente ao extrato de *Ginkgo biloba*<sup>®</sup> (EGb 761) e ao Trolox<sup>®</sup> (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) uma substância de referência análoga hidrossolúvel da vitamina E, utilizados como padrões. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e fotoprotetora dos extratos feitos a partir das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* e estudar a associação destes extratos aos filtros sintéticos: octilmetoxicinamato, octocrileno e benzofenona-3 numa formulação antissolar. Os extratos selecionados demonstraram capacidade antioxidante eficiente frente aos padrões nos três ensaios. Nos ensaios com DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, em ordem decrescente de atividade: AcEt > WAc > EtOH bruto > EtOH CA > EGb. No ensaio ORAC: EtOH CA > EtOH bruto > AcEt > WAc > EGb. Foram selecionados dois extratos, EtOH CA e WAc para serem testados nas formulações antissolares. A análise fototóxica foi realizada em culturas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* pelo método MIC. As formulações EtOH CA e WAc a 1 % e seus respectivos extratos não apresentaram fototoxicidade. Técnicas disponíveis de avaliação de FPS *in vitro* e *in vivo* e FP-UVA foram utilizadas para mensurar a eficácia; a avaliação da segurança foi realizada por meio do potencial irritante *in vitro* e *in vivo* das formulações e para o uso destes extratos em produtos cosméticos e dermatológicos. As formulações e os extratos foram considerados seguros pelos ensaios realizados. A incorporação dos extratos nas formulações demonstraram habilidade na captação dos radicais livres na pele através do aumento do FPS *in vivo*, já que não houve aumento do FPS pela absorção no UV *in vitro*.

Palavras-chave: *Bauhinia*, extratos vegetais, atividade antioxidante, fotoproteção, formulação antissolar.

## ABSTRACT

MANSUR, Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis. Preliminary study of photoprotect and antioxidant activities of extracts from leaves of *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz in a sunscreen formulation. Rio de Janeiro, 2011. Dissertation (Master's in Pharmaceutical Sciences) – Department of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The therapeutic use of plants of the *Bauhinia* genus by populations from different parts of the world has been confirmed by recent scientific studies - several pharmacological activities have been demonstrated such as hypoglycaemic, antiviral, fungicide, anti-inflammatory and anti-cancer, among others. *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz is a plant found in the Rio de Janeiro State, Brazil. Four different extracts of its leaves were investigated to evaluate their antioxidant capacity by three different *in vitro* methods DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), using *Ginkgo biloba* (EGb 761<sup>®</sup>) and Trolox<sup>®</sup> (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) a reference substance analogous water-soluble of vitamin E, as standards. The aim of this work was to evaluate the photoprotect and antioxidant activities of extracts from leaves of *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* and study the association of these extracts with sintetic filters: octilmethoxycinnamate, octocrylene and benzophenone-3 in a sunscreen formulation. The selected extracts showed an efficient antioxidant capacity vis-à-vis the standards products in the three run-tests. In the DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> run-tests, in decreasing order of activity: AcEt > WAc > raw EtOH > EtOH CA > EGb. In the ORAC run-test: EtOH CA > raw EtOH > AcEt > WAc > EGb. Two were selected extracts, EtOH AC and WAC to be tested in sunscreen formulations. The phototoxic analysis was made in yeast cultures of *Saccharomyces cerevisiae* by MIC method. The formulations EtOH CA and WAc a 1 % and their extracts showed no phototoxicity. Available SPF (*in vitro* and *in vivo*) and UVA-PF evaluation techniques were used to measure the efficacy of the formulations. For the evaluation of safety, the formulation irritation potential *in vitro* and *in vivo* were considered to guarantee the use of these extracts in dermatological and cosmetics products. The formulations and extracts were deemed safe by the tests. The incorporation in the formulations of the extracts demonstrated ability to scavenge free radicals in the skin by increasing the SPF *in vivo*, since there was no increase in SPF by UV absorption *in vitro*.

Keywords: *Bauhinia*, plant extracts, antioxidant activity, photoprotection, sunscreen formulation.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotos das telas: <i>La Maja desnuda</i> (a); <i>La Maja vestida</i> (b)	25
Figura 2. Representação esquemática da radiação solar nas camadas da pele	27
Figura 3. Classificação dos tipos de pele (I a VI)	30
Figura 4. Pele sem fotoproteção: eritema (a); envelhecimento cutâneo (b)	33
Figura 5. Esquema ilustrativo dos três filtros, nomes comerciais, espectro de ação e concentração máxima permitida na formulação	35
Figura 6. Fórmulas estruturais dos filtros sintéticos orgânicos: OMC (a); OCT (b); BZF-3 (c)	36
Figura 7. Esquema ilustrativo do ataque dos radicais livres à célula	40
Figura 8. “Árvore da vida”: <i>Gingko biloba</i> Linné (a); folha (b); cápsulas (c)	45
Figura 9. Vista panorâmica de <i>Bauhinia microstachya</i> var. <i>massambabensis</i> em Área de Proteção Ambiental no Estado do Rio de Janeiro	46
Figura 10. Estrutura Básica de Flavonóides (a) e da quercetina (b)	48
Figura 11. Esquema do teste com o radical livre DPPH <sup>•</sup>	50
Figura 12. Esquema do teste com o radical ABTS <sup>•+</sup>	52
Figura 13. Fórmula estrutural do Trolox <sup>®</sup>	52
Figura 14. Esquema da oxidação da FL pelo ROO <sup>•</sup> no ensaio ORAC	53
Figura 15. Aspecto da folha de <i>B. microstachya</i> var. <i>massambabensis</i> (a); <i>Excicata</i> da planta (b)	59
Figura 16. Fluxograma da obtenção dos extratos das folhas de <i>B. microstachya</i> var. <i>massambabensis</i>	61
Figura 17. Esquema representativo do teste de fototoxicidade em culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
Figura 18. Ensaio de irritabilidade ocular <i>in vitro</i> HET-CAM	72

Figura 19.	Ensaio de irritabilidade ocular <i>in vitro</i> CAM-TBS	74
Figura 20.	Testes de hemólise e desnaturação <i>in vitro</i> (RBC)	77
Figura 21.	Ensaio de irritação cutânea primária <i>in vivo</i> (DRAIZE)	79
Figura 22.	Esquema da área demarcada nas costas dos voluntários para os ensaios de FPS <i>in vivo</i>	86
Figura 23.	Ensaio de fotoestabilidade em simulador solar. Placas sem irradiação (a); placas sob irradiação (b)	88
Figura 24.	Flavonóides isolados na planta <i>B. microstachya</i> var. <i>massambabensis</i> : Kaempferol-3-O-rhamnosídeo (a); 2",6"-di-O-galoil-astragalina (b)	94
Figura 25.	<i>Screening</i> da % AAT pelo DPPH' dos extratos selecionados	95
Figura 26.	<i>Screening</i> da % AAT pelo DPPH' dos extratos excluídos	95
Figura 27.	Curva analítica do Trolox <sup>®</sup> no ensaio ABTS <sup>++</sup>	97
Figura 28.	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato AcEt frente ao Trolox <sup>®</sup> e ao EGb 761 no ensaio ABTS <sup>++</sup>	98
Figura 29.	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato WAc frente ao Trolox <sup>®</sup> e ao EGb 761 no ensaio ABTS <sup>++</sup>	99
Figura 30.	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato EtOH bruto frente ao Trolox <sup>®</sup> e ao EGb 761 no ensaio ABTS <sup>++</sup>	100
Figura 31.	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato EtOH CA frente ao Trolox <sup>®</sup> e ao EGb 761 no ensaio ABTS <sup>++</sup>	101
Figura 32.	Espectro da FL no ensaio ORAC	102
Figura 33.	Efeito da concentração de Trolox <sup>®</sup> na curva de decaimento da fluorescência relativa da FL no ensaio ORAC	103

Figura 34.	Efeito da concentração do extrato EtOH CA frente ao Trolox <sup>®</sup> e ao EGb na curva de decaimento da fluorescência relativa da FL no ensaio ORAC	103
Figura 35.	Efeito da concentração do extrato WAc frente ao Trolox <sup>®</sup> e ao EGb na curva de decaimento da fluorescência relativa da FL no ensaio ORAC	104
Figura 36.	Aspecto visual das formulações LADEG LC FPS 15 WAc a 1 %; LADEG LC FPS 15 EtOH CA a 1 % e LADEG LC FPS 15;	106
Figura 37.	Aspecto visual das formulações LADEG LC FPS 15 WAc a 2; 1 e 0,5 %	107
Figura 38.	Placas do teste de fototoxicidade em culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antes da irradiação (a) e após a irradiação (b)	108
Figura 39.	Espectros médios de absorbância no UV para as placas com a formulação LADEG LC FPS 15 aplicada, antes da irradiação (a) e após a irradiação (b)	115
Figura 40.	Espectros médios de absorbância no UV para as placas com a formulação LADEG FPS 15 EtOH CA a 1 % aplicada, antes da irradiação (a) e após a irradiação (b)	116
Figura 41.	Espectros médios de absorbância no UV para as placas com a formulação LADEG FPS 15 WAc a 1 % aplicada, antes da irradiação (a) e após a irradiação (b)	116
		117



## LISTA DE EQUAÇÕES

	Pág.
Equação 1. Cálculo da $CE_{50}$ no ensaio de captação do DPPH <sup>*</sup>	62
Equação 2. Cálculo da massa do extrato correspondente a 1000 $\mu$ M de Trolox <sup>®</sup> no ensaio com o ABTS <sup>++</sup>	63
Equação 3. Cálculo final da AAT equivalente a $\mu$ M de Trolox <sup>®</sup> per g de extrato	64
Equação 4. Cálculo final do valor ORAC relativo em equivalentes ao Trolox <sup>®</sup> per g de extrato	65
Equação 5. Cálculo do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> por espectrofotometria por absorvância no UV pelo método de Mansur	67
Equação 6. Cálculo da concentração de TBS absorvida	75
Equação 7. Cálculo do potencial de desnaturação de hemoglobinas	78
Equação 8. Cálculo do edema na pele dos animais testados	80
Equação 9. Cálculo do FPS <i>in vitro</i> por espectrofotometria por transmitância com esfera de integração	83
Equação 10. Cálculo do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	83
Equação 11. Cálculo do FP-UVA <i>in vitro</i> obtido por espectrofotometria por transmitância com esfera de integração	83
Equação 12. Cálculo da quantidade de energia na faixa UVA	84
Equação 13. Cálculo do FP-UVA <i>in vitro</i> após exposição à RUV	84
Equação 14. Cálculo do Comprimento de Onda Crítico ( $\lambda$ )	85

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Classificação dos tipos de pele humana quanto à resposta relativa da exposição solar aguda e a longo-prazo	30
Tabela 2. Composição das formulações antissolares desenvolvidas no LADEG	66
Tabela 3. Relação entre intensidade da radiação e o efeito eritematogênico em cada comprimento de onda	68
Tabela 4. Graduação dos fenômenos irritantes determinados por tempo	71
Tabela 5. Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas	73
Tabela 6. Diferentes concentrações para a análise de hemólise e desnaturação	76
Tabela 7. Correlação do ID com o possível efeito de irritação ocular <i>in vivo</i>	78
Tabela 8. Graduação do edema na pele dos animais testados	80
Tabela 9. Graduação do eritema na pele dos animais testados	81
Tabela 10. Classificação do índice de irritação cutânea primária (ICP) dos animais testados	81
Tabela 11. Descrição dos componentes da formulação padrão utilizadas nos ensaios de FPS <i>in vivo</i>	87
Tabela 12. Tipos de extratos das folhas de <i>B. microstachya</i> var. <i>massambabensis</i> seus rendimentos e cores	89
Tabela 13. CE <sub>50</sub> de todos os extratos testados no ensaio de captação dos radicais livres DPPH*	92
Tabela 14. Extratos testados no ensaio ABTS <sup>•+</sup> e dados estatísticos	96
Tabela 15. Resultados da capacidade antioxidante dos extratos das folhas de <i>B. microstachya</i> var. <i>massambabensis</i> , através de três diferentes métodos <i>in vitro</i>	105
Tabela 16. Resultados dos FPS das formulações LADEG LC FPS 15, LADEG LC FPS 15 + extratos e LC + extratos	107

Tabela 17.	Graduação dos fenômenos irritantes por meio do ensaio HET-CAM e a classificação final do grau de irritação das formulações e respectivos extratos	109
Tabela 18.	Graduação dos fenômenos irritantes por meio do ensaio CAM-TBS e a classificação final do grau de irritação das formulações e dos respectivos extratos	111
Tabela 19.	Graduação dos fenômenos irritantes ( $IC_{50}$ ) e a correlação do índice de desnaturação (ID) com o possível efeito de irritação ocular <i>in vivo</i> (RBC) das formulações e respectivos extratos	112
Tabela 20.	Graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas nos ensaios de irritação cutânea <i>in vivo</i> (DRAIZE)	113
Tabela 21.	Determinação do FPS das formulações pelo método Mansur antes e após irradiação em simulador solar	114
Tabela 22.	Valores irradiação UVA ( $J/cm^2$ ) aplicados nas placas de cada formulação e os valores de comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) após a irradiação	117
Tabela 23.	Valores de FP-UVA <i>in vitro</i> obtidos antes e após a irradiação	118
Tabela 24.	Valores de FPS <i>in vivo</i> das formulações desenvolvidas: LADEG LC FPS 15, LADEG FPS 15 EtOH CA a 1 % e LADEG FPS 15 WAc a 1%	119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1-But	1-butanol
AAPH	2,2'-azo-bis (2-metilpropionamida) diidroclorídrico
ABTS <sup>+</sup>	2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)
DPPH <sup>*</sup>	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
AcEt	Acetato de etila
ABTS	Ácido 2,2'- azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico)
Trolox <sup>®</sup>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
BZF-3	Benzofenona-3 (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona)
r	Coefficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
IC-NIRP	Comissão Internacional de Proteção às Radiações Não-Ionizantes
COLIPA	Comitee de la Liason des Associations Europeans de l'Industries de la Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette (Comitê das Associações Europeias das Industrias de Perfumaria, Cosméticos e produtos de Toucador)
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda$ (c)	Comprimento de onda crítico
$\lambda$ máx	Comprimento de onda de absorbância máxima
CE <sub>50</sub>	concentração necessária para se obter 50 % do efeito máximo estimado
DP	Desvio padrão
DCM	Diclorometano
DEM	Dose eritematogena mínima
EE	Efeito eritematogênico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EC	Estrato córneo
EtOH	Etanol
EtOH bruto	Extrato etanólico bruto

EtOH CA	Extrato etanólico clarificado
WAc	Extrato hidroacetônico
FPS	Fator de Proteção Solar
FP-UVA	Fator de Proteção UVA
FS	Filtro Solar
FL	Fluoresceína (3,6 – diidroxiespiro (isobenzofurano-1-3H-9-9H-xanteno-3-ona))
FDA	Food and Drug Administration (Agência regulatória de medicamentos e alimentos)
g	Gramma
°C	Grau Celsius
He	Hexano
IUV	Índice ultravioleta
IV	Infravermelho
I	Intensidade da Radiação
MCA	Membrana Corion-alantóide
µg	micrograma
µg mL <sup>-1</sup>	micrograma/mililitro
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
µS	microsiemens
mg	miligrama
mg/cm <sup>2</sup>	miligrama/centrômetro quadrado
mm	milímetro
mmol	milimol
mM	milimolar
nM	nanomolar
α	Nível de significância
OMC	Octilmetoxicinamato (4- metoxicinamato de 2- etilexila)
OCT	Octocrileno (2-ciano-3,3-difenil-acrilato de 2-etilexila)
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico

ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio)
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
%	Percentual
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
PMMA	Poli (metilmetacrilato)
pH	Potencial hidrogeniônico
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIV	Radiação infravermelha
RUV	Radiação ultravioleta
$\text{RO}^\bullet$	Radical alcoxila
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxila
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia
TF	Tampão fosfato
DRAIZE	Teste de irritabilidade cutânea <i>in vivo</i> utilizando coelhos
RBC	Teste de irritabilidade ocular <i>in vitro</i> em células sanguíneas vermelhas
CAM-TBS	Teste em Membrana Corion-alantóide de Ovos Embrionados de Galinha com o Corante Azul de Tripán
HET-CAM	Teste em Membrana Corion-alantóide de Ovos Embrionados de Galinha
TBS	Tripan blue solution (Solução de Azul de Tripán)
TEAC	Trolox <sup>®</sup> Equivalent Antioxidant Capacity (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox <sup>®</sup> )
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VIS	Visível
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

**SUMÁRIO**

1.	Introdução.....	24
2.	Revisão Bibliográfica.....	27
2.1	Pele e radiação solar.....	27
2.2	Fotoproteção e filtros solares.....	32
2.3	Antioxidantes naturais em formulações antissolares.....	37
2.4	Radicais livres, oxidação, estresse oxidativo e antioxidantes.....	39
2.5	Plantas com atividade antioxidante.....	43
2.6	Métodos <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antioxidante.....	49
3.	Eficácia e Segurança das formulações antissolares.....	54
4.	Objetivos.....	57
4.1	Objetivo Geral.....	57
4.2	Objetivos Específicos.....	57
5.	Material e Métodos.....	58
5.1	Coleta do material botânico.....	58
5.2	Obtenção dos extratos.....	58
5.3	Avaliação da atividade antioxidante.....	60
5.4	Desenvolvimento das formulações antissolares.....	64
5.5	Análise fototóxica <i>in vitro</i> em culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67
5.6	Segurança das Formulações Antissolares – Avaliação do Potencial Irritante.....	69
5.7	Eficácia das Formulações Antissolares.....	81
5.8	Ensaio de fotoestabilidade em simulador solar.....	86
6.	Análise estatística.....	88
7.	Resultados e discussão.....	88
7.1	Obtenção dos extratos.....	88
7.2	Atividade antioxidante.....	89
7.3	Desenvolvimento das formulações antissolares.....	106
7.3	Determinação do FPS <i>in vitro</i> pelo método de Mansur.....	106
7.4	Análise fototóxica <i>in vitro</i> em culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	108
7.5	Segurança das formulações desenvolvidas e respectivos extratos.....	109
7.6	Eficácia das Formulações Antissolares.....	114
8.	Conclusão.....	121
9.	Perspectivas.....	122
10.	Referências Bibliográficas.....	123

## 1. Introdução

A Humanidade deseja a longevidade sem as alterações que o envelhecimento acarreta no corpo físico e psíquico do indivíduo. A radiação solar excessiva dentre diversos outros fatores pode ser agravante no processo de envelhecimento cutâneo. Todavia, os dermocosméticos têm desempenhado papel fundamental em atenuar, prevenir e combater estas mudanças fisiológicas observadas na pele. O desenvolvimento de formulações multifuncionais empregando substâncias que possuam diferentes mecanismos de ação, e proporcionem um resultado satisfatório na prevenção ao envelhecimento, combate aos danos e embelezamento da pele constitui-se no alvo principal da Cosmetologia (PEYREFITTE *et al.*, 1995; SCOTTI & VELASCO, 2003).

O hábito de expor todo o corpo ao sol para se bronzear é recente. No passado, a aristocracia era representada nas obras de arte pela brancura da pele, por ser o padrão de beleza dominante na Europa. Naquela época, as jovens pertencentes às classes sociais mais abastadas não expunham seu corpo ao sol. O vestuário utilizado por elas deve ser considerado como uma proteção aos efeitos negativos dos raios solares, afinal o corpo ficava praticamente todo coberto pelas roupas com mangas compridas, vestidos longos, meias e chapéus. As telas, de Francisco Goya (1746-1828) pintor espanhol, retratam esta tendência. Essas telas, provavelmente da mesma jovem, encontram-se no Museu do Prado, Madrid, Espanha, e datam aproximadamente dos anos de 1797 a 1800 (Figura 1). O hábito de banhos diários de sol surgiu a partir do século XIX, quando a elite passava as férias no litoral, bem como a recomendação médica para os anêmicos (KHURY & NAKANO, 2007).

Na atualidade, o bronzeado da pele é sinal de beleza e saúde para a maioria dos jovens brasileiros. Porém, uma parte da população desconhece ou ignora os danos de uma exposição solar inadequada à pele e ao organismo humano. Na verdade, o bronzeamento é uma resposta natural da pele, através da síntese da melanina, aos efeitos deletérios cumulativos da radiação ultravioleta (RUV). Dentre as diversas funções desempenhadas pela melanina em nossa pele estão a fotoproteção, a termoregulação, ação antibiótica, queladora de cátions, a condição de radical livre e de produto do sequestro do radical superóxido pela tirosinase (NORDLUND *et al.*, 2006).





Figura 1: Óleo sobre tela, *La Maja Desnuda* (a) e *La Maja Vestida* (b) de Francisco Goya, Museu do Prado, Madrid, Espanha. Disponível em <[http://en.wikipedia.org/wiki/Francisco\\_Goya](http://en.wikipedia.org/wiki/Francisco_Goya)>.

Estudos recentes apontam as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas na pele, devido a exposição excessiva à radiação ultravioleta solar, como as “vilãs” de alguns efeitos cutâneos (JAIN & JAIN, 2010; DAMIANI *et al.*, 2006). A resposta aguda resume-se a inflamação (vermelhidão, sensibilidade ao toque, edema) e bronzeamento. A exposição crônica conduz ao fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (GEORGETTI *et al.*, 2006).

Existem substâncias sintéticas, como a benzofenona-2 (BZF-2), utilizadas como filtros solares que foram retiradas do mercado por serem comprovadamente tóxicas e exercerem perigo real à saúde de seus usuários. Portanto, a busca por novas substâncias que sejam eficazes e seguras é imprescindível para a qualidade e credibilidade destes produtos (BRASIL-ANVISA, 2002).

Há uma tendência mundial pela incorporação de produtos naturais em formulações dermocosméticas, o que agrega valor ao produto especialmente pelo

apelo comercial a maior aceitação por parte dos consumidores (RIVELLI *et al.*, 2008).

Extratos vegetais com propriedades antioxidantes tem despertado grande interesse na área de fitocosméticos. Visto que, extratos vegetais fornecem um complexo de substâncias funcionais à pele que podem neutralizar a ação dos radicais livres restabelecendo a homeostasia da pele e conferindo vantagens eudérmicas, o que somente um derivado natural é capaz de proporcionar ao indivíduo (PROSERPIO, 1976). Os fitocosméticos para chegarem ao mercado necessitam da aprovação nos testes de segurança e eficácia (BRASIL-ANVISA, 2004).

O uso medicinal das plantas pertencentes à família Leguminosae pela população de diferentes partes do mundo tem encontrado respaldo em estudos científicos recentes. Essas plantas são comumente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas alterações na saúde do indivíduo (LIM *et al.*, 2009).

*Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz é uma planta de ocorrência em restingas, com registros de coletas apenas para o estado do Rio de Janeiro (VAZ, 1993). Várias atividades foram comprovadas em extratos desta espécie, inclusive forte atividade antioxidante (LEO, 2005).

Para comprovar a atividade antioxidante dos extratos vegetais existem diversos testes *in vitro*, tais como: a varredura de radicais livres DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e do monocatión ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) que investigam radicais orgânicos; e o método ORAC (capacidade de absorvência do radical oxigênio) que investiga o ataque dos radicais ROO<sup>•</sup> (peroxila) a sonda fluoresceína (FL) (3,6 – diidroxiespiro (isobenzofurano-1-3H-9-9H-xanteno-3-ona) (GIADA, 2006).

O desenvolvimento de filtros solares mais seguros e eficientes com altos fatores de proteção utilizando quantidades menores de filtros é um dos alvos de interesse para pesquisadores em fotoproteção.

Visando garantir a segurança dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* e destes incorporados em formulação antissolar para o uso cosmético e dermatológico foram feitos diversos testes de segurança: fototoxicidade *ex vivo*, irritabilidade ocular *in vitro* e *in vivo*. A eficácia foi avaliada através dos testes do FPS *in vitro* e *in vivo* a seco.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Pele e radiação solar

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano constantemente exposta à radiação solar, quer seja por padrões estéticos, profissionais, ou meramente através da exposição das pessoas no deslocamento diário entre a moradia e o local de trabalho (GUARATINI *et al.*, 2009).

A pele é constituída por três camadas de tecido: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 2). A epiderme é constituída por um conjunto de células vivas chamada de epiderme viável e por um grupo de células mortas formadoras do estrato córneo (EC). A epiderme viável é constituída de outras três camadas distintas: granulosa, espinhosa e basal. A camada basal tem por função garantir a renovação da epiderme. A camada espinhosa é formada por células volumosas em fase de crescimento, e onde ocorre a síntese de queratina. A camada granulosa é constituída por células em seu último estágio de diferenciação, passando a formar o EC. A principal função desempenhada pelo EC é garantir a homeostase cutânea, funcionando como uma barreira protetora do organismo (BELO, 2008). A derme é uma camada vascularizada de tecido conjuntivo denso por onde circula o sangue. Esta camada é composta por fibroblastos, glicosaminoglicanas e macromoléculas tais como o colágeno (rede de fibras), e a elastina (componente essencial das fibras) que formam os tecidos elásticos (HOLBROOK *et al.*, 1993).

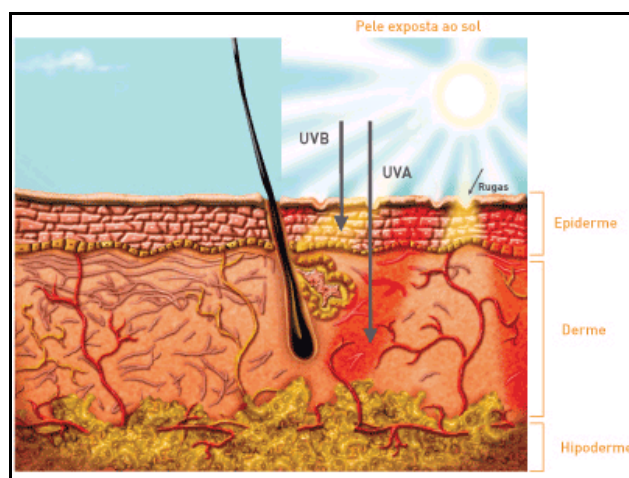


Figura 2: Representação esquemática da radiação solar nas camadas da pele. Disponível em: <<http://laurielyandrade.blogspot.com/>>.

A radiação solar, especialmente a UV, é reconhecida como a principal fonte exógena responsável pelo aumento da incidência de câncer de pele em grande parte do mundo (FUCHS, 1998), inclusive no Brasil. Para complementar nossas defesas endógenas, a busca de substâncias com potencial ação fotoprotetora é uma importante ferramenta de prevenção a este tipo de câncer. Os raios UV são responsáveis por alguns efeitos benéficos como: a síntese de vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol) que é responsável pela fixação de cálcio nos ossos, ação fungicida e bactericida, além da sensação de bem-estar. Entre os efeitos nocivos aos indivíduos, a curto e médio prazos, encontram-se: a perda de água e o ressecamento da pele, provocando aspecto opaco, perda da elasticidade, eritema (vermelhidão), edema, descamação e manchas. Podem ocorrer ainda queimaduras solares de diferentes graus. A exposição solar crônica da pele à radiação UV leva à uma variedade de efeitos adversos, incluindo o fotoenvelhecimento (enrugamento, elastose e irregularidade da pigmentação), a fotocarcinogênese (carcinoma de células basais e escamosas e melanoma maligno) e a diminuição da imunidade do indivíduo (RAMOS *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A luz solar consiste de um espectro eletromagnético de vários comprimentos de onda, entre 290 e 3000 nanômetros (nm), que se estende dos raios gama até as ondas de rádio, compreendendo os raios X, ultravioleta, visível e infravermelho. Entre estas radiações emitidas pelo sol, há radiações não ionizantes, que podem ser destacadas: a radiação ultravioleta (RUV) num comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre 100 a 400 nm, a luz visível (VIS) entre 400 a 750 nm, e a radiação infravermelha (RIV) num ( $\lambda$ ) de 750 a 2000 nm. A radiação na porção VIS corresponde à aproximadamente 43 % das radiações eletromagnéticas provenientes do sol, que alcançam a superfície terrestre. Na porção IV, essa energia chega a 49 %, já a porção UV compreende apenas cerca de 5 % dessa energia. Das radiações citadas, as que exercem efeitos significativos sobre a pele são a radiação IV e a UV (NEVES, 2008). Vários fatores podem alterar a intensidade e a composição da radiação recebida do sol: as estações do ano, a latitude, a altitude, as condições atmosféricas locais, entre outras (LAMBERT, 1982).

Os raios UV subdividem-se em: ultravioleta A (UVA) entre 320 e 400 nm, responsáveis pelo envelhecimento prematuro da pele; ultravioleta B (UVB) entre 290 e 320 nm, responsáveis pelas queimaduras solares (radiação eritematógena) e ultravioleta C (UVC) entre 100 e 290 nm, sendo que os UVC são retidos pela

camada de ozônio. Devido à destruição desta camada, que fornece ao planeta um filtro protetor aos raios solares, estes chegam com maior intensidade à crosta terrestre. A radiação UVA induz à formação de radicais livres (ex: peróxidos citotóxicos) que são os principais responsáveis pela fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento. A radiação UVB produz eritemas, dentre outras alterações que ocorrem na pele (SCOTTI *et al.*,2003).

Dr. Fitzpatrick um renomado dermatologista norte-americano estabeleceu a classificação dos tipos de pele baseado na quantidade e no tipo de melanina produzido no organismo, esta classificação é usada como referência internacionalmente (NORDLUNG *et al.*, 2006). As características dos tipos de pele humana são as seguintes (Figura 3):

Tipo I – sempre se queima, nunca se bronzeia. Geralmente pessoas de pele branca leitosa, olhos e cabelos claros, com sardas.

Tipo II – sempre se queima, bronzeamento mínimo. Pessoas brancas, cabelos e olhos claros.

Tipo III – queima moderadamente. Bronzeia-se gradualmente (bronzeado leve). Corresponde ao fototipo mais freqüente das pessoas brancas.

Tipo IV – queima pouco, bronzeia sempre (bronzeado moderado). Pessoas de pele morena clara, cabelos e olhos escuros, orientais.

Tipo V – raramente queima, bronzeia sempre e intensamente. Pessoas morenas, indígenas e mulatos.

Tipo VI – nunca se queimam. Profundamente pigmentados.

Em função disto, principalmente no verão, é necessário tomar medidas de proteção tais como: evitar a exposição ao sol das 10:00 às 16:00h, usar chapéu ou boné, camisa, óculos escuros com lentes fotoprotetoras e filtro solar anti-UVB/UVA, com fator de proteção solar (FPS) igual a 15 ou maior, que deverá ser aplicado 30 minutos antes da exposição, sempre ao sair da água, após atividade física, além de repetir o espalhamento do filtro por todo o corpo a cada 2 horas (INCA, 2009). Preocupada com os números alarmantes de incidência de câncer de pele no Brasil, a Sociedade Brasileira de Dermatologia criou, em 1999, o Programa Nacional de Controle do Câncer da Pele (SBD, 2009). Um dos cuidados para a prevenção desta doença é a utilização diária de filtros solares.

De acordo com Pathak (1983), as queimaduras e o bronzeamento são a resposta estimada dos indivíduos através da estória pessoal de cada um, após a

exposição de 30 a 50 minutos ao sol de meio dia. O ser humano reage de formas distintas à RUV conforme a classificação do tipo de pele (Tabela 1).



Figura 3: Classificação dos tipos de pele (I a VI).

Disponível em: <<http://www.beltina.org/health-dictionary/fitzpatrick-skin-type-classification.html>>.

Tabela 1: Classificação dos tipos de pele humana quanto à resposta relativa da exposição solar aguda e a longo-prazo. Adaptado de Nordlund *et al.* (2006).

Tipo de pele	Suscetibilidade ao eritema	Cor da pele	Habilidade facultativa de bronzeamento	Suscetibilidade ao câncer de pele
I	Alta	Branca	Muito fraca	Alta
II	Alta	Branca	Fraca	Alta
III	Moderada	Branca	Boa	Moderada
IV	Baixa	Parda	Muito boa	Baixa
V	Muito baixa	Marrom	Muito boa	Muito baixa
VI	Muito baixa	Preta	Muito boa	Muito baixa

### 2.1.1 Índice Ultravioleta e câncer de pele

O sol é imprescindível para a vida na Terra e sobrevivência de muitas espécies. É uma fonte inestimável de energia, bem-estar e saúde. A luz solar também proporciona efeitos benéficos, tanto fisiológicos como psicológicos. Por isso, torna-se importante aprender a conviver com o sol, conhecer tudo de bom que ele oferece e saber evitar os riscos ocasionados pela exposição excessiva.

O índice ultravioleta (IUV) é um importante parâmetro capaz de aumentar o nível de informação pública contra os riscos da exposição excessiva à radiação UV e alertar as pessoas sobre a necessidade de medidas preventivas e corretivas. O IUV é uma medida da intensidade da radiação ultravioleta do sol incidente sobre a superfície da Terra (EDLICH *et al.*,2004). Quanto mais alto for o IUV, maior o risco de danos à pele e de aparecimento de câncer. Este índice pode ser verificado diariamente como parte integrante da previsão do tempo.

Os elementos do índice ultravioleta são: a latitude e a estação do ano, a camada de ozônio, a altitude (em geral, a cada quilometro de aumento na altitude, o fluxo de RUV aumenta cerca de 6 %), as nuvens, a reflexão da superfície (a neve e a areia contribuem muito para a refletância) e a poluição (EDLICH *et al.*,2004).

A crescente incidência de câncer de pele tornou-se um problema de saúde pública em escala mundial, inclusive no Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em colaboração com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP), a Organização Meteorológica Internacional (WMO), a Comissão Internacional de Proteção às Radiações Não-Ionizantes (IC-NIRP), decidiram desenvolver um projeto conjunto de proteção da população contra os efeitos danosos da RUV (WHO, 2011). A proposta foi a de associar uma escala denominada Índice Ultravioleta (IUV) aos níveis de RUV relevantes aos efeitos biológicos estabelecidos no ser humano, que pode ser usado e compreendido facilmente e, dessa forma, adotado e divulgado diariamente em boletins meteorológicos. De acordo com Okuno e Vilela (2005) esta decisão baseou-se no fato de que 90 % das ocorrências de câncer de pele do tipo não-melanoma surgem em peles tipos I e II (Figura 3, Tabela 1). Além disso, ao proteger esses grupos, os demais, com pele tipos III, IV, V e VI, estariam automaticamente protegidos.



## 2.2 Fotoproteção e filtros solares

No Brasil, os filtros solares são classificados como cosméticos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – RDC nº 237 de agosto de 2002, existem várias regras para quando tais substâncias forem adicionadas à formulação: no rótulo do produto devem conter informações sobre o FPS, indicação para qual tipo de pele, composição de sua formulação, especificação sobre a resistência à água e advertências quanto ao uso. Para a determinação do FPS são aceitos testes, segundo métodos do Food and Drug Administration (FDA) ou do Comitê das Associações Europeias das Industrias de Perfumaria, Cosméticos e produtos de Toucador (COLIPA). Os métodos de avaliação da proteção UVB são muito similares entre si em sua essência. As diferenças existentes entre os métodos atêm-se basicamente na dosagem necessária para simular a exposição solar, nos critérios de rotulagem e nos parâmetros para a avaliação de resistência à água. A quantificação da proteção UVA deverá ser realizada através de metodologias reconhecidas e validadas (BRASIL-ANVISA 2002). O método *in vivo* mais utilizado baseia-se na resposta tardia ou persistente da pele frente à radiação UVA, também conhecido pela sigla em inglês PPD (Persistent Pigment Darkening). Atualmente, a Austrália é o único país que possui método oficial para a medição da proteção UVA (KHURY & NAKANO, 2007).

Os métodos de medida do FPS baseiam-se no aparecimento de eritema na pele. Portanto, dose eritematógena mínima (DEM) é definida como a quantidade de energia requerida para produzir a primeira reação eritemática perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16-24 horas após à exposição à radiação ultravioleta (Figura 4). O FPS corresponde a quantas DEM uma pessoa pode expor-se ao sol sem desenvolver o eritema, isto é, a relação entre a quantidade de energia ultravioleta necessária para produzir uma DEM na pele protegida e a energia requerida para produzir uma DEM na pele não protegida. Por exemplo: uma pessoa para desenvolver eritema precisa ficar exposta ao sol por 10 minutos sem usar nenhum produto. Com um protetor FPS 15 terá este tempo prolongado para 15 vezes, ou seja 10 minutos multiplicados por 15 igual a 150 minutos (2 horas e 30 minutos) (KUREBAYASHI *et al.*, 2002).





Figura 4: Pele sem fotoproteção: Eritema provocado por exposição ao sol sem fotoprotetor (a); Envelhecimento cutâneo devido à exposição excessiva a longo prazo (b). Disponível em: <<http://stopthesun.com/blog/wp-content/uploads//ew.jpg>>; <<http://no2tanning.info/premature>>.

A determinação do FPS é feita em laboratório, utilizando uma lâmpada de UV para simular a radiação ultravioleta solar. Os testes externos utilizando realmente a radiação solar não são muitos comuns, devido à dificuldade em controlar as diversas variáveis naturais, entre elas a intensidade de luz e a condição atmosférica.

O filtro solar ideal que cumpre a sua função com eficácia e segurança deve absorver a radiação na faixa de 280-400 nm, apresentar alto coeficiente de extinção, manter o pico de absorção independente do solvente, ter características lipofílicas, ser atóxico, não causar irritação nem sensibilização na pele, ser barato, ser compatível com veículos cosméticos, ter boa espalhabilidade e aderência na pele (KUREBAYASHI *et al.*, 2002).

Para complementar a ação protetora e diminuir a concentração de substâncias sintéticas que possam causar efeitos indesejados no uso das formulações antissolares, torna-se importante que os filtros atuais possuam na sua composição propriedades antioxidantes oriundas de fontes naturais (BABY *et al.*, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2008).

A aceitação por parte dos consumidores de filtros solares contendo produtos de origem vegetal é bem maior do que os constituídos apenas por sintéticos pois, em geral, os extratos vegetais conferem um conjunto de ações dentro do mesmo produto, tais como: atividade antioxidante, antiinflamatória, fotoprotetora, emoliente e umectante ao invés de uma única ação (RAMOS *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Características dos filtros solares OMC, OCT e BZF-3

Os filtros solares podem ser de natureza física ou química. Os agentes físicos refletem ou dispersam a radiação solar. Durante algum tempo, os filtros solares físicos foram negligenciados devido à aparência antiestética que causavam nos seus usuários. Com o advento da nanotecnologia alguns desses problemas foram resolvidos (JAIN & JAIN,2010). Já os agentes químicos são substâncias que absorvem a radiação ultravioleta e podem ser de origem sintética ou natural.

A RDC nº 47 de 16 de março de 2006 da ANVISA define a lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que contempla 38 substâncias (BRASIL, 2006). Além das substâncias desta lista, as formulações podem também conter outras substâncias que atuam sinergicamente na pele, como é o caso de antioxidantes como a vitamina E. Esta, ao ser utilizada em produtos para proteção solar e dependendo da sua formulação, pode aumentar o fator de proteção solar *in vivo*, através da diminuição da formação de eritema. Outras substâncias e a mistura delas, sintéticas ou de origem natural, vêm sendo amplamente estudadas, na busca da otimização dos protetores solares, visando à ampliação da lista de substâncias fotoprotetoras (GUARATINI *et al.*, 2009).

Os filtros químicos sintéticos são substâncias orgânicas que apresentam em sua estrutura grupos cromóforos que absorvem a RUV simulando a ação fotoprotetora da melanina. É muito comum encontrar nas preparações antissolares atuais a combinação de dois ou mais filtros, com a finalidade de promover um maior FPS (GASPAR *et al.*, 2006).

Os filtros sintéticos orgânicos: 4- metoxicinamato de 2- etilexila ou octilmetoxicinamato (OMC); 2-ciano-3,3-difenil-acrilato de 2-etilexila ou octocrileno (OCT); e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona ou benzofenona 3 (BZF-3) são os mais utilizados mundialmente, pois abrangem ampla faixa dos espectros UVA e UVB, além da comprovada segurança das concentrações recomendadas por fórmula pelo FDA e pela legislação brasileira (Figura 5) (RANGEL & CORRÊA, 2002; EDLICH *et al.*, 2004; BRASIL, 2006).

Nome Comercial				
FILTROS	SINÔNIMOS	NOME QUÍMICO	ESPECTRO	CONC. MÁX. PERMITIDA (%)
Benzofenona - 3	Uvinul M – 40 Eusolex 4360 Neo Heliopan BB Escalol 567 Tinosorb B3 Oxibenzona	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona	UVA curto	10
Octilmetoxicinamato	Tinosorb OMC Escalol 557 Parsol MCX Neo Heliopan AV Uvinul MC-80 Eusolex 2292 Metoxicinamato de octila Cinoxate	4- metoxicinamato de 2- etilexila	UVB	10
Octocrileno	Neo Heliopan 303 Uvinul N-539 Escalol 597 Eusolex OCR	2-ciano-3, 3-difenil-acrilato de 2-etilexila	UVB	10

Figura 5: Esquema ilustrativo dos três filtros, nomes comerciais, espectro de ação e concentração máxima permitida na formulação (BRASIL-ANVISA 2006).

O OMC é um derivado da classe dos cinamatos (Figura 6 a), de peso molecular igual a  $290,4 \text{ g mol}^{-1}$  que absorve na faixa do UVB, apresenta absorção máxima em 311 nm. É um dos filtros solares mais utilizados na proteção da porção UVB do espectro eletromagnético (SHAATH, 1997; RIBEIRO, 2004; MONTEIRO, 2008). O OMC é um líquido oleoso, transparente, levemente amarelado, com odor característico bastante fraco, insolúvel em água, solúvel em etanol e óleo mineral. A concentração máxima permitida pelo FDA é de 7,5 %, porém a maioria dos países permite a concentração máxima de 10 %, incluindo o Brasil e a COLIPA (MONTEIRO, 2008; SHAATH, 2007; RIBEIRO, 2004).

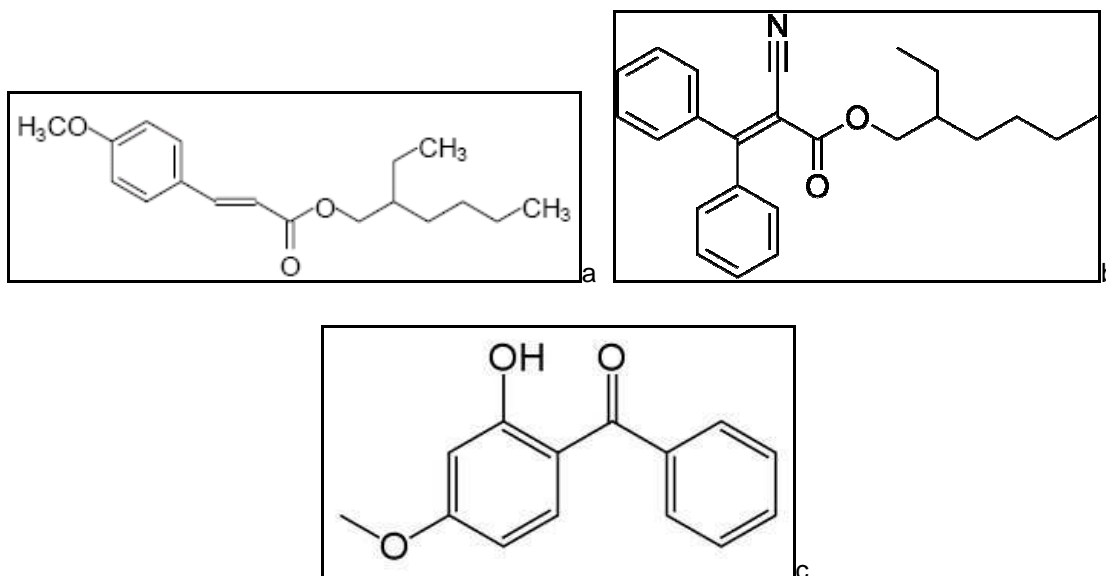


Figura 6: Fórmula estrutural dos filtros sintéticos orgânicos: OMC (a), OCT (b) e BZF-3 (c) (SHAATH, 2007).

O OCT é um derivado pertencente à classe dos cinamatos (Figura 6 b), de fórmula molecular igual a  $C_{24}H_{27}NO_2$ , e apresenta-se como um líquido viscoso amarelo claro, com odor aromático típico, que absorve a radiação na faixa do UVB, com absorção máxima em 303 nm. É comumente utilizado para estabilizar o OMC, reduzindo sua isomerização e conseqüentemente melhorando a eficácia da formulação antissolar. É solúvel em miristato de isopropila, etanol, álcool isopropílico, insolúvel em água, propilenoglicol, e glicerina. A concentração máxima permitida pelo FDA e pela maioria dos países é de 10 % (SHAATH, 2007; RIBEIRO, 2004).

A BZF-3 é uma cetona aromática (Figura 6 c), de fórmula molecular igual a  $C_{14}H_{12}O_3$ , um composto importante na fotoquímica orgânica e na cosmetologia. Absorve a radiação nas faixas UVA e UVB, apresenta absorção máxima em 286 nm e em 324 nm. É um pó amarelo claro, inodoro, insolúvel em água e em óleo mineral, solúvel em propilenoglicol, etanol, álcool isopropílico, glicerina, miristato de isopropila, em concentrações até 12 %. A BZF-3 age como filtro ótico, pois ela é capaz de utilizar a energia da radiação UV para se excitar e na volta para o estado fundamental ela dissipa essa energia em forma de calor para o ambiente ao invés de emitir radiação lesiva à pele. Isso é possível devido à BZF-3 possuir seus estados de singleto e tripleto muito próximos entre si em energia. A concentração máxima permitida pela agência internacional reguladora de alimentos e medicamentos (U.S.FDA/CDER, 1997) é de 6 %, porém a maioria dos países permite a

concentração máxima de 10 %, incluindo o Brasil e a COLIPA (SHAATH, 2007; RIBEIRO, 2004).

Atualmente os filtros solares são incorporados em produtos para uso diário, como hidratantes, batons e produtos para cabelo. Segundo relatos, uma grande quantidade de filtros solares como oxibenzona, OMC, octilsalicilato e homosalato foram encontrados em camadas mais profundas do EC, 30 minutos após aplicação em voluntários. A quantidade encontrada foi menor após 4 horas da aplicação, o que evidencia uma absorção para as camadas mais profundas da pele, e cerca de 1% da dose aplicada de oxibenzona e seus metabólitos foram encontrados na urina após uma única aplicação (SARVEIYA *et al.*, 2004).

As últimas pesquisas sobre fotoproteção da pele tem mostrado que incorporação de antioxidantes tópicos nas formulações antissolares constituem-se numa estratégia importante para o aumento do efeito fotoprotetor suplementar dos filtros solares sintéticos permitidos pela lei (GONZÁLEZ, 2008).

### **2.3 Antioxidantes naturais em formulações antissolares**

Proserpio (1976) ressalta a importância da utilização de produtos sintéticos e naturais juntos numa mesma fórmula. A exclusão dos filtros sintéticos apenas para obtenção de “cosméticos vegetais” fotoprotetores não agregaria ao produto qualidade indispensável. Muitos filtros sintéticos possuem ações suplementares interessantes à função antissolar, como conferir aos produtos cosméticos fotoprotetores uma maior resistência à contaminação microbiana. Por outro lado, a adição de uma porção apropriada de filtros naturais aos filtros sintéticos produz, além de vantagens eudérmicas, uma excelente capacidade para absorver a radiação UV curta e atuam como “curativos efetivos” protegendo os capilares periféricos. Alguns também favorecem a produção de melanina, estruturas pigmentares endógenas, conferindo efeito emoliente e descongestionante. Em geral, os extratos vegetais fornecem um complexo de substâncias funcionais à pele, o que somente um derivado natural é capaz de fazê-lo. Muito antes do surgimento dos filtros solares sintéticos manufaturados para a proteção da pele contra a radiação UV, os extratos vegetais eram usados com esta finalidade. Proserpio (1976) cita a utilização de extratos de aloé, frângula, camomila e hipérico, entre outros, como filtros solares e indica o possível grupo químico (poliglicosídeos hidroxiantracênicos naturais)

responsáveis pela absorção presente nestes extratos, comparando-os ao grupo químico de filtros sintéticos utilizados no mercado.

Na década de 80, os estudos visavam a utilização de produtos naturais como filtros solares, ainda não disseminados nas formulações cosméticas para a proteção da pele. Bader *et al.* (1981) ao pesquisarem substâncias naturais como agentes fotoprotetores incorporados nas formulações de filtros solares, encontraram aplicação de extratos secos em diversas concentrações de aloé, frângula, sene e cáscara-sagrada com propriedades benéficas consistentes para este fim. Ramos *et al.* (2003) objetivaram avaliar a ação dos extratos de *Aloe spp* e *Hamamelis virginiana* como filtros solares, assim como da associação desses extratos com o filtro sintético OMC. As autoras encontraram resultados promissores dos extratos secos, mais concentrados, absorvendo na faixa de comprimento de onda entre 260-350 nm, além da associação dos extratos com o filtro sintético resultando num aumento do FPS, sugerindo um efeito sinérgico. Rosa *et al.* (2008) avaliaram o FPS de extratos vegetais aquosos de diversas plantas e viram que extratos, a partir da concentração de 10% (massa da planta triturada/volume de água) de *Achillea millefolium* (FPS = 8), *Sonchus oleraceus* (FPS = 6) e *Porophyllum ruderale* (FPS = 5) foram os mais eficazes como fotoprotetores contra eritematose, levando em consideração as radiações UVA-UVB. Os autores concluíram que, devido a baixa concentração, esses extratos podem ser empregados na produção de fitocosméticos com aplicação fotoprotetora. Ao comparar filtros físicos com os filtros químicos de origem vegetal, estes demonstraram ser produtos mais suaves e com baixo perfil de toxidez (JAIN & JAIN, 2010).

O emprego de extratos vegetais com intuito de proteger a pele contra o fotoenvelhecimento vem crescendo muito nos últimos anos, uma vez que alguns destes extratos apresentam substâncias com alto potencial antioxidante que poderiam neutralizar os radicais livres produzidos na pele após a exposição excessiva à radiação UV (F'GUYER *et al.*, 2003).

## 2.4 Radicais livres, oxidação, estresse oxidativo e antioxidantes

### 2.4.1 Radicais livres

Radicaís livres são átomos ou moléculas altamente reativos, instáveis que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Ora cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro reduzindo-se.

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (FERREIRA *et al.*, 2007; BIANCHI & ANTUNES, 1999). Em sua maioria são derivados do metabolismo do oxigênio ( $O_2$ ), e denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como: radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), alcóxila ( $RO^{\cdot}$ ), hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), peróxila ( $ROO^{\cdot}$ ), entre vários outros (Figura 7). As EROs são formadas continuamente durante os processos metabólicos – normais ou patogênicos – ou são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas (GOULART *et al.*, 2009).

Este é o paradoxo do metabolismo do  $O_2$ , ao mesmo tempo as EROs são tóxicas à certas estruturas celulares, o  $O_2$  é essencial para vida e produção energética celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

As EROs e os radicais livres estão diretamente envolvidos numa infinidade de doenças nos seres humanos. Eles reagem com uma ampla variedade de substratos biológicos, tais como: lipídeos, ácido desoxirribonucléico (ADN) e proteínas, resultando em danos à membrana celular. Esses danos incluem mutação do ADN, oxidação das proteínas, peroxidação lipídica, contribuindo para o desenvolvimento do câncer, diabetes, aterosclerose, inflamações e envelhecimento precoce (FINKEL & HOLBROOK, 2000). Entretanto, os antioxidantes (endógenos ou exógenos) podem prevenir os danos ou a morte celular (SILVA *et al.*, 2005).

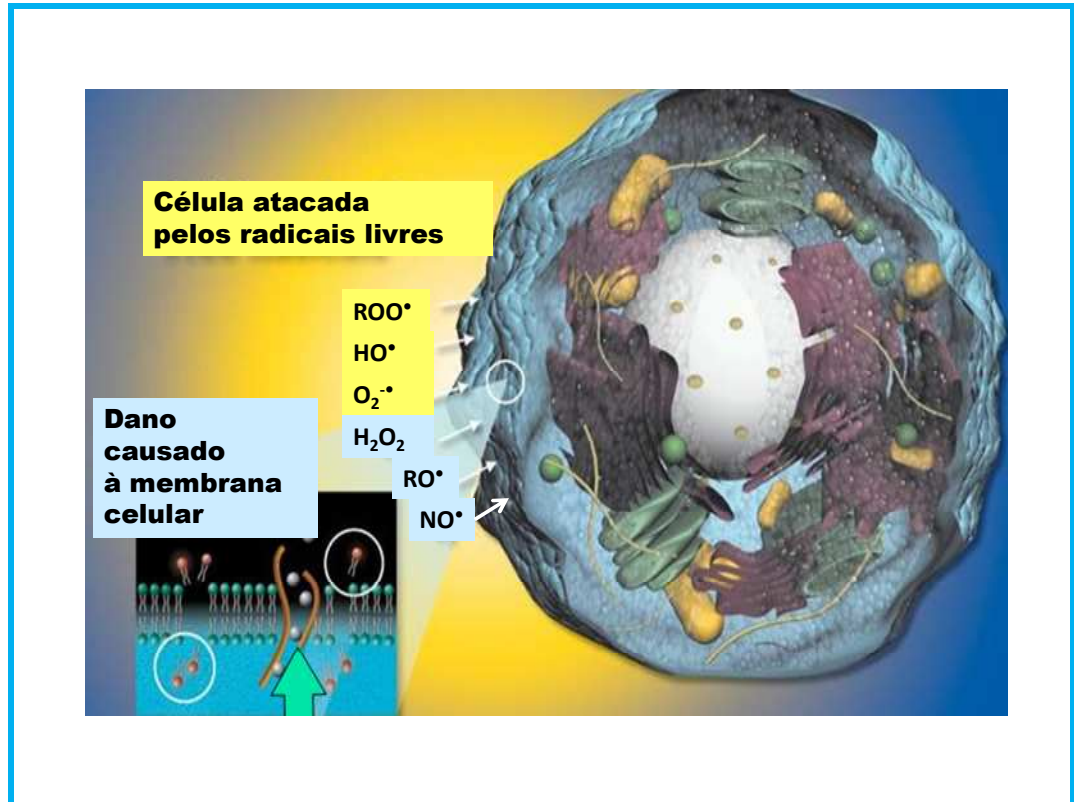


Figura 7: Esquema ilustrativo do ataque dos radicais livres à célula. Disponível em: <<http://www.darwinstable.com/2010/07/21/free-radicals-why-they-matter/>>.

## 2.4.2 Oxidação

A oxidação é um fenômeno químico muito complexo, envolvendo reações radiculares capazes de auto-propagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres e pH). No decurso da reação, ela é classicamente dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação (BORGES *et al.*, 1999). O que envolve o desaparecimento dos substratos da oxidação (oxigênio, lipídio insaturado); o aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), e o aparecimento de produtos secundários de oxidação (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

Os antioxidantes neutralizam a oxidação de duas diferentes maneiras: protegendo os alvos lipídicos a partir dos iniciadores da oxidação ou bloqueando a fase de propagação. No primeiro caso, os antioxidantes são chamados primários, isto é, retardam a formação das EROs ou capturam as espécies responsáveis pela iniciação da oxidação. No segundo caso, os antioxidantes são chamados secundários, eles interceptam os radicais responsáveis pela fase de propagação da



oxidação, ou indiretamente participam da quebra da propagação em cadeia (LAGUERRE *et. al.*, 2007). Porém, torna-se importante ter em mente que os antioxidantes frequentemente agem por um conjunto de mecanismos químicos que combinam diferentes tipos de antioxidação.

### **2.4.3 Estresse oxidativo e antioxidantes**

As EROs desempenham várias funções *in vivo*, sendo algumas positivas e relacionadas à produção de energia, fagocitose, regulação de crescimento celular e de sinalização intercelular, além da síntese de compostos biologicamente importantes (HALLIWELL, 1997). Em certos momentos, a presença destes radicais livres é maior do que as defesas do organismo em eliminá-los, e por isso comprometem a manutenção de muitas funções fisiológicas. Então, as EROs podem ser extremamente danosas aos tecidos, uma vez que atacam os lipídeos de membranas celulares, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, causando oxidação e alteração destas moléculas. Essas alterações envolvem o desenvolvimento de diferentes patologias no organismo. Portanto, são consideradas chave nos processos de resposta inflamatória, envelhecimento e de doenças como o câncer (PIETTA, 2000).

A pele possui um conjunto de mecanismos de defesa antioxidante: enzimático intrínseco e não-enzimático, que atuam protegendo os espaços intra e extracelulares. As enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase neutralizam o peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos. A superóxido dismutase-Cu-Zn e a superóxido dismutase-Mg protegem as células contra o radical superóxido. Antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a vitamina E, e o ubiquinol, presente nas mitocôndrias, entre outros. Quando há um desequilíbrio nas nossas reservas antioxidantes a favor das substâncias oxidantes o resultado é chamado estresse oxidativo (FERREIRA *et al.*, 2007). Na pele humana, muitos antioxidantes de baixo peso molecular estão presentes e alguns detectáveis em concentrações relevantes mesmo no estrato córneo. Pode ocorrer queda na concentração do antioxidantes endógenos devido a uma série de fatores, inclusive externos, como serem consumidos pela radiação UV solar, conseqüentemente associada à formação de componentes celulares oxidados e morte celular. Além das medidas físicas ou químicas para a proteção contra a luz ultravioleta, o uso de

antioxidantes de baixo peso molecular parece ser apropriado para a prevenção do envelhecimento cutâneo prematuro. Isso pode ser fornecido à pele via dieta rica em frutas e vegetais ou por meio de administração tópica ou oral destes (PODDA *et al.*, 2001).

Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados em formas farmacêuticas encontram-se o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT).

Há muita controvérsia nessa área de pesquisa, indicando a necessidade de obtenção de evidências a respeito da eficácia, segurança e dosagem apropriada de antioxidantes em relação às doenças crônicas. As características que um bom antioxidante deve apresentar: ser um composto biológico naturalmente presente em tecidos animais; atividade na proteção de moléculas de proteínas e lipídios; boa disponibilidade após administração oral e parenteral, meia-vida longa; atividade no espaço intra e extracelular, capacidade de cruzar a membrana celular intacto. O que nenhum antioxidante isoladamente é capaz de reunir (GOULART *et al.*, 2009).

Quanto à solubilidade, os antioxidantes naturais podem ser denominados: hidrofílicos, como por exemplo a vitamina C e a maioria das substâncias fenólicas, e antioxidantes lipofílicos, particularmente a vitamina E e os carotenóides. Ambos tem um papel importante no espectro de processos bioquímicos e fisiológicos (HUANG *et al.*, 2002).

Os antioxidantes podem agir por diferentes mecanismos nas etapas da sequência oxidativa, capturando o oxigênio singlete, reduzindo radicais peróxidos, desativando os radicais livres por reação de adição covalente, ligando íons metálicos que poderão gerar as EROs (LAGUERRE *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante deve ser investigada exaustivamente por diferentes metodologias, pois segundo alguns autores (FUCHS, 1998; NIKI, 2010) uma substância potencialmente antioxidante age como pró-oxidante sob condições especiais. Por exemplo, o alfa-tocoferol absorve a radiação UV na pele gerando radicais tocoferoxilas. Pelo mecanismo próprio de estabilização do tocoferol, este atua como depletivo de outros antioxidantes presentes em nosso organismo, como o ascorbato, tiol e ubiquinol, demonstrando desta forma atividade pró-oxidante.

## 2.5 Plantas com atividade antioxidante

As plantas constituem-se numa fonte importante de produtos naturais que desempenham papel relevante na medicina tradicional em diferentes países.

Ao longo da evolução, os organismos vivos desenvolveram estratégias para tornarem-se capazes de sobreviver sob intensa e direta exposição à radiação UV. Cada organismo vivo exposto à radiação UV apresenta diferentes reações, e particularmente produção de substâncias fotoprotetoras, tais como, os flavonóides sintetizados pelos vegetais, e a melanina expressa pelas células animais e humanas (HENRIQUES *et al.*, 2009).

Muitos dos princípios ativos em plantas medicinais são substâncias fenólicas. Existe um extenso número de trabalhos publicados descrevendo a atividade antioxidante de ervas, plantas medicinais, temperos e alimentos. No estudo da determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae, os autores avaliaram a atividade captadora de radicais empregando o método DPPH e concluíram que, dependendo da polaridade do solvente utilizado na extração, explica-se uma maior atividade antioxidante obtida devido à classe das substâncias extraídas (ANDRADE *et al.*, 2007). Estudos recentes têm relacionado plantas pertencentes ao mesmo gênero como fontes de substâncias fenólicas, as quais apresentam propriedades biológicas diversas. Algumas plantas pertencentes à família Leguminosae possuem alto conteúdo de polifenóis totais (PT), e as substâncias com núcleo fenólico, como o tocoferol, flavonóides e ácidos fenólicos apresentam destaque especial como antioxidantes (SILVA *et al.*, 2007).

Hostettmann *et al.* (2003) falam sobre a importância da quimiotaxonomia, a ciência da classificação das plantas em função dos seus constituintes químicos. Algumas classes químicas de substâncias são características de uma família, um gênero ou mesmo de uma única espécie. Significa dizer que é possível encontrar substâncias análogas àquela natural que exerce função terapêutica em espécies do mesmo gênero ou da mesma família. Neste contexto, os antioxidantes de origem natural merecem atenção especial, pois as plantas sintetizam um grande número de metabólitos secundários capazes de captar os radicais livres (SOUZA *et al.*, 2010).

Atualmente preconiza-se a padronização das culturas de plantas medicinais e o uso de marcadores que indicam a presença de componentes químicos específicos

na planta. À obtenção de extratos padronizados, com quantidades definidas de substâncias químicas é fundamental para a preparação de formas farmacêuticas seguras e de qualidade garantida. De acordo com a legislação vigente (BRASIL-ANVISA, 2010) RDC nº 14 de 31 de março de 2010, “marcadores são compostos ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que são utilizados como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico”.

A grande complexidade química existente num extrato vegetal torna muito difícil atribuir, separar bem como quantificar em matrizes biológicas esta ou aquela classe específica de substâncias responsáveis por determinada propriedade terapêutica. Assim, vários ensaios *in vitro* vem sendo desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante total de diferentes amostras, especialmente vinhos, frutas, e outros vegetais (GIADA & MANCINI-FILHO, 2004).

### **2.5.1 *Ginkgo biloba* Linné**

*Ginkgo biloba* Linné, única planta vivente da família Ginkgoaceae, é considerada um fóssil vivo (Figura 8). Curiosamente possui forte resistência a uma grande variedade de pragas e fungos, o que contribui para sua longevidade. Após a Segunda Grande Guerra Mundial despertou o interesse de pesquisadores, quando observaram que a “Árvore da Vida” havia sobrevivido à radiação nuclear em Hiroshima (BELO, 2008). Vários estudos clínicos validaram o uso seguro e eficaz de extratos desta planta indicados para deficiência de memória, distúrbio de concentração, condição emocional depressiva, vertigem, tinido auditivo e dor de cabeça. Para que as ações benéficas do *Ginkgo biloba* sejam obtidas torna-se imprescindível a utilização de extratos padronizados contendo 24 % de flavonóides simples e complexos (biflavonóides), além de 6 % de derivados terpenoídicos (gincolídeos A, B, C, J e M e bilobalídeo) (ROCHA, 2006).



Figura 8: “Árvore da vida”: *Ginkgo biloba* Linné (a), folha (b) e cápsulas de *G. biloba* (c).  
Disponível em: <<http://www.natural-cures-for.com/herbs/ginkgo-biloba>>  
<<http://www.plantsystematics.org/imgs>>

### 2.5.2 O gênero *Bauhinia*: Ocorrência e a variedade *massambabensis*

Pertencente à família Leguminosae-Caesalpinioideae, atualmente chamada família Fabaceae (ARAÚJO *et al.*, 2009) *Bauhinia* é um gênero cosmopolita, com espécies amplamente distribuídas em toda zona equatorial tropical, em ambos os hemisférios (SALATINO, 1976). *Bauhinia* conta com aproximadamente 300 espécies, com pelo menos 100 destas ocorrendo em território brasileiro. Trabalhos envolvendo fitoquímica, tem demonstrado que o gênero *Bauhinia* revela-se numa riquíssima fonte para o estudo de atividades farmacológicas (LEO, 2005).

*Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz (Figura 9) são lianas de até oito metros de altura, de ocorrência restrita a regiões mais áridas, como restingas e cordões arenosos, com registros de coletas apenas para o Estado do Rio de Janeiro (VAZ, 1979; VAZ & MARQUETE, 1991). Esta espécie é encontrada na Área de Proteção Ambiental (APA) de Massambaba, localizada na região dos Lagos, a leste

da cidade do Rio de Janeiro. Esta área encontra-se entre as “Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira” ou “Áreas Prioritárias para a Biodiversidade”, e indicada nas classes de importância biológica e prioridade de ação como “extremamente alta”. *B. microstachya* var. *massambabensis* é encontrada em floresta classificada como não inundável e possui hábito de trepadeira (ARAÚJO *et al.*, 2009).

A escolha desta espécie em nosso estudo baseia-se na elevada capacidade antioxidante do extrato de suas folhas detectada por meio dos ensaios com o radical livre DPPH<sup>•</sup> (MENEZES *et al.*, 2004), como demonstrado por Leo (2005).



Figura 9: Vista panorâmica de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis*, na reserva ecológica da restinga de Jacarepiá, Área de Proteção Ambiental (APA) de Massambaba, município de Saquarema no Estado do Rio de Janeiro. Fotos da autora.

O uso medicinal das plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* pela população de diferentes partes do mundo tem encontrado respaldo em estudos científicos recentes, por apresentarem atividade hipoglicemiante, fungicida, antiviral, anticâncerígena, antioxidante entre outras (SILVA & CECHINEL-FILHO, 2002; FANG *et al.*, 2010). Algumas destas espécies são conhecidas popularmente por “pata-de-vaca”, “escada-de-macaco” ou “cipó-escada” dentre outras denominações.

Ao avaliar a capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, foi verificado por Hirata (2004) que os extratos preparados mantiveram alta capacidade antioxidante de uma forma geral quando comparados



com valores obtidos de outras espécies. Estudos fitoquímicos preliminares revelaram que plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* são constituídas por glicosídeos esteróidicos, triterpenos, lactonas e flavonóides, cuja presença comprova a eficácia destas plantas em vários modelos experimentais. Desta forma, a incorporação dos extratos testados e selecionados desta espécie em formas farmacêuticas de uso tópico para prevenção dos danos causados à pele pela radiação UV torna-se ao menos interessante. Similarmente, outros estudos utilizando extratos de chá verde e *Ginkgo biloba* em formulações cosméticas com ação fotoprotetora mostraram ser extremamente eficazes, como demonstrado por Belo (2008).

### **2.5.3 A formação dos flavonóides nos vegetais e o efeito antioxidante**

A estrutura básica dos flavonóides consiste de dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A primeira origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico que, por sua vez, origina o ácido cumárico, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda, resulta no outro anel aromático (anel A) da estrutura básica dos flavonóides (Figura 10 a). As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C, enquanto que substâncias de uma mesma classe diferem entre si pelo padrão de substituição dos anéis A e B (Figura 10 a) (PETROVICK *et al.*, 2004).

Os flavonóides geralmente ocorrem nos vegetais como derivados glicosilados, e participam da fotossíntese na fase dependente da luz (PIETTA, 2000). Eles desempenham diferentes papéis na ecologia das plantas, tais como, cores atrativas para polinizadores, defesa contra predadores por causa de sua propriedade adstringente, e principalmente pela capacidade de absorver a radiação UV protegendo as plantas deste tipo de radiação solar, além de capturar as espécies reativas de oxigênio gerados pelos raios UV (PETROVICK *et al.*, 2004). Neste contexto, é possível que a atividade antioxidante atribuída aos flavonóides no organismo humano seja a neutralização de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica que é a principal responsável pelo fotoenvelhecimento e câncer de pele (LAGUERRE *et al.*, 2007).

Os flavonóides figuram entre os produtos naturais mais importantes e diversificados da ampla classe de substâncias fenólicas distribuídas no reino vegetal.

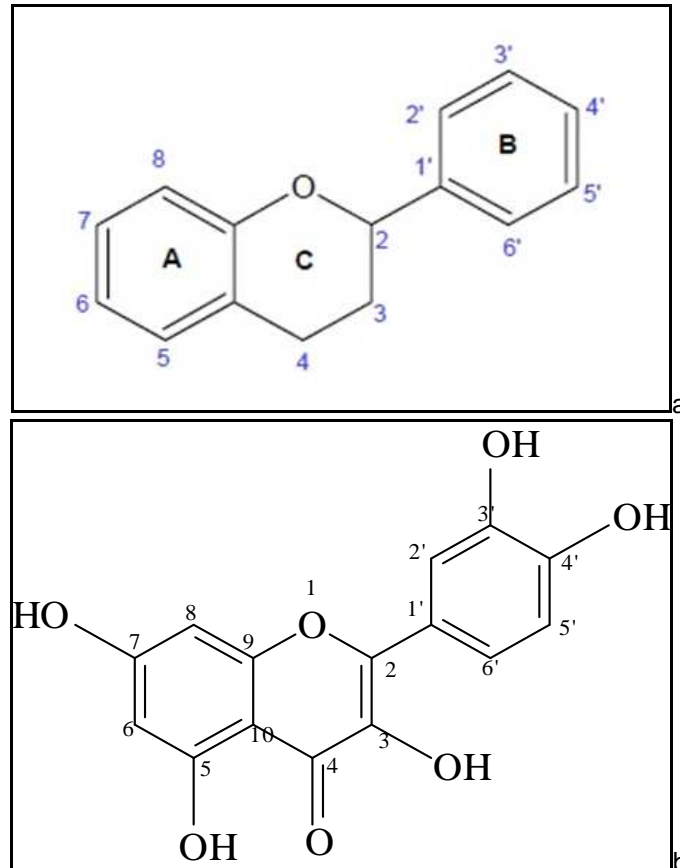


Figura 10: Estrutura básica dos flavonóides (a) e fórmula estrutural da quercetina (b) (PETROVICK *et al.*, 2004).

No estudo de plantas coreanas Cho *et al.* (2003) encontraram forte potencial antioxidante pelo método do DPPH<sup>\*</sup> promovidos por diversos compostos fenólicos, tais como, ácido gálico, galato de metila, quercetina (Figura 10 b) e kaempferol entre outros. Esses autores viram que os polifenóis isolados podem ser agentes promissores no tratamento de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo.

Yokozawa *et al.* (1998) sustentam que um aumento do peso molecular e/ou a presença de grupos galoíla e de estrutura orto-hidroxílica potencializam efeitos antioxidantes, pois os radicais polifenólicos são conhecidos como espécies altamente reativas, capazes de sofrerem uma variedade de reações, levando a dímeros, que são formas poliméricas, mais ativas do que seus respectivos monómeros (YOSHIDA *et al.*, 1989).



Um bom exemplo pode ser visto por Rouanet *et al.* (2010) que associaram a prevenção de aterosclerose, em ensaios com hamsters com uma dieta rica em flavonóides, sendo vários destes derivados da quercetina e do kaempferol. Uma recente revisão sobre dieta rica em kaempferol e seus benefícios pode ser encontrada em Calderon-Montano *et al.* (2011). As atividades descritas incluem antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, anticâncerígena, cardioprotetora, neuroprotetora, antidiabética, antiosteoporose, estrogênica e antiestrogênica, ansiolítica, analgésica e antialérgica.

## **2.6. Métodos *in vitro* para avaliação da capacidade antioxidante**

Existem diversos métodos *in vitro* para avaliação da capacidade antioxidante da substância em análise, tais como: DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ORAC, sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, FRAP (poder antioxidante na redução do ferro), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), método Rancimat, entre outros (KUSKOSKI *et al.*, 2005; ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

As reações químicas podem envolver a transferência de elétrons ou de H<sup>+</sup>, e quanto à classificação estes métodos podem ser baseados no sequestro de radicais livres do meio e nos que empregam lipídeos como substrato (GIADA, 2006). Alguns métodos determinam a capacidade dos antioxidantes na varredura de radicais livres gerados no meio de reação, outros medem a varredura de espécies radicais estáveis pelos antioxidantes, ou a eficiência dos antioxidantes em remover radicais de oxigênio gerados por sistema enzimático ou, ainda, a inibição da peroxidação lipídica pelos antioxidantes (PULIDO, BRAVO & SAURA-CALIXTO, 2000).

### **2.6.1 Método DPPH<sup>•</sup>**

A descoloração do radical livre estável DPPH<sup>•</sup>, também chamado método DPPH, foi originalmente desenvolvido por Blois (1958), amplamente utilizado para medir a capacidade de captura deste radical por supostas substâncias antioxidantes de interesse fitotecnológico, alimentar, farmacológico e toxicológico (MAMBRO & FONSECA, 2005; RUFINO *et al.*, 2007a). Dentre os métodos existentes baseados no sequestro de radicais livres, o DPPH<sup>•</sup> é frequentemente escolhido na investigação

da capacidade antioxidante de diferentes amostras, por ser um método espectrofotocolorimétrico, rápido, de baixo custo e capaz de determinar o poder redutor das substâncias analisadas (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; MENEZES & VICENTINO, 2007; RUFINO *et al.*, 2010).

O radical livre estável DPPH<sup>•</sup> possui coloração violeta e absorve luz à 518 nm. Quando o radical é reduzido pelo antioxidante da amostra, a solução violeta sofre descoloração para o amarelo claro (Figura 11). 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<sup>•</sup> pelo suposto antioxidante.

A maioria dos trabalhos publicados expressa o resultado das substâncias antioxidantes analisadas como a concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado (CE<sub>50</sub>) (MENSOR, 1999).

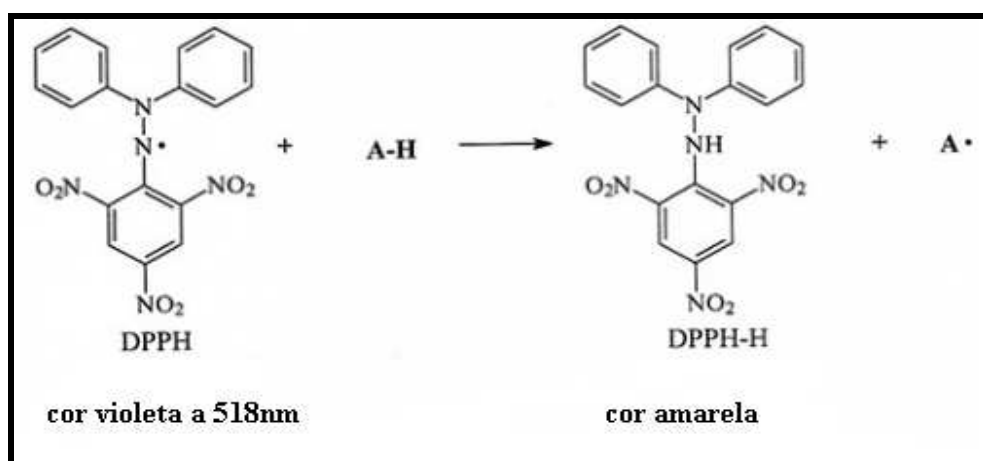


Figura 11: Esquema da redução do radical livre estável DPPH<sup>•</sup> por um antioxidante (AH)  
Adaptado de Rufino *et al.*, 2007a.

Num estudo recente, o método DPPH foi utilizado para avaliação da atividade antioxidante do extrato das folhas de bardana (GOUVÊA *et al.*, 2006).

Na literatura são descritos inúmeros trabalhos envolvendo o conteúdo de polifenóis totais, flavonóides e seu potencial antioxidante. Santos *et al.* (2009) demonstraram excelentes resultados da atividade de varredura dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> com a isoquercitrina (CE<sub>50</sub> = 11,8 µg mL<sup>-1</sup>).

Menezes *et al.* (2004) demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcolóico CE<sub>50</sub> igual a 5,50 µg mL<sup>-1</sup> das folhas de *B. microstachya* Macbride (escada-de-macaco) coletada no sudeste do Paraná.

Souza *et al.* (2010) verificaram, pelo método de varredura do radical DPPH<sup>•</sup>, CE<sub>50</sub> igual a 62,21 µg mL<sup>-1</sup> para a atividade antioxidante do extrato etanólico das raízes de *S. cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae.

Santos *et al.* (2009) estudaram a propriedade antioxidante de diversos extratos de plantas brasileiras. O melhor valor de CE<sub>50</sub> encontrado foi de 28 µg mL<sup>-1</sup> obtido no extrato etanólico das folhas de *I. juruensis*. O resultado para CE<sub>50</sub> da quercetina foi igual a 17 µg mL<sup>-1</sup>, um flavonóide isolado utilizado como padrão para análise da capacidade antioxidante pelo método DPPH (SANTOS *et al.*, 2009).

### 2.6.2 Método ABTS<sup>•+</sup>

A descoloração do radical monocatión ABTS<sup>•+</sup> é denominado método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico), também denominado por alguns autores método da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox<sup>®</sup>, correspondente a sigla em inglês TEAC (Trolox<sup>®</sup> Equivalent Antioxidant Capacity) (RE *et al.*, 1999; KUSKOSKI *et al.*, 2005; RUFINO *et al.*, 2007b). Trolox<sup>®</sup> é o nome comercial da Hoffman-La Roche para o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, uma substância química de referência largamente utilizada como padrão para investigação da capacidade antioxidante em diferentes metodologias e em aplicações bioquímicas para reduzir o estresse oxidativo. O radical monocatión ABTS<sup>•+</sup> é gerado a partir da reação do ABTS com o persulfato de potássio. Esta solução tem cor verde-azulada escura e absorve luz à 734 nm. Durante a reação do radical ABTS<sup>•+</sup> com o suposto antioxidante, o monocatión é convertido e a solução torna-se verde-azulada clara voltando ao estado neutro (ABTS) (Figura 12). Essa descoloração é monitorada espectrofotometricamente. A influência da concentração do antioxidante e a duração da reação de inibição da absorção são levados em conta quando se determina a atividade antioxidante. Os resultados deste ensaio são expressos como capacidade antioxidante em equivalentes ao Trolox<sup>®</sup> (Figura 13).

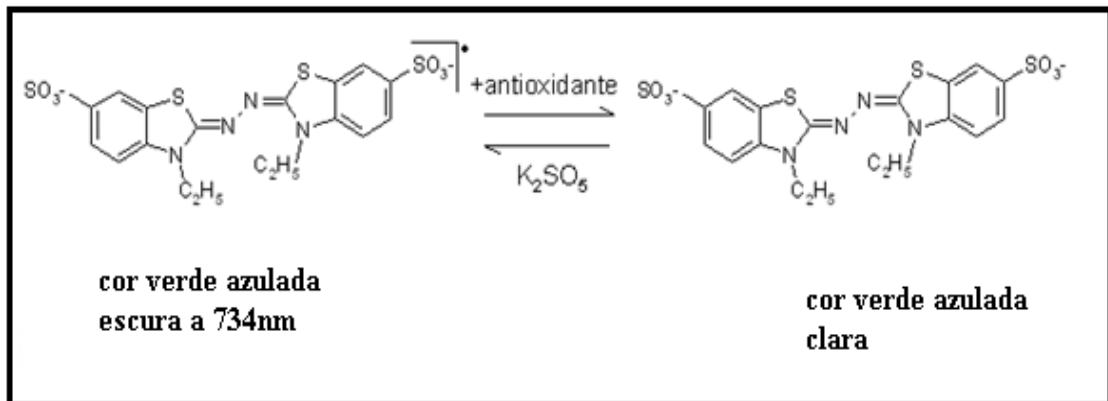


Figura 12: Esquema da geração do ABTS<sup>•+</sup> através da reação com o persulfato de potássio, e a sua redução à ABTS na presença de um antioxidante  
Adaptado de Rufino *et al.* (2007b).

O método ABTS tem sido bastante empregado, por ser um método estável e sensível para avaliação de amostras de frutas, hortaliças e vegetais (MANCINI *et al.*, 2005; OZGEN *et al.*, 2006). Este método apresenta vantagens em relação a outros métodos baseados no sequestro de radicais livres, tais como: aplicável a ambos os tipos de antioxidantes (tanto lipó quanto os hidrofílicos), o radical é gerado ao longo de todo o tempo do ensaio, por isso exibe uma melhor “performance” nos resultados (RE *et al.*, 1999; RUFINO *et al.*, 2007). Kuskoski *et al.* (2005) utilizaram o método ABTS para determinar a atividade antioxidante de diferentes polpas de frutos (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), esse é um dos mais utilizados métodos para medir a atividade antioxidante em vegetais.

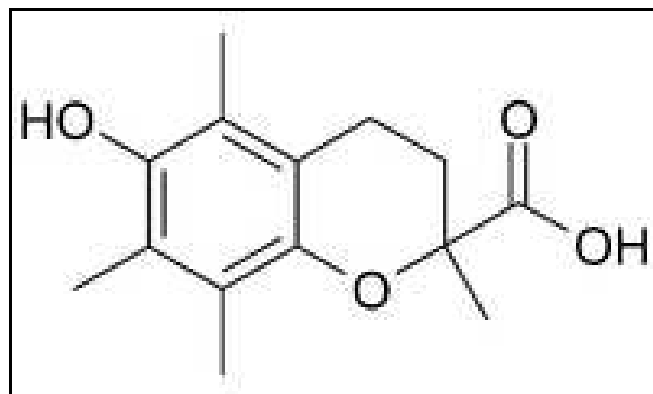


Figura 13: Fórmula estrutural do Trolox<sup>®</sup>.  
Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Trolox>>.

### 2.6.3 Método ORAC

O método ORAC, foi desenvolvido por Prior e Cao (1999), encontra-se entre os principais métodos utilizados baseados no sequestro de radicais livres. Este método mensura a capacidade antioxidante de uma substância frente à formação do radical livre peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) induzido pelo iniciador 2,2'-azo-bis(2-metilpropionamida) diidroclorídrico (AAPH) em tampão a  $37^\circ\text{C}$ . Este método apresenta vantagens em relação a outros, tais como: a utilização de um radical de importância biológica ( $\text{ROO}^\bullet$ ), que está intimamente ligado aos eventos danosos ocorridos na membrana celular, além da FL apresentar redução de custos, excelente fotoestabilidade e não reagir com as substâncias antioxidantes (GOMES, 2005).

Os radicais  $\text{ROO}^\bullet$  degradam a estrutura da sonda FL, com o conseqüente decréscimo da emissão de fluorescência, formando um produto não-fluorescente (Figura 14) (OU *et al.*,2001). O sinal da FL como prova de fluorescência dependerá da capacidade do antioxidante em análise. O efeito protetor da amostra estudada é verificado calculando-se a área sob a curva de decaimento da fluorescência em função do tempo, quando comparada ao branco. Os resultados deste ensaio são expressos como valor ORAC relativo a equivalentes ao Trolox<sup>®</sup>.

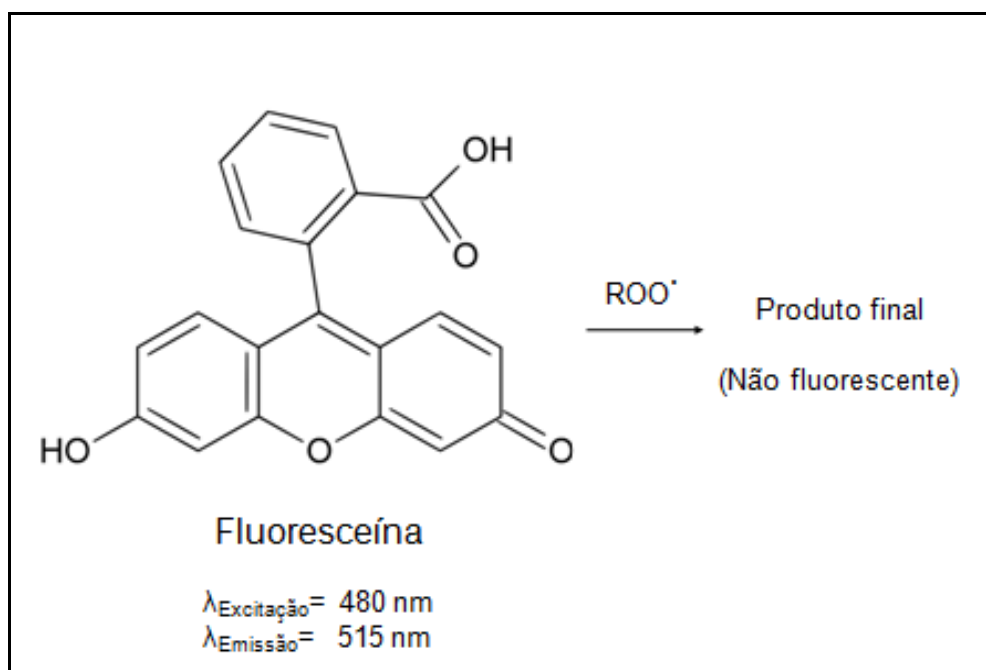


Figura 14: Esquema da oxidação da FL pelo  $\text{ROO}^\bullet$  e formação de um produto final não fluorescente. Adaptado de Ou *et al.* (2001).

Este método tem sido amplamente empregado para medir a capacidade antioxidante de substâncias puras, como a melatonina e flavonóides; em fluidos biológicos, como o soro, a urina e o plasma; em produtos naturais, como frutas e demais vegetais; e em produtos industrializados, como vinhos e chás. O método ORAC avalia tanto antioxidantes lipofílicos quanto os hidrofílicos (OU *et al.*, 2001; OU *et al.*, 2002; GIADA & MANCINI-FILHO, 2009). É um método extremamente sensível e econômico, pois utiliza mínimas quantidades de reagentes.

Em recente investigação, sobre a capacidade antioxidante utilizando os três diferentes ensaios *in vitro*: DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> e ORAC, os autores verificaram um forte potencial antioxidante em quatro produtos fitoquímicos comerciais (extrato das folhas da oliveira, luteína, sesamol e ácido elágico). Os diferentes métodos permitiram um amplo conhecimento do perfil antioxidante dos produtos selecionados, além de fornecerem sugestões de quanto efetivo esses produtos podem ser no desenvolvimento de aditivos alimentares e nutracêuticos para a prevenção de doenças relacionadas aos danos causados pelos radicais livres (HAYES *et al.*, 2011; RUFINO *et al.*, 2010). Nestes métodos, diferentes substâncias químicas puras são utilizadas como padrões de comparação para capacidade antioxidante da amostra em análise.

A capacidade fisiológica dos compostos fenólicos deve ser mais bem compreendida se considerarmos que, *in vitro*, sua capacidade antioxidante varia não somente em função da estrutura química destas substâncias, mas também do tipo e polaridade do solvente empregado em sua extração (PÉREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006), dos procedimentos de isolamento e da pureza das substâncias estudadas, do substrato a ser protegido pelo antioxidante, bem como se o ensaio será desenvolvido em sistema aquoso ou lipídico (GIADA, 2006).

### **3. Eficácia e Segurança das Formulações Antissolares**

#### **3.1 Eficácia das formulações antissolares**

A eficácia de uma formulação antissolar é a qualidade ou propriedade que produz o efeito fotoprotetor maior ou menor em relação à formação de eritema. Além disso, a eficácia depende de sua incorporação em veículos apropriados, já que suas propriedades hidrofílicas, lipofílicas, emolientes, pH, estabilidade em temperaturas

elevadas, influenciam o FPS. Existem diversos métodos padronizados para a determinação de um produto cosmético frente aos raios UVB. O princípio da avaliação do FPS usa a resposta eritematosa da pele formada devido à exposição à radiação UVB, cuja intensidade é proporcional à dose recebida (MARTINI & SEILLER, 2006; KHURY & NAKANO, 2007).

No Brasil, a RDC 237 de 22 de agosto de 2002 define as normas aceitas para avaliação do FPS, mas não regulamenta um protocolo para a avaliação de produtos e elaboração de rotulagem específica para a proteção UVA (BRASIL, 2002). De acordo com a ANVISA (2006), a eficácia das formulações antissolares deve ser avaliada empregando metodologias *in vivo*, para a determinação do FPS a seco e após imersão em água. Devido aos custos envolvidos nos ensaios com voluntários, o emprego da metodologia *in vitro* é uma ferramenta normalmente utilizada para os estudos preliminares da determinação do FPS de novos filtros solares e na rotina do controle de qualidade destas formulações (MANSUR *et al.*, 1986; DIFFEY, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos da América, o FDA classifica filtros solares como medicamento O.T.C. (over-the-counter) e estabelece normas para determinação do FPS e resistência à água. Loções que tenham FPS 15 ou mais poderão manter a informação no rótulo (UVA + UVB = amplo espectro) de que reduzem o risco de câncer e o envelhecimento precoce da pele. Qualquer produto que tiver o FPS 2 a 14 deve incluir o aviso de que o produto não ajuda a prevenir contra o câncer ou envelhecimento da pele. O FPS máximo permitido no rótulo deverá ser igual a 50<sup>+</sup> (FDA, 2011).

### **3.2 Segurança das formulações antissolares**

Os produtos cosméticos antes de chegarem ao consumidor, devem passar por processo de avaliação de risco e por testes de segurança, para assegurar o direito do consumidor e a garantia da saúde da população, no sentido de não conter substâncias cáusticas ou irritantes (BRASIL, 2003).

Portanto, é mister avaliar os riscos envolvidos no desenvolvimento de formulações cosméticas, para garantir aos usuários o uso seguro dessas formulações. Ensaios toxicológicos são utilizados para que se possa desenvolver com segurança um produto cosmético. No caso de formulações antissolares os

testes de fototoxicidade das substâncias presentes na fórmula torna-se imprescindível.

Existem testes *in vitro* e *in vivo* que podem ser realizados para avaliar o potencial irritante das formulações cosméticas, como HET-CAM, CAM-TBS e RBC que são métodos *in vitro* alternativos ao teste *in vivo* de irritação ocular em coelhos, chamado método Draize (WORTH & BALLS, 2001; LIEBSCH & SPIELMAN, 2002).

O método Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test (HET-CAM) é um método alternativo para avaliação do potencial irritante ocular que utiliza a membrana córion-alantóide (MCA) de ovo embrionado de galinha com a finalidade de avaliar o grau de irritação de mucosas induzido por substâncias químicas aceito pelas autoridades regulatórias como método usado no desenvolvimento de produtos cosméticos (WORTH & BALLS, 2001; LIEBSCH & SPIELMAN, 2002).

O método HET-CAM possui boa correlação com os resultados obtidos nos testes *in vivo* por permitir a avaliação imediata de fenômenos vasculares, como hiperemia, hemorragia e coagulação, e os fenômenos avaliados nos testes *in vivo* de irritação de mucosas estão relacionados diretamente ao surgimento de alterações vasculares. Seu uso como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos é estudado desde 1988 (WORTH & BALLS, 2001; LIEBSCH & SPIELMAN, 2002).

A avaliação da irritação ocular por HET-CAM apesar de ser rápida, barata e efetiva, ainda possui a lacuna de uma investigação mais precisa, objetiva e quantitativa do grau de irritação. Por isso o método foi modificado para o Chorioallantoic Membrane – trypan blue staining Test (CAM-TBS), com a intenção de fornecer dados mais objetivos e quantitativos para a avaliação da MCA, com o emprego da quantificação espectrofotométrica do corante azul de tripan (TBS) como indicador de danos à MCA. Ambos os testes mostram boa correlação com o método Draize (1944) para avaliação da irritabilidade ocular *in vivo* das formulações cosméticas avaliadas (ALVES *et al.*, 2008).

O método Red Blood Cell (RBC) investiga a lise em células vermelhas do sangue e tem sido proposto com um dos métodos alternativos para avaliar a irritabilidade ocular em formulações cosméticas como xampus, sabonetes, cremes hidratantes e protetores solares (ALVES *et al.*, 2008). Uma vez que este teste demonstra os fenômenos de hemólise, desnaturação de células e proteínas liberadas durante o processo induzidos por substâncias e produtos irritantes, baseado em mudanças na absorvância da oxi-hemoglobina, a qual funciona como



indicador de ambos os fenômenos. RBC é um método *in vitro* desenvolvido para fornecer uma indicação do dano possivelmente causado por formulações cosméticas na membrana celular e em proteínas.

A possível reação de irritação cutânea, caracterizada pela formação de edema e eritema que podem ser ocasionados por componentes da formulação cosmética a ser avaliada, pode ser mensurada com o emprego do teste de Draize modificado. (DRAIZE, 1944; INCQS/FIOCRUZ, 2008; SCOTT *et al.*, 2010).

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo geral:

Avaliar as atividades antioxidante e fotoprotetora dos extratos feitos a partir das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* e estudar a associação destes extratos aos filtros sintéticos: OMC, OCT e BZF-3 numa formulação antissolar.

### 4.2 Objetivos específicos:

- Selecionar entre os extratos preparados: extrato etanólico bruto (EtOH bruto) e frações hexânica (He), diclorometânica (DCM), acetato de etila (AcEt) e butanólica (1-But); extrato etanólico clarificado (EtOH CA) e extrato hidroacetônico (WAc), os mais adequados ao uso cosmético;
- Avaliar a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> e ORAC dos extratos selecionados das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis*;
- Formular fotoprotetores com os filtros sintéticos (OMC, OCT e BZF-3) associados aos extratos da planta em estudo avaliando o FPS e a estabilidade fotoquímica destas formulações;
- Avaliar a segurança toxicológica destas formulações por meio de ensaios de fototoxicidade *in vitro* e irritação dérmica primária *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar a eficácia das formulações antissolares através da determinação do FPS *in vivo* a seco.

## 5. Material e métodos

### 5.1. Coleta do material botânico

Cerca de 2,7 kg de folhas (Figura 15 a) e caules de *B. microstachya* var. *massambabensis* foram obtidos no Horto dos Departamentos de Botânica e Farmacognosia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no dia 15 de janeiro de 2009. Um exemplar dessa variedade encontra-se depositado no Herbário da UFRJ-IB sob o nº de registro RFA 30813 (RLeo 08 e RBMoura 238) (Figura 15 b).



Figura 15: Aspecto da folha de *B. microstachya* var. *massambabensis* no Horto da UFRJ (a), *Excicata* da planta sob o nº de registro RFA 30813 (RLeo 08 e RBMoura 238) (b). Fotos da autora.

### 5.2. Obtenção dos extratos

Extrato Etanólico bruto (EtOH bruto) - As folhas foram cuidadosamente separadas dos caules. Após secagem em estufa ventilada, à temperatura ambiente por 15 dias, e moagem das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* em moinho de facas tipo Wiley Marconi, modelo MA 340, obteve-se uma massa de 451 g de pó. Foram extraídos com etanol comercial, em percolador de aço inox até a

exaustão. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, eliminando-se o solvente por completo.

Extração líquido-líquido – Num béquer pesou-se 100 g de EtOH bruto e adicionou-se 250 mL de uma mistura de água e etanol (8:2). Na capela sob exaustão este extrato foi dividido em 2 funis de separação em porções iguais e sob agitação e decantação, foi particionado exaustivamente com hexano. A fração hexânica (He) foi filtrada em sulfato de sódio e posteriormente concentrada em evaporador rotatório. A partir daí, os mesmos procedimentos foram efetuados particionando sucessivamente o resíduo com os solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcEt) e 1-butanol (But).

Clarificação do extrato EtOH bruto com carvão ativado (EtOH CA) – Pesou-se 1 g de carvão ativado e adicionou-se uma solução do extrato EtOH bruto (1 g de carvão ativado: 1 g EtOH bruto :100 mL EtOH) num béquer levado ao aquecimento até a ebulição da solução. Filtrou-se e depois evaporou-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo uma massa de 1 g. Uma pequena quantidade foi feita para verificação da adequação do extrato ao uso cosmético e da permanência da atividade antioxidante após o tratamento.

Extrato Hidroacetônico (WAc) – O mesmo procedimento descrito para a obtenção do extrato etanólico foi realizado. Cerca de 145 g de pó das folhas *B. microstachya* var. *massambabensis*, foram extraídos numa mistura de acetona e água (7:3), em percolador de aço inox até a exaustão. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, para então ser liofilizado em liofilizador Labconco (modelo 75223, Kansas City, Missouri, USA).

O fluxograma a seguir exhibe resumidamente todos os procedimentos realizados para obtenção dos extratos das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* (Figura 16).

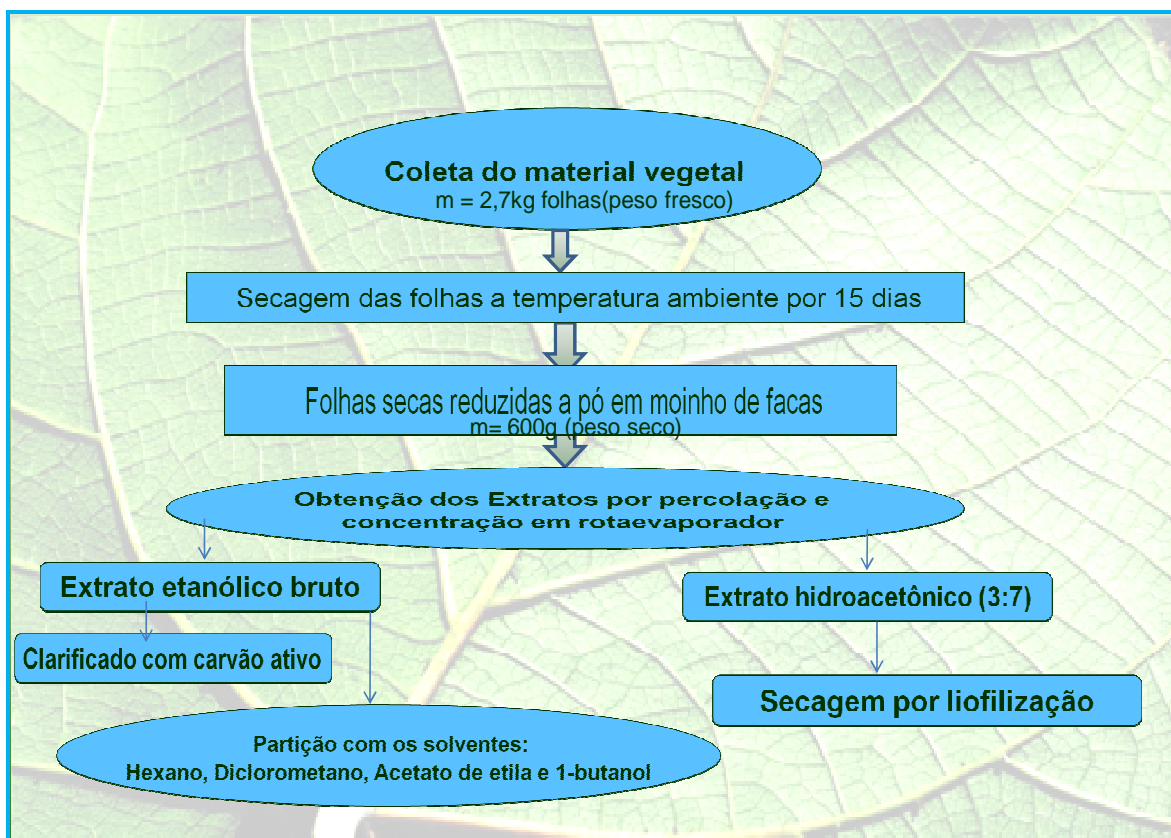


Figura 16: Fluxograma dos procedimentos para obtenção dos sete diferentes extratos das folhas de *B. microstachya var. massambabensis*.

Extrato etanólico bruto (EtOH bruto); Extrato Clarificado com carvão ativo (EtOH CA); Extrato hexânico (He); Extrato diclorometânico (DCM); Extrato particionado com acetato de etila (AcEt); Extrato butanólico (But) e extrato hidroacetônico (WAc).

### 5.3. Avaliação da atividade antioxidante

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Água destilada foi deionizada a menos de  $1,0\mu\text{S}$  e filtrada através de membrana com tamanho de poros  $0,22\mu\text{m}$  num sistema purificador de água anterior ao uso. Todos os tampões foram preparados no momento do uso.

#### 5.3.1 Ensaio DPPH<sup>\*</sup>

A atividade antioxidante foi realizada através da metodologia de captação do radical livre DPPH<sup>\*</sup> descrita Rufino *et al.* (2007), com modificações.

Foram preparadas soluções metanólicas de todos os extratos na concentração de  $1\text{ mg mL}^{-1}$  para posteriores diluições. Como controle positivo foi utilizado o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761<sup>®</sup>), comercialmente

Tebonin<sup>®</sup> (40 mg mL<sup>-1</sup> - solução oral), laboratório Nycomed. À 1 mL da solução metanólica do DPPH<sup>•</sup> 0,3 mM foram adicionados 2,5 mL de cada solução do extrato em análise, diluídas em concentrações seriadas de 1; 5; 10; 25; 50 e 125 µg mL<sup>-1</sup>. A reação transcorreu no escuro, à temperatura ambiente por uma hora e as absorvâncias foram lidas a 518 nm. Deste modo, foi possível avaliar a atividade antioxidante dos extratos da *Bauhinia*, usando como comparação o padrão EGb 761<sup>®</sup> nas mesmas concentrações descritas. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

Os percentuais da atividade antioxidante foram obtidos a seguinte fórmula:

Equação 1: Cálculo da CE<sub>50</sub> no ensaio de captação do DPPH<sup>•</sup>

$$AAT (\%) = 100 - (Abs_{AM} - Abs_{BR}) \times 100 / Abs_{CN}$$

Onde: Abs<sub>AM</sub> = absorvância da amostra (extrato + DPPH<sup>•</sup>);

Abs<sub>BR</sub> = absorvância do branco (metanol);

Abs<sub>CN</sub> = valor médio de absorvância encontrado para o controle negativo (DPPH<sup>•</sup> + metanol).

A partir dos dados, foram traçados os gráficos dos extratos e do padrão EGb, onde na abscissa encontra-se a concentração das amostras, em µg mL<sup>-1</sup> e, na ordenada, o percentual de atividade antioxidante total (% ATT) por redução do radical DPPH<sup>•</sup> calculado pelas médias das triplicatas.

A cinética da reação foi calculada por regressão linear, obtendo-se o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta (y = ax + b). O valor encontrado para a CE<sub>50</sub> representa a concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado (MENSOR *et al.*, 2001).

Este método foi utilizado como um *screening* para a seleção dos extratos a serem testados nos outros dois métodos.

### 5.3.2 Ensaio ABTS

A avaliação da atividade antioxidante, pelo método ABTS foi realizada conforme a metodologia descrita por Re *et al.*(1999), com modificações.

Neste ensaio foram testados os extratos: EtOH bruto, EtOH CA, AcEt e WAc frente ao Trolox<sup>®</sup> e ao EGb 761<sup>®</sup>.

O radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado através da reação de 5,0 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) e 88 µl de solução de persulfato de potássio a 140 mM. A mistura permaneceu no escuro por 16 h e após esse tempo diluída em etanol P.A., para obtenção da absorbância de  $0,7 \pm 0,05$  com leitura a 734 nm em espectrofotômetro (UV mini 1240, UV-vis Spectrophotometers, Shimadzu do Brasil).

Para determinação da curva-analítica do Trolox<sup>®</sup> foram realizadas leituras de cada solução a 200, 600, 1000 e 2000 µM equivalentes às concentrações de 50, 150, 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup> para a construção do gráfico, cálculo da equação da reta e dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e de correlação ( $r$ ).

Uma alíquota de 30 µl dos extratos selecionados EtOH bruto, EtOHCA, AcEt e WAc foram ressuspendidos em etanol nas concentrações de 125; 350 e 500 µg mL<sup>-1</sup> e do EGb 761<sup>®</sup> nas concentrações de 125, 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup>, comparando-os com a substância de referência Trolox<sup>®</sup> nas concentrações de 125, 250 e 375 µg mL<sup>-1</sup>. Estas alíquotas reagiram com 3 mL da solução resultante do radical verde-azulada escura ABTS<sup>•+</sup>, sem a presença da luz.

O decréscimo da absorbância a 734 nm foi medido durante um período de monitoramento de 6 minutos (0, 15, 30 a 360 segundos) nestes diferentes intervalos de tempo para cada amostra. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

Para cada extrato foram plotados gráficos absorbância em unidades arbitrárias (U.A.) versus concentração do extrato em (µg mL<sup>-1</sup>) onde determinou-se a equação da reta (equação 2) a seguir:

Equação 2: Cálculo da massa do extrato correspondente a 1000 µM de Trolox<sup>®</sup>

$$Y = ax + b$$

Onde:

Y = absorbância correspondente a 1000 µM de Trolox<sup>®</sup>;

x = massa do extrato (µg mL<sup>-1</sup>) equivalente a 1000 µM de Trolox<sup>®</sup>.

A atividade antioxidante total (AAT) foi calculada substituindo-se o Y da equação da reta acima pela absorbância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup>.

O resultado final foi expresso em  $\mu\text{M}$  Trolox<sup>®</sup> *per g* de extrato, substituindo o x encontrado na equação 3, abaixo:

Equação 3: Cálculo final da AAT equivalente a  $\mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup> *per g* de extrato

$$Z(\text{g}) = 1000/x$$

Para exibir os gráficos das curvas cinéticas dos extratos e padrões analisados neste método utilizou-se a concentração final encontrada na cubeta para cada amostra: os extratos EtOH bruto, EtOHCA, AcEt e WAc nas concentrações de 1,25; 3,50 e 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; EGb 761<sup>®</sup> nas concentrações de 1,25; 2,50 e 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , comparando-os com a substância de referência Trolox<sup>®</sup> nas concentrações de 1,25; 2,50 e 3,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.3.3 Ensaio ORAC (Capacidade de absorbância do radical oxigênio)

A análise da capacidade antioxidante, pelo método ORAC foi realizada conforme a metodologia descrita por Ou *et al.*(2001), com modificações.

Para a realização das análises, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de cada extrato, 100  $\mu\text{L}$  de FL (1 nM), 180  $\mu\text{L}$  de AAPH (221 mM) e 700  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de sódio monobásico (75mM; pH=7,4) na temperatura de 37<sup>o</sup> C numa cubeta de quartzo de 1mL. As leituras foram realizadas imediatamente, num espectrofluorímetro Cary Eclipse da marca Varian (Agilent Technologies, CA, USA). A fluorescência das amostras ( $\lambda_{\text{excitação}}$ : 480 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$ : 515 nm) foi determinada a cada 1 minuto, durante 30 minutos, até que caísse a zero ou a um valor inferior a 5% do valor inicial. Como padrão, foi utilizado o Trolox<sup>®</sup> a uma concentração de 1 mM, e como branco uma solução tampão nas mesmas condições descritas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O valor de ORAC relativo foi calculado através da seguinte equação 4:



Equação 4: Cálculo final do valor ORAC relativo em equivalentes ao Trolox<sup>®</sup> per g de extrato

$$\text{Valor ORAC relativo } (\mu\text{M/g}) = [(S \text{ extrato} - S \text{ branco}) / (S \text{ Trolox}^{\text{®}} - S \text{ branco})] \times [(M \text{ Trolox}^{\text{®}} / \text{Cf extr})]$$

S = área sob a curva de decréscimo da fluorescência do extrato, do Trolox<sup>®</sup> e do branco.

M Trolox<sup>®</sup> = molaridade do Trolox<sup>®</sup>.

Cf extr = concentração final do extrato na cubeta.

A área sob a curva calcula-se com a seguinte fórmula:

$$S = (1 + f_1 / f_0 + f_2 / f_0 + f_3 / f_0 + \dots + f_{30} / f_0)$$

f<sub>0</sub>: fluorescência inicial no tempo zero

f<sub>i</sub>: fluorescência medida no tempo i (minutos)

Os resultados finais foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup> per g de extrato.

#### 5.4 Desenvolvimento das formulações antissolares

As formulações desenvolvidas e selecionadas para todos os testes de segurança e eficácia foram denominadas: LADEG LOÇÃO CREMOSA PURA (LC), LADEG LOÇÃO CREMOSA FPS 15 (LC + FS), LADEG EtOH CA a 1% (LC + FPS 15 + EtOH CA a 1%) e LADEG WAc a 1% (LC + FPS 15 + WAc a 1%).

O creme base denominado LADEG LOÇÃO CREMOSA (LC), constitui-se numa formulação branca, de odor característico, com valor de pH entre 5,5 e 6,5, oriunda de duas fases, uma aquosa e outra oleosa, com agentes emulsificantes que permitem a interação destas. Esta formulação foi preparada para a verificação da absorção no UV dos extratos em análise. Nesta fórmula foi feita uma associação dos três filtros solares: OMC, OCT e BZF-3. A LC com os filtros passou a ser denominada: LADEG LOÇÃO CREMOSA FPS 15. O FPS esperado é cerca de 15, já que 5% de cada um destes filtros consta na fórmula. Essa formulação foi preparada objetivando a comparação com as outras três formulações: LC, LADEG

EtOH CA a 1% e LADEG WAc a 1%. A composição e as concentrações dos componentes das quatro diferentes formulações estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Composição das formulações antissolares desenvolvidas no LADEG.

<b>Composição</b>	<b>LADEG LOÇÃO CREMOSA PURA</b>	<b>LADEG LOÇÃO CREMOSA FPS 15</b>	<b>LADEG FPS 15 EtOH CA a 1%</b>	<b>LADEG FPS 15 WAc a 1%</b>
<b><u>Fase Oleosa</u></b>				
BZF-3	-	5 g	5 g	5 g
OCT	-	5 g	5 g	5 g
OMC	-	5 g	5 g	5 g
Álcool cetoestearílico etoxilado	3 g	3 g	3 g	3 g
Ácido esteárico	8 g	8 g	8 g	8 g
Estearato de isocila	7 g	7 g	7 g	7 g
Monoestearato de glicerila	3 g	3 g	3 g	3 g
Propilparabeno	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Silicone DC 3225	9,5 g	9,5 g	9,5 g	9,5 g
Silicone DC 245	11 g	11 g	11 g	11 g
<b><u>Fase Aquosa</u></b>				
Aminometilpropanol 95%	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Glicerina	5 g	5 g	5 g	5 g
Imidazolidinil uréia	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Metilparabeno	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Structure XL®	1 g	1 g	1 g	1 g
<b>Extrato EtOH CA</b>			1 g	
<b>Extrato WAc</b>				1 g
Água purificada	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g

Os componentes da fase oleosa e da fase aquosa foram acuradamente pesados e aquecidos separadamente a 70 °C em canecos de aço inox. A fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa, sob lenta agitação até completa homogeneização. A esta emulsão sem nenhuma adição de ativos denominou-se LADEG LC. Esta emulsão adicionada, na fase de resfriamento dos filtros OMC, OCT e BZF-3 denominou-se LADEG LC FPS 15.

Os extratos das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* EtOH CA e WAc foram incorporados em três diferentes concentrações (0,5; 1 e 2 %), para avaliação do aspecto visual e sensorial, e da escolha das formulações produzidas. As formulações selecionadas para os testes de eficácia e segurança foram: LADEG EtOH CA a 1 % e LADEG WAc a 1 %.

#### 5.4.1 Determinação do FPS *in vitro* pelo método de Mansur (1986) no LADEG

Para determinar o FPS *in vitro* foi empregado o método Mansur (MANSUR, 1986), por ser eficaz e rápido, além de ter uma boa correlação com resultados encontrados *in vivo*, além de estar amplamente descrito na literatura (CHIAVEGATTO *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1992).

Foram preparadas soluções com concentração final de 0,2 µg mL<sup>-1</sup> de cada formulação em etanol preconizadas pelo método Mansur. Essas soluções foram então submetidas à leitura em espectrofotômetro, para a determinação das absorvâncias na faixa de comprimento de onda de 290 a 320 nm, sendo a absorvância lida a cada 5 nm (Tabela 3). A seguir, foi utilizada a equação matemática (Equação 5) que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação (EE x I) descritos na Tabela 3 (MANSUR *et al.*, 1986; SANTOS *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2001; MONTEIRO, 2008).

Equação 5: Cálculo do FPS *in vitro* por espectrofotometria por absorvância no UV pelo método de Mansur (MANSUR *et al.*, 1986).

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

Onde:

FC é o fator de correção (FC = 10);

EE ( $\lambda$ ) é o efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ );

I ( $\lambda$ ) é a intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ );

abs ( $\lambda$ ) é a leitura espectrofotométrica da absorbância da solução no comprimento de onda relacionado.

Tabela 3: Relação entre intensidade da radiação e o efeito eritematogênico em cada comprimento de onda (MANSUR *et al.*, 1986).

$\lambda$ (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

### 5.5 Análise fototóxica *in vitro* em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*

Os testes de fototoxicidade são realizados por exposição das diversas amostras à radiação UVA e ao escuro, em cultura de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Este microorganismo apresenta bom crescimento à temperatura ambiente apresentando uma camada bem espessa de células, não é patogênico nem sensível a radiação UVA entre 320 e 390 nm, além de ser inócuo. (RAMOS *et al.* 2005; FREITAS *et al.*,2000).

Neste teste, a resposta fototóxica é avaliada pela presença de halo de inibição frente à radiação UVA. O 8-metoxipsoraleno (8-MOP) em solução clorofórmica a 0,1 % é responsável por esta resposta.

O meio utilizado para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o YPD (FREITAS, 2000), constituído por:

Extrato de levedo	1%
Glicose	2%
Peptona	2%
Ágar	2%
Água Purificada q.s.	100%

Todo o material foi cuidadosamente autoclavado: placas de Petri, pinças, ponteiros, discos de papel, pérolas de vidro. Em cada placa foram colocados aproximadamente 30 mL do meio YPD. As placas de Petri com 10 cm de diâmetro foram semeadas com as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* no meio YPD.

Os discos de papel Whatmann nº 1 com 6 mm de diâmetro ficaram equidistantes na placa 2 cm da borda da placa, 3,2 cm de altura e 4,5 cm de distância no comprimento entre eles (Figura 17).

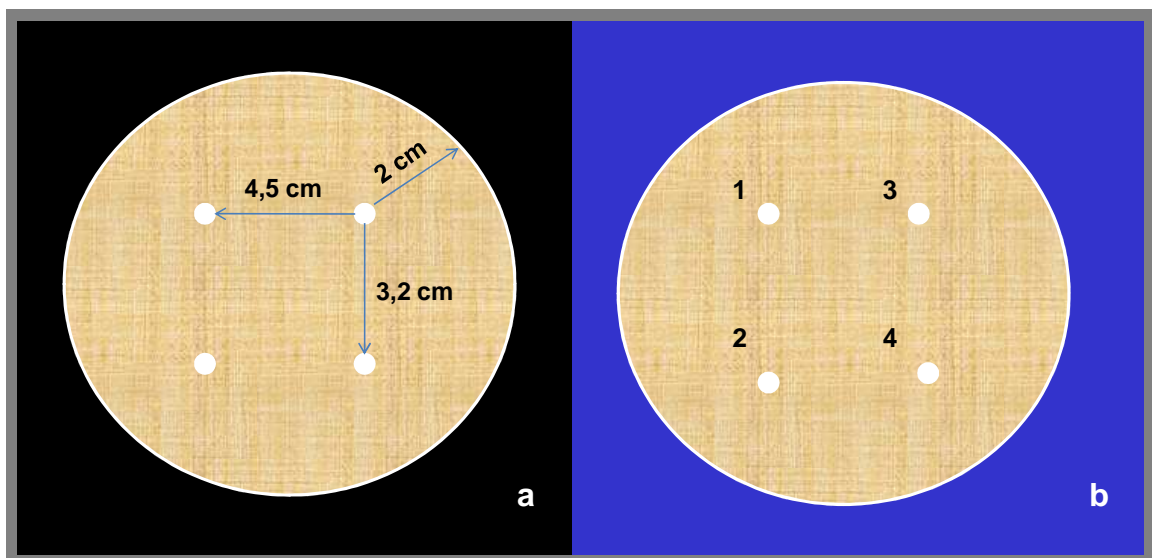


Figura 17: Esquema representativo do teste de fototoxicidade, placas no escuro (a) e sob iluminação UVA (b) por 48 horas.

Cada disco foi embebido em 10 µg das amostras seguintes:

- Loção cremosa pura (LC)
- Loção cremosa + filtros (LC + FS)
- Loção cremosa + filtros + WAc (LC + FS + WAc a 1%)
- Loção cremosa + filtros + EtOH CA (LC + FS + EtOH CA a 1%)
- WAc a 1% em tampão fosfato de sódio (75mM; pH = 7,4) (WAc)
- EtOH CA a 1% em tampão fosfato de sódio (75mM; pH = 7,4) (EtOH CA)
- Os três filtros: OMC, OCT e BZF-3 (FS)
- Controle negativo: clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>)
- Controle positivo: 8-metoxipsoraleno (8-MOP) em solução clorofórmica a 1%

Em cada experimento foram preparadas doze placas com controle positivo, controle negativo e diferentes extratos/formulações.

As doze placas correspondentes às letras de A a F foram semeadas previamente. Seis foram submetidas à radiação UVA e as outras seis permaneceram no escuro com as mesmas amostras, ambas por 48 horas a uma temperatura ambiente de 28 °C (Figura 17). Após este tempo, as placas foram observadas para verificação da presença ou não do halo de inibição.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

## **5.6 Segurança das Formulações Antissolares – Avaliação do potencial irritante**

### **5.6.1 Testes de irritabilidade ocular *in vitro* – Teste em membrana corion-alantóide de ovos de galinha (HET-CAM).**

A metodologia utilizada foi baseada no método oficial de avaliação do potencial irritante descrito no *Journal Officiel de La Republique Française – Arreté du 29 Novembre 1996*.

Aplicou-se a formulação sobre a membrana corion-alantóide (MCA) do ovo de galinha, no décimo dia de incubação, e observou-se a presença ou não de efeitos irritantes como hiperemia, hemorragia e coagulação ou opacidade. Para cada formulação foram utilizados 4 ovos fertilizados de galinha da raça Leghorn, com

peso entre 50 e 60 gramas. Foram utilizados 4 ovos como controle, sobre os quais nenhuma substância foi adicionada.

Os ovos foram adquiridos na granja Resende e inspecionados visualmente, descartando-se os que apresentaram alguma lesão na casca, os demais ovos foram pesados, identificados e incubados por 10 dias a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  com umidade relativa de aproximadamente 70 % (Figura 18 a). Após esse procedimento, os ovos foram colocados em posição vertical, sobre um suporte, com a câmara de ar voltada para cima, a casca foi retirada com o auxílio de um disco de lixa num motor de baixa rotação odontológico, o que expôs a membrana da casca, a qual foi umidificada com solução salina a 0,9 % à  $37^{\circ}\text{C}$  (Figura 18 b, c, d). Com o auxílio de uma pinça, a membrana da casca foi removida (Figura 18 e). Ao realizar esse procedimento, expôs-se a MCA que foi observada quanto a quaisquer alterações, que implicariam o descarte do ovo. Aplicou-se sobre a MCA 300  $\mu\text{L}$  da formulação, não diluída e mantida à  $37^{\circ}\text{C}$ , após 20 segundos de contato lavou-se com 5 mL de solução salina à  $37^{\circ}\text{C}$ , para a retirada da formulação (Figura 18 f, g). A análise visual da MCA foi realizada com o auxílio de uma lupa (Figura 18 h). Após análise visual foi injetada solução de tiopental nos ovos fertilizados (Figura 18 i). As etapas descritas estão em sequência na Figura 18 de (a) a (i).

A graduação foi determinada no período de 5 minutos, conforme a escala descrita na Tabela 4. Os fenômenos irritantes observados foram graduados em valores numéricos (1, 3, 5, 7 e 9) dependentes do tempo.

Tabela 4: Graduação dos fenômenos irritantes determinados por tempo.

<b>Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência</b>			
<b>Fenômeno</b>	<b>Menos de 30 segundos</b>	<b>Entre 30 e 60 segundos</b>	<b>Entre 60 e 300 segundos</b>
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5



Figura 18: Ensaio de irritabilidade ocular *in vitro* HET-CAM (a) a (i). Fotos da autora.

A classificação de cada formulação foi obtida com a média dos valores de graduação dos 4 ovos, o grau de irritação foi dividido em quatro categorias, descritas na Tabela 5. Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada formulação.



Tabela 5: Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas.

<b>Média dos valores de graduação dos fenômenos irritantes</b>	<b>Classificação Final do grau de irritação das formulações avaliadas</b>
0,0 a 0,99	Não irritante (NI)
1,0 a 4,99	Irritante leve (IL)
5,0 a 8,99	Irritante moderado (IM)
9,0 a 21	Irritante severo (IS)

### **5.6.2 Testes de irritabilidade ocular *in vitro* – Teste em membrana corion-alantóide (MCA) de ovos de galinha com o corante azul de tripan (CAM-TBS)**

A metodologia utilizada foi baseada no método de avaliação do potencial irritante descrito no Protocolo número 108 de INVITOX (INVITOX, 1996; LAGARTO *et al.*, 2006).

O procedimento descrito no item 5.6.1 foi seguido até a etapa de retirada da membrana da casca, Figura 18 (e). Após essa etapa, houve a adição de um anel de silicone, que permitiu a formação de uma área exposta de 18 mm de diâmetro para evitar variabilidade na avaliação (Figura 19 a). Posteriormente aplicou-se sobre a área exposta da MCA, 300 µL da formulação a ser avaliada, esperou-se 20 segundos, retirou-se a formulação com água purificada, em seguida foi aplicado o volume de 500 µL de uma solução aquosa de tampão fosfato salino pH 7,4 (TF), com 0,1% de TBS sobre a mesma MCA (Figura 19 b, c, d, e). Após 1 minuto, retirou-se o excesso de TBS com água purificada (Figura 19 f, g, h). A parte exposta da MCA foi então extraída com o uso de uma tesoura e armazenada em 5 mL de formamida e agitada (Figura 19 i, j, l, m, n). As etapas descritas estão em sequência na Figura 19 de (a) a (n).

Essa solução foi então centrifugada a 12096 x g (10000 rpm) durante 1 minuto, para sedimentar o material particulado, o sobrenadante foi então quantificado em espectrofotômetro, indicando a concentração de corante absorvida no comprimento de onda determinado (595 nm), que corresponde ao dano à MCA, podendo correlacionar esse dado com o grau de irritação ocular *in vitro* da

formulação em teste. A concentração de TBS absorvido foi determinada por curva de calibração de três concentrações em triplicata do TBS em formamida. A classificação de cada formulação foi obtida com a média dos valores de absorbância do TBS dos 4 ovos.



Figura 19: Ensaio de irritabilidade ocular *in vitro* CAM-TBS (a) a (n). Fotos da autora.

Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada formulação e comparados com os valores do material controle com o auxílio da equação 6 (LAGARTO *et al.*, 2006).

Equação 6: Cálculo da concentração de TBS absorvida (LAGARTO *et al.*, 1986)

$$\text{TBS absorvida} = d \times \frac{5}{1000} \times 10^9 \text{ nmol}$$

### 5.6.3 Testes de hemólise e desnaturação *in vitro* (RBC)

Amostras de sangue de carneiro, obtidas diretamente do abatedouro, foram centrifugadas a 15000 x g (11136 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente. Aspirou-se o sobrenadante (plasma), o restante foi lavado por quatro vezes com solução isotônica pH 7,4 (TF) a fim de remover células sanguíneas brancas que possam ter restado e quaisquer vestígios de plasma, restando assim apenas as células vermelhas do sangue (Red Blood Cell).

Suspensões de RBC foram produzidas contendo cerca de  $8 \times 10^9$  células/mL, as quais correspondem a concentração final de oxi-hemoglobina de 0,125 mmol/L, das quais alíquotou-se 25  $\mu$ L em frascos (Eppendorfs) com capacidade de volume de 1,5 mL, aos quais foram adicionados as formulações antissolares em diferentes concentrações. O controle negativo foi composto por 25  $\mu$ L da suspensão de RBC, adicionado a 975  $\mu$ L de TF, o que implica que não há hemólise, enquanto que o controle positivo foi composto por 25  $\mu$ L de suspensão de RBC adicionado a 975  $\mu$ L de água purificada, que gera um valor de 100 % de hemólise (Tabela 6).

Tabela 6: Diferentes concentrações para a análise de hemólise e desnaturação.

<b>Amostra</b>	<b>Formulação antissolar 0,1%</b>	<b>Solução isotônica pH 7,4 (TF)</b>	<b>Suspensão de RBC (<math>8 \times 10^9</math> células/mL)</b>
Controle negativo	-	975 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 1	10 $\mu$ L	965 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 2	20 $\mu$ L	955 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 3	30 $\mu$ L	945 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 4	40 $\mu$ L	935 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 5	50 $\mu$ L	925 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 6	60 $\mu$ L	915 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 7	70 $\mu$ L	905 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Amostra 8	80 $\mu$ L	895 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Controle positivo	975 $\mu$ L (Água purificada)	-	25 $\mu$ L
Desnaturação	975 $\mu$ L (SDS a 3,47 mmol/L)	-	25 $\mu$ L

As soluções resultantes foram incubadas por 10 minutos sob agitação, em agitador orbital, à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada centrifugação durante 1 minuto, a qual removeu células intactas e resquícios do meio. O sobrenadante foi analisado por espectrofotometria de absorvância em 540 e 575 nm em espectrofotômetro de duplo feixe UV/VIS, comparado a um branco de TF puro. As etapas descritas estão em sequência na Figura 20 de (a) a (f).



Figura 20: Testes de hemólise e desnaturação *in vitro* (RBC) (a) a (f). Fotos da autora.

Assim, obteve-se a razão das absorvâncias medidas em cada comprimento de onda (R1). Essa razão foi usada posteriormente para caracterizar o índice de desnaturação das hemoglobinas (ID), o qual é calculado por porcentagem. Um padrão para 100 % de desnaturação é obtido com o emprego de dodecil sulfato de sódio (SDS) a uma concentração de  $3,47 \text{ mmol L}^{-1}$  (razão R2). Compara-se com a

razão obtida com a amostra em estudo ( $R_i$ ). O potencial de desnaturação é obtido com o emprego da Equação 7.

Equação 7: Cálculo do potencial de desnaturação de hemoglobinas

$$\text{ID (\%)} = 100 \times \frac{(R_1 - R_i)}{(R_1 - R_2)}$$

O ID obtido foi então analisado, e o resultado obtido correlacionou-se com o possível efeito *in vivo* (Tabela 7).

Tabela 7: Correlação do ID com o possível efeito de irritação ocular *in vivo*.

<b>Índice de Desnaturação</b>	<b>Grau de irritação ocular <i>in vivo</i></b>
> 100	Não irritante
> 10	Levemente irritante
> 1	Irritante moderado
> 0,1	Irritante
< 0,1	Irritante severo

#### 5.6.4 Testes de irritação cutânea primária *in vivo* (DRAIZE)

A avaliação do potencial irritante dos produtos desenvolvidos foi realizada mediante a observação e quantificação das reações cutâneas após a aplicação destes sobre a pele de seis coelhos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, hípidos e de peso corpóreo acima de 2,0 kg, para cada formulação antissolar desenvolvida.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura constante ( $20 \pm 2$  °C) e umidade relativa entre 30 e 70 %. Foi realizada tricotomia de duas áreas de 6,25 cm<sup>2</sup> na região dorsal 24 horas antes do início do



ensaio, uma das áreas serviu de controle, na qual não se aplicou nenhum tipo de solução, a qual facilitou a comparação com a área-teste. As peles da área-teste e da área-controle foram medidas com o auxílio de um paquímetro, por dobradura longitudinal (leitura inicial – Li), 3000  $\mu$ L de cada formulação antissolar foram então aplicados sobre as áreas-teste (Figura 21 a, b, c, d). Após a aplicação, as áreas-teste foram cobertas com gazes, e o produto foi deixado em contato por 4 horas (Figura 21 f, g, h, i, j). Após esse período, retirou-se a gaze, e os possíveis resíduos das formulações foram removidos com algodão embebido em água purificada (Figura 21 l). Foram efetuadas leituras 24 e 72 horas após a retirada do produto ( $L_{24}$  e  $L_{72}$ ) nas áreas-teste com o paquímetro (Figura 21 m).



Figura 21: Ensaio de irritação cutânea primária *in vivo* (DRAIZE) (a) a (m). Fotos da autora.

Avaliou-se a possível formação de edema (Ed(mm)) com o emprego da Equação 8, e o resultado obtido correlacionou-se com o possível efeito *in vivo* (Tabela 8).

Equação 8: Cálculo do edema na pele dos animais testados

$$Ed(mm) = \frac{L_{24} - L_i}{2} \text{ e } \frac{L_{72} - L_i}{2}$$

Onde Ed (mm) é a medida do aumento da espessura da pele obtido em milímetros (mm), Li é a leitura inicial realizada com paquímetro, e L24 e L72 as leituras realizadas após 24 e 72 horas, respectivamente.

Tabela 8: Graduação do edema na pele dos animais testados.

Medida do aumento da espessura da pele (mm)			Graduação do edema	Grau considerado
0	a	0,24	Nenhum	0
0,25	a	0,49	Muito leve	1
0,50	a	0,74	Leve	2
0,75	a	1,00	Moderado	3
		> 1,00	Severo	4

Avaliou-se a possível formação de eritema baseando-se na Tabela 9.



Tabela 9: Graduação do eritema na pele dos animais testados.

<b>Descrição da pele</b>	<b>Graduação do eritema</b>	<b>Grau Considerado</b>
Coloração branca a rósea	Nenhum	0
Ligeiramente avermelhada, diferente da área controle	Leve	1
Vermelha, geralmente em toda a área	Bem definido	2
Vermelhidão intensa e difusa	Moderado	3
Vermelha escura, com leve formação de escara	Severo	4

E obteve-se a média aritmética das leituras efetuadas nos períodos de 24 e 72 horas. O índice de irritação cutânea primária (ICP) é igual à metade do somatório das médias obtidas. A classificação do ICP é dada na Tabela 10.

Tabela 10: Classificação do índice de irritação cutânea primária (ICP) dos animais testados.

<b>ICP</b>	<b>Classificação</b>
0 a 0,9	Não irritante
1 a 1,9	Ligeiramente irritante
2 a 4,9	Moderadamente irritante
5 a 8,0	Irritante severo

A formulação em análise é considerada satisfatória caso os resultados fiquem compreendidos entre 0 e 1,9 (não irritante ou ligeiramente irritante) (DRAIZE, 1944; INCQS/FIOCRUZ, 2008).

Para realização destes testes foi emitido o protocolo de nº 79/09-1 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz.

## 5.7 Eficácia das Formulações Antissolares

A eficácia de formulações antissolares foi determinada avaliando a proteção gerada pelas formulações antissolares frente à queimadura em pele humana. Nesse caso, avalia-se o FPS, o qual é definido pela razão de tempo de exposição à radiação ultravioleta necessário para produzir dose mínima eritematosa (DME) em pele humana protegida com aplicação de 2 mg/cm<sup>2</sup> de cada formulação antissolar pelo tempo necessário para o aparecimento do mesmo eritema em pele humana desprotegida. A metodologia é empregada a seco, em voluntários sadios com diferentes tipos de pele, de ambos os sexos com sensibilidade mediana à radiação ultravioleta (ANVISA, 2006; MONTEIRO, 2008). Testes de FPS *in vitro* são empregados preliminarmente para se avaliar um resultado estimado de FPS *in vivo*.

Avaliou-se a eficácia das formulações frente a danos causados pela radiação UVA, com a avaliação do fator de proteção frente à radiação UVA (UVA-FP) *in vitro*, o qual foi obtido relacionando-se ao método de avaliação do potencial de pigmentação persistente (PPD), previamente validado *in vivo*.

### 5.7.1 Eficácia das formulações: Ensaios para determinação do FPS (Allergisa)

#### 5.7.1.1 Espectroscopia de transmitância com esfera de integração e determinação do Fator de Proteção UVA (FP-UVA) *in vitro* Labsphere®

Os testes de FPS *in vitro* por espectroscopia de transmitância com esfera de integração foram desenvolvidos com o uso de suportes de 25 cm<sup>2</sup> de polimetilmetacrilato (PMMA) sobre os quais as formulações antissolares foram depositadas e uniformemente espalhadas, com a aplicação de 0,75 mg/cm<sup>2</sup>. A aplicação foi realizada com o uso de micropipeta, sobre balança analítica, e o espalhamento foi realizado com dedeira de látex, em movimentos sutis de forma a obter camadas uniformes. Após 15 minutos sob proteção de luz, as amostras foram diretamente levadas ao simulador ultravioleta e foram realizadas medições dos valores de FPS. Inicialmente foi obtido um espectro do suporte tratado previamente com glicerina, para ser utilizado como referência de 100 % de transmitância. O valor do FPS *in vitro* foi obtido a partir da medida da absorbância e da transmitância difusa, com o emprego da Equação 9. O experimento foi realizado em triplicata.

Equação 9: Cálculo do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* por espectroscopia de transmitância com esfera de integração Labsphere®

$$FPS_{in\ vitro} = \frac{\sum_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda) \times I(\lambda)}{\sum_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A_0(\lambda)}}$$

Onde  $E(\lambda)$  é o espectro de ação eritematosa,  $I(\lambda)$  é a irradiância espectral simulada na faixa UV e  $A_0(\lambda)$  é absorvância monocromática média de cada formulação, antes da exposição à RUV; obtidos no comprimento de onda  $\lambda$  (DIFFEY, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em seguida determinou-se o coeficiente de ajuste (C) para igualar o valor de FPS *in vitro* ao valor obtido no teste *in vivo*. O coeficiente (C) foi calculado para satisfazer a condição descrita na Equação 10.

Equação 10: Cálculo do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* e *in vivo*

$$FPS_{in\ vitro, aj.} = \frac{\sum_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda) \times I(\lambda)}{\sum_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A_0(\lambda) \times C}} = FPS_{in\ vivo}$$

O valor do FP-UVA *in vitro* foi obtido com o emprego da Equação 11.

Equação 11: Cálculo do Fator de Proteção UVA (FP-UVA) *in vitro*

$$FPUVA_0 = \frac{\sum_{\lambda=320}^{\lambda=400} P(\lambda) \times I(\lambda)}{\sum_{\lambda=320}^{\lambda=400} P(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A_0(\lambda) \times C}}$$

Onde  $P(\lambda)$  é o espectro de ação de pigmentação persistente,  $I(\lambda)$  irradiância espectral simulada na faixa UVA, e  $A_0(\lambda)$  a absorvância monocromática média de cada formulação antes da exposição à RUV; obtidos no comprimento de onda  $\lambda$ .

#### 5.7.1.1.1 Irradiação UV da amostra

As placas de PMMA com as amostras foram expostas a uma dose controlada de RUV em irradiador UV equipado com filtro UV Special Glass<sup>®</sup>, de modo a submeter o produto à condições próximas as do uso real e em temperaturas inferiores a 40 °C. A amostra foi exposta a radiação nas faixas das radiações UVA, UVB e VIS, sendo a dose calculada de modo a fornecer uma quantidade de energia (D) na faixa UVA calculada com o emprego da Equação 12.

Equação 12: Cálculo da Quantidade de Energia na Faixa UVA

$$D = FPUVA_0 \times D_0$$

Onde  $D_0$  é a dose de 1,2 J/cm<sup>2</sup> de UVA.

#### 5.7.1.1.2 Determinação do FP-UVA *in vitro* após a exposição à RUV

Após a irradiação das formulações, os valores de FPS *in vitro* e FP-UVA *in vitro* foram obtidos com o mesmo procedimento descrito no item 5.7.1.1.1, porém com o emprego da Equação 13 para o cálculo do valor de FPS *in vitro*.

Equação 13: Cálculo do FP-UVA *in vitro* após exposição à RUV

$$FPUVA = \frac{\sum_{\lambda=320}^{\lambda=400} P(\lambda) \times I(\lambda)}{\sum_{\lambda=320}^{\lambda=400} P(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A(\lambda) \times C}}$$

Onde  $A(\lambda)$  é a absorvância monocromática média do produto após a irradiação UV.

### 5.7.1.1.3 Determinação do Comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ )

O comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) foi determinado à partir dos espectros após a irradiação UV. O  $\lambda_c$  é outra medida da capacidade de proteção UVA do produto, definido como o menor comprimento de onda em que a absorção do produto é igual a 90% da absorção total, de acordo com a Equação 14.

Equação 14: Cálculo do Comprimento de Onda Crítico ( $\lambda$ )

$$\frac{\sum_{\lambda=290}^{\lambda=\lambda_c} A(\lambda)}{\sum_{\lambda=400} A(\lambda)} = 0,9$$

### 5.7.1.1.4 Determinação da Razão FPS/FP-UVA

Calculou-se a razão FPS/FP-UVA à partir do valor de FPS *in vivo*.

### 5.7.1.1.5 Determinação do FPS *in vivo a seco*

Os ensaios para a determinação do FPS *in vivo a seco* das três formulações desenvolvidas (LADEG LC + FS, LADEG + FPS 15 + EtOH CA 1% e LADEG + FPS 15 + WAc 1%) foram realizados com base no protocolo da associação europeia The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA, 2007). Utilizou-se um simulador ultravioleta “multiport” para avaliar 10 voluntários sadios do sexo feminino com tipos de pele I, II, III, (Tabela 1 item 2.1) e idades entre 18 e 59 anos. Uma área de 0,3 m x 0,3 m foi demarcada nas costas de cada voluntário (Figura 22). Essa área foi dividida em áreas menores quadriculadas, uma delas foi utilizada para a determinação da dose mínima eritematosa (DME) na pele não tratada. Após 16 a 24 horas, aplicou-se em um quadrado, de maneira uniforme e com o auxílio de uma dedeira, 0,05 g (2 mg/cm<sup>2</sup>) de uma formulação padrão (controle) contendo os filtros solares descritos na Tabela 11 e no quadrado adjacente aplicou-se uma das formulações a serem testadas; este foi subdividido em sub-áreas de

aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para definir a exposição em série à radiação ultravioleta. Após 20 minutos da aplicação do produto, iniciou-se a irradiação com uma lâmpada UV de 300 watts.

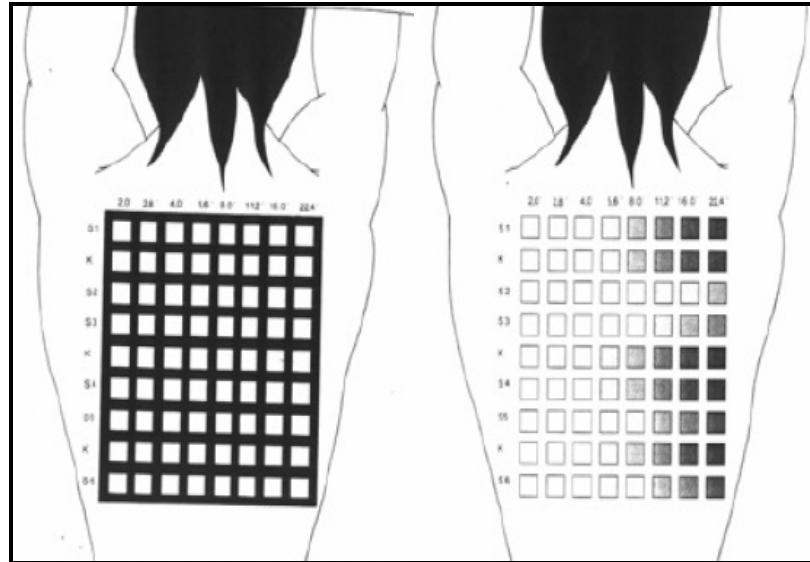


Figura 22: Esquema da área demarcada nas costas dos voluntários para os ensaios de FPS *in vivo* (SHAATH, 1997; MONTEIRO, 2008)

Cada local tratado possuiu um tempo de exposição, baseado na DME de cada indivíduo e nos valores de FPS previstos da formulação padrão e da formulação a ser testada. A pele testada foi avaliada entre 16 e 24 horas após a exposição, para determinar a resposta eritematosa mínima. As amostras utilizadas, neste ensaio, foram as mesmas utilizadas para a determinação do FPS *in vitro*. Os ensaios foram realizados para cada uma das três formulações desenvolvidas, separadamente.

Tabela 11: Descrição dos componentes da formulação padrão utilizadas nos ensaios de FPS *in vivo*.

Composição	Concentração (g)
FASE I	
Lanolina	4,5
Manteiga de cacau	2,0
Monoestearato de Glicerila SE	3,0
Ácido esteárico	2,0
Octil dimetil PABA	7,0
Benzofenona-3	3,0
FASE II	
Água	71,6
Sorbitol	5,0
Trietanolamina	1,0
Metilparabeno	0,3
Propirilparabeno	0,1
FASE III	
Álcool benzílico	0,5

### 5.8 Ensaios de Fotoestabilidade em simulador solar

Os estudos de fotoestabilidade foram desenvolvidos com as formulações LADEG LOÇÃO CREMOSA FPS 15, LADEG EtOH CA a 1% e LADEG WAc a 1%. Utilizou-se de método espectrofotométrico para a determinação do FPS *in vitro* (Mansur *et al.*, 1986) inicial e após a exposição à radiação em simulador solar. Filtros foram acoplados ao simulador solar para impedir a passagem de radiações com comprimentos de onda menores que 290 nm.

As amostras foram preparadas pesando-se 250 mg de cada formulação em placa de Petri com área de 8,5 cm<sup>2</sup> (equivalentes a aproximadamente 30 mg/cm<sup>2</sup>), o ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, foram utilizadas 3 placas de Petri para cada formulação. Em seguida adicionou-se 1 mL de etanol em cada placa, para solubilizar as amostras e alcançar distribuições homogêneas em todas as superfícies. As amostras ficaram em repouso protegidas da luz, por 60 minutos, a

fim de evaporar o solvente adicionado, e estarem prontas para serem irradiadas em simulador solar. Em seguida foram levadas ao simulador solar, por 90 minutos, a uma irradiação de 315 J/m<sup>2</sup>/s (UVA) e 3,35 J/m<sup>2</sup>/s (UVB) (Figura 23).



Figura 23: Ensaio de fotoestabilidade em simulador solar, placas sem irradiação (a) e placas sob irradiação (b). Fotos da autora.

Após esse intervalo as placas foram removidas do simulador solar, seus conteúdos foram quantitativamente transferidos para balões volumétricos de cinquenta mililitros, diluídos com etanol para completar o volume. Diluições subsequentes foram realizadas para alcançar soluções com concentrações finais de 2 µg mL<sup>-1</sup>. As amostras foram então analisadas em espectrofotômetro seguindo o método de Mansur (1986) para o cálculo do FPS *in vitro* (item 5.4.1), e os valores encontrados foram comparados a amostras com quantidades equivalentes de preparações não irradiadas, para mensurar o valor de fotodegradação. Todas as amostras foram protegidas da luz antes e depois da radiação (PERUGINI *et al.*, 2005; JIMENEZ *et al.*, 2004a; JIMENEZ *et al.*, 2004b; PERUGINI *et al.*, 2002).

## 6. Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos como resultado da média ± desvio padrão, submetidos à análise estatística por meio do software Origin<sup>®</sup> Versão 8.5.1 para Windows (ANOVA, um fator,  $\alpha = 0,05$ ), em pelo menos  $n = 3$  determinações para experimentos independentes.



## 7. Resultados e discussão

### 7.1 Obtenção dos extratos, seus rendimentos e cores

A obtenção de diferentes extratos foi realizada de maneira simples visando a escolha adequada para incorporação destes nas formulações antissolares. Para selecioná-los, o critério inicial foi a coloração de cada um e a aparência final da formulação, de modo a manter um aspecto agradável aos olhos dos consumidores, isto é uma coloração clara e homogênea, imprescindíveis para uma preparação cosmética. Os resultados para cor e rendimento de todos os extratos obtidos podem ser verificados na Tabela 12.

Tabela 12: Tipos de extratos das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* seus rendimentos e cores.

Extrato	%Rendimento (g/g planta)	Cor
<b>EtOH bruto*</b>	32,44	Verde-escuro
<b>He*</b>	19,68	Verde-oliva
<b>DCM*</b>	5,62	Verde-escuro intenso
<b>AcEt*</b>	19,28	Amarelo-escuro
<b>1-But*</b>	9,20	Castanho
<b>WAc*</b>	21,95	Amarelo-esverdeado

\*EtOH bruto- extrato etanólico bruto, \*He- extrato hexânico, \*DCM- extrato diclorometânico, \*AcEt- extrato acetato de etila, \*1-But- extrato butanólico, \*WAc- extrato hidroacetônico.

A extração inicial foi feita com etanol comercial, um solvente de baixa toxicidade e baixo custo, onde obteve-se o extrato EtOH bruto (146,3 g) contendo um amplo espectro de substâncias polares e apolares, provavelmente a maioria de compostos fenólicos.

A partir daí iniciou-se a extração líquido-líquido utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol). Essas partições posteriores permitiram uma divisão mais minuciosa das substâncias

extraídas em distintas polaridades. O hexano, um solvente apolar, possibilitou a extração de óleos, gorduras e pigmentos produzindo o extrato He com rendimento igual a 19,68 g, mas extremamente viscoso e insolúvel. Com solventes um pouco mais polares, como o diclorometano e o acetato de etila, obteve-se os extratos DCM e AcEt, estes permitiram recuperar as substâncias pouco polares, provavelmente agliconas. O rendimento mais baixo foi do extrato DCM (4,52 g) de cor verde intensamente escura inadequada à incorporação nas formulações em estudo. O extrato AcEt apresentou rendimento igual a 14,62 g e coloração amarela típica da classe dos flavonóides. Por último, com o solvente 1- butanol foi obtido o extrato 1- But (5,36 g) de coloração castanha.

Para a melhoria da cor verde escuro do EtOH bruto (Tabela 12) foi realizada a filtração em carvão ativado conforme descrito no item 5.2 da metodologia. O procedimento de clarificação foi satisfatório em relação a originar o extrato EtOH CA, de coloração amarelo-claro, propícia para incorporação na formulação antissolar.

O extrato hidroacetônico foi obtido separadamente com a finalidade de extração de substâncias mais hidrofílicas. O rendimento deste extrato foi de 31,84 g, além de seu fácil manuseio e coloração amarelo-esverdeado (Tabela 12).

## 7.2 Atividade antioxidante

Foram realizados três diferentes métodos *in vitro* baseados no sequestro de radicais livres: DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e ORAC para investigação da capacidade antioxidante dos extratos.

O método de captação do radical livre DPPH<sup>•</sup> foi utilizado como um *screening* para a escolha dos extratos com maior capacidade antioxidante, a serem utilizados nos outros dois ensaios.

Deve-se observar que os outros dois métodos utilizados (ABTS<sup>•+</sup> e ORAC) não restringiram-se a um determinado momento da oxidação, mas representaram ao longo do tempo de cada ensaio o comportamento antioxidante das amostras estudadas através da representação das curvas cinéticas referentes à distintas concentrações dos extratos em comparação aos padrões utilizados (Egb 761<sup>®</sup> e Trolox<sup>®</sup>).

### 7.2.1 DPPH<sup>\*</sup>

Os resultados foram expressos em CE<sub>50</sub> (quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do DPPH<sup>\*</sup> em 50 %). Quanto mais baixo o valor para a CE<sub>50</sub>, mais eficiente a capacidade antioxidante da substância em análise.

Neste ensaio, todos os extratos testados apresentaram resultados altamente eficientes em comparação ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, EGb 761<sup>®</sup>. O extrato DCM exibiu uma CE<sub>50</sub> igual a  $3,26 \pm 0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$  seguido bem de perto do AcEt ( $3,37 \pm 0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). O extrato He ( $23,16 \pm 0,41 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) não demonstrou um valor tão expressivo para atividade antioxidante mas ainda assim, melhor do que o padrão EGb 761<sup>®</sup> ( $31,16 \pm 1,14 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Após a clarificação do EtOH bruto ( $6,06 \pm 0,48 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a atividade antioxidante se manteve, pois o extrato EtOH CA apresentou uma CE<sub>50</sub> igual a  $6,95 \pm 0,54 \mu\text{g ml}^{-1}$ , não exibindo diferença estatisticamente significativa (pós-teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

Somente os extratos He e DCM exibiram diferença estatisticamente significativa. Todos os extratos foram significativamente diferentes do EGb 761<sup>®</sup> (Tabela 13).

Foram excluídos pela inviabilidade na realização dos testes ABTS<sup>\*\*</sup> e ORAC, os extratos: He devido ao material extremamente viscoso e insolúvel nos solventes utilizados nos métodos citados, DCM e 1-But devido ao baixo rendimento em relação aos extratos selecionados conforme demonstrado no item 7.1.

Os resultados expressos em valores de CE<sub>50</sub> na tabela 13 mostraram-se promissores quando comparados aos resultados demonstrados por Bianco & Santos (2010) das propriedades antioxidantes de extratos e frações obtidos de folhas e caules de *B. microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. pelo método do DPPH<sup>\*</sup>. O extrato das folhas particionado com acetato de etila apresentou CE<sub>50</sub> de  $2,75 \mu\text{g ml}^{-1}$ , e o extrato dos caules com o mesmo solvente apresentou uma CE<sub>50</sub> de  $2,86 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Ambos quando comparados aos padrões utilizados naquele estudo, o ácido ascórbico (vitamina C) com CE<sub>50</sub> igual a  $36 \mu\text{g ml}^{-1}$ , e a rutina com CE<sub>50</sub> igual a  $8,13 \mu\text{g ml}^{-1}$ , mostraram-se muito eficientes (BIANCO & SANTOS, 2010). Ao comparar os valores dos extratos mencionados com o valor encontrado neste estudo, para o extrato das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* particionado com AcEt (CE<sub>50</sub> de  $3,37 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi verificado que estão bem próximos. A presença de

diversos flavonóides e outras substâncias polifenólicas isolados no gênero *Bauhinia* encontrados nos estudos fitoquímicos realizados por Silva & Cechinel (2002) sugere a possibilidade destes componentes estarem envolvidos diretamente no mecanismo antioxidante desta espécie, assim como de outras espécies pertencentes a este gênero.

O resultado das  $CE_{50}$  para todos os extratos investigados neste ensaio em comparação ao EGb 761<sup>®</sup>, e o tratamento estatístico para os dados obtidos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13.  $CE_{50}$  de todos os extratos testados no ensaio de captação dos radicais livres DPPH<sup>•</sup>.

Extrato	$CE_{50}$	Pós-teste de Dunn
DCM*	3,26 ± 0,04	A
AcEt*	3,37 ± 0,01	B
EtOH bruto*	6,06 ± 0,48	B
EtOH CA	6,95 ± 0,54	B
1-But*	4,38 ± 0,14	B
WAc*	5,38 ± 2,26	B
He*	23,16 ± 0,41	C
EGb 761 <sup>®</sup>	31,16 ± 1,14	D

\* Extratos com mesma letra não tiveram diferença estatisticamente significativa (Dunn,  $p < 0,05$ ).

Silva *et al.* (2005) investigaram a  $CE_{50}$  (DPPH<sup>•</sup>) de sete extratos etanólicos de diferentes espécies de *Bauhinia*. O melhor resultado encontrado foi para *B. forficata*, que apresentou capacidade antioxidante seis vezes inferior a *B. microstachya* var. *massambabensis*. Esta atividade deve-se provavelmente a um complexo de substâncias contendo estruturas flavonoídicas presentes em suas folhas sugeridas nos cromatogramas mostrados por estes autores. O perfil fitoquímico dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *B. microstachya* exibiram resultados distintos o que evidencia a presença de diferentes substâncias. A atividade antioxidante por diferentes metodologias foi correlacionada ao alto conteúdo de fenóis totais

apresentados pelo extrato etanólico em relação ao aquoso. Em geral, o extrato etanólico mostrou-se mais eficaz do que o aquoso, em reparar os danos causados pelas EROs. Quando comparados aos padrões utilizados naquele estudo: ácido ascórbico, Trolox<sup>®</sup> e rutina, ambos os extratos exibiram potente atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2005).

BIANCO & SANTOS (2003) isolaram e identificaram a presença de galato de metila nas folhas de *B. microstachya* crescidas no Paraná. Essa substância possui elevada atividade antioxidante (MENSOR, 1999) e quando associada com flavonóides, potencializam a ação desses, como observado por YOKOZAWA *et al.* (1998) em que o flavonóide miricitrina, com  $CE_{50} = 12,74 \mu\text{M}$  teve sua capacidade antioxidante aumentada quando o grupamento galóila foi introduzido na posição 2 da rhamnose, passando a  $CE_{50}$  para  $3,83 \mu\text{M}$ . Segundo esses autores, o radical galóila formado leva a estruturas mais estáveis, possibilitando interromper reações radiculares em cadeia.

Baseado no mecanismo de redução do radical DPPH<sup>•</sup> extensivamente descrito na literatura correlacionado com a presença de grupos de hidroxilas na molécula antioxidante (BONDET *et al.*, 1997; FAUCONNEAU *et al.*, 1997; KOROUNAKIS *et al.*, 1997) pode-se, neste trabalho, inferir que a ótima atividade dos extratos polares é provavelmente devido à presença de substâncias com um grupo hidroxila disponível (fenólico ou não). Esse requerimento estrutural pode estar relacionado com a presença de flavonóides ou taninos condensados que são sabidos de existirem em espécies da Família Leguminosae-Caesalpinioideae (HARBORNE & MABRY, 1982). Como os testes foram feitos com extratos brutos, vários fatores podem estar competindo para tornar um mais antioxidante do que outro. A complexidade da composição química desses extratos pode influenciar na capacidade que cada constituinte tem de acessar o centro radicalar do DPPH<sup>•</sup> para doar um radical hidrogênio (SANTOS, 2001). Existe também a tese de que a interação com a molécula de DPPH<sup>•</sup> depende não somente da estrutura do antioxidante, mas também da cinética de reação dessas substâncias com o DPPH<sup>•</sup> (MENSOR, 1999). Certas substâncias com cinética rápida de reação reduzem um número de moléculas de DPPH<sup>•</sup> que varia conforme o número de grupamentos hidroxila disponíveis.

Com relação à composição química do extrato AcEt das folhas da variedade *massambabensis* pode-se inferir que é rica em flavonóides e que são principalmente

derivados do Kaempferol, ocorrendo na forma de glicosídeos. Uma vez que foram isolados e identificados os seguintes flavonóides: Kaempferol-3-O-rhamnosídeo (Figura 24 a) e 2'', 6''-di-O-galoil-astragalina (Figura 24 b), sendo este último um derivado do ácido gálico, pela primeira vez isolado no extrato AcEt das suas folhas, em trabalho recente (LEO, 2005).

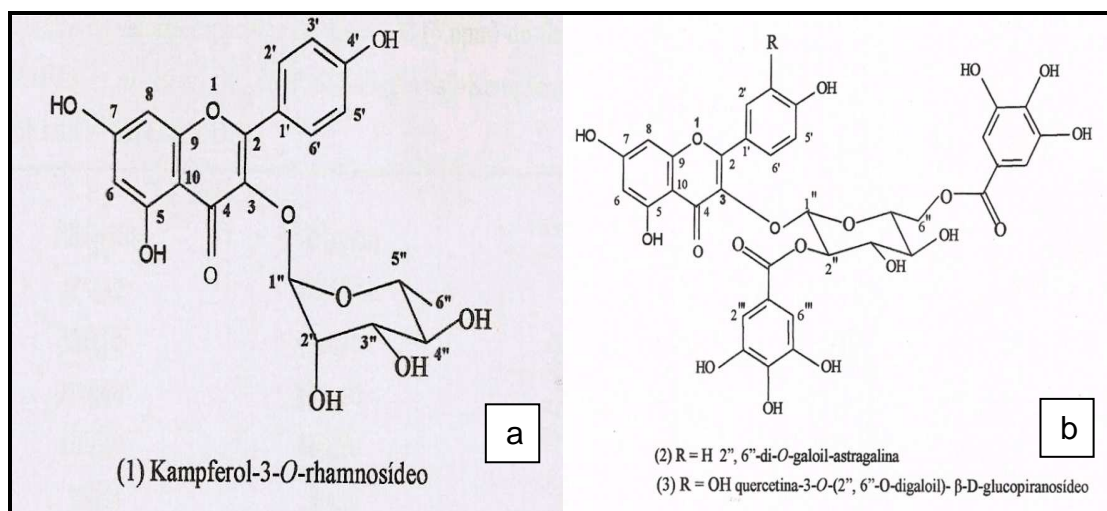


Figura 24: Flavonóides isolados da planta *B. microstachya* var. *massambensis*. Kaempferol-3-O-rhamnosídeo (a); 2'', 6''-di-O-galoil-astragalina (b). Adaptado de LEO, 2005.

Em relação ao ensaio com o DPPH<sup>\*</sup>, o extrato WAc apresentou a CE<sub>50</sub> inferior ao EtOH bruto e ao EtOH CA (Tabela 15), isto é uma maior atividade antioxidante total em relação a ambos. A porcentagem de AAT é dependente da concentração de 1 a 10 µg mL<sup>-1</sup>, e após este intervalo foi atingido um platô ≥ 90 % de AAT (Figura 25). A inibição do radical livre DPPH<sup>\*</sup> foi utilizada como um *screening* para selecionar os extratos e a faixa ótima de atividade antioxidante das diversas concentrações de todos os extratos obtidos (Figuras 25 e 26).

Pode-se observar nas Figuras 25 e 26, que o extrato utilizado como padrão (EGb 761<sup>®</sup>), exibe uma porcentagem de atividade antioxidante total (% AAT) muito inferior quando nas mesmas concentrações dos extratos obtidos das folhas da planta em estudo. Por outro lado, os extratos escolhidos nas concentrações ≥ 10 µg mL<sup>-1</sup> atingem o platô de cerca de 90 % da AAT. Isto significa que ao aumentarmos as concentrações das amostras a % AAT permanece constante. Em relação ao EGb 761<sup>®</sup>, o platô acima de 90% da AAT foi atingido na concentração ≥ 125 µg mL<sup>-1</sup>.

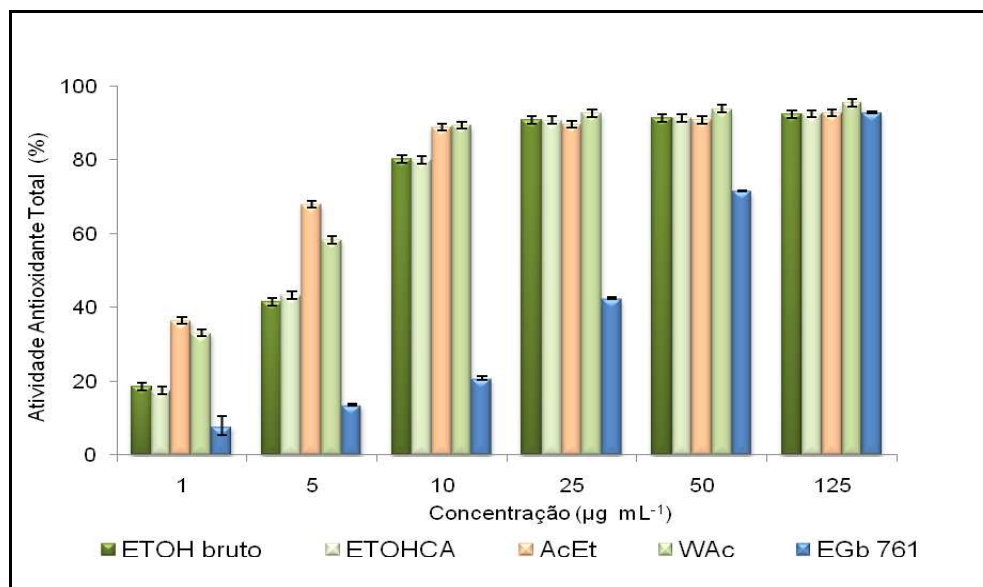


Figura 25: *Screening* da %AAT pelo DPPH dos extratos selecionados. Média±Desvio-Padrão de n = 3 determinações.

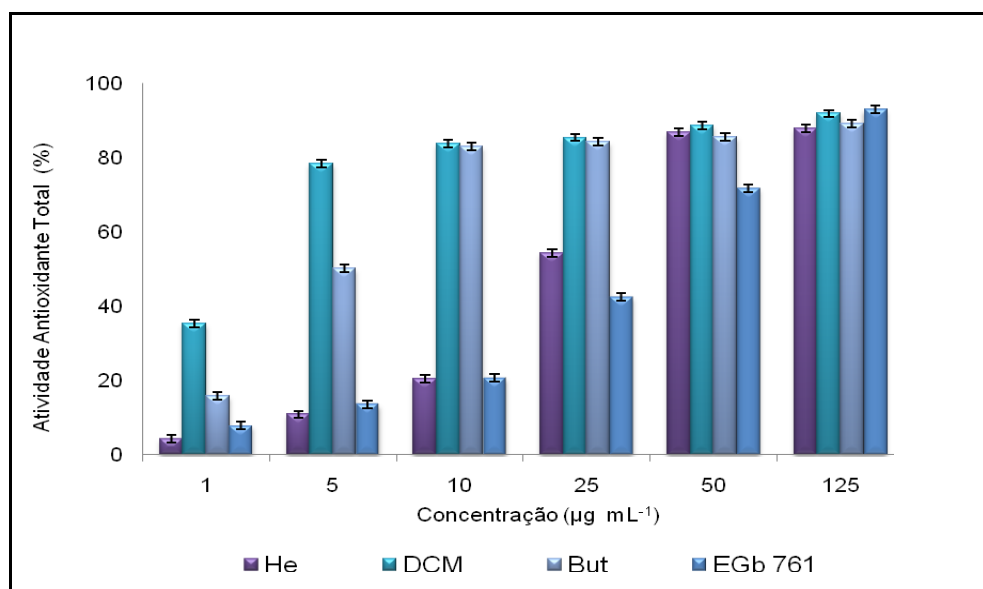


Figura 26: *Screening* da %AAT pelo DPPH dos extratos excluídos. Média±Desvio-Padrão de n = 3 determinações.

### 7.2.2 ABTS<sup>•+</sup>

Este método foi escolhido para a confirmação dos resultados encontrados no método DPPH<sup>•</sup>, e para a observação do comportamento cinético ao longo do tempo de reação dos extratos potencialmente antioxidantes a serem incorporados nas

formulações antissolares. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup> *per g* de extrato.

Neste ensaio todos os extratos testados exibiram um forte potencial antioxidante em relação ao EGb 761<sup>®</sup> ( $262,47 \pm 0,10$ ). A ordem crescente de potencial antioxidante dos extratos foi EtOH CA ( $775,19 \pm 1,60$ ) < EtOH bruto ( $886,96 \pm 0,45$ ) < WAc ( $2173,91 \pm 0,09$ ) < AcEt ( $2439,02 \pm 1,95$ ) (Tabela 14).

Tabela 14: Extratos testados no ensaio ABTS<sup>\*\*</sup> e dados estatísticos.

Extrato	Ensaio ABTS		Equação da reta	
	$(\mu\text{mol L}^{-1} \text{ de Trolox}^{\text{®}} \text{ per g de Extrato})$		$R^2$	$r$
			$y = -0,2128x + 0,7667$	
<b>EtOH bruto</b>	$884,96 \pm 0,45$		$R^2 = 0,9803$	<b><math>r = 0,9901</math></b>
			$y = -0,223x + 0,8127$	
<b>EtOH CA</b>	$775,19 \pm 1,60$		$R^2 = 0,9992$	<b><math>r = 0,9996</math></b>
			$y = -0,1998x + 0,607$	
<b>AcEt</b>	$2439,02 \pm 1,94$		$R^2 = 0,9983$	<b><math>r = 0,9991</math></b>
			$y = -0,1618x + 0,6002$	
<b>WAc</b>	$2173,91 \pm 0,10$		$R^2 = 0,9958$	<b><math>r = 0,9979</math></b>
			$y = -0,049x + 0,712$	
<b>EGb 761<sup>®</sup></b>	$262,47 \pm 0,10$		$R^2 = 0,9804$	<b><math>r = 0,9901</math></b>

\* Todos os extratos exibiram diferença estatisticamente significativa (Dunn,  $p < 0,05$ ).

A linearidade referente a cada extrato e ao padrão EGb<sup>®</sup> foi representada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) entre as absorbâncias lidas à 734 nm e as concentrações utilizadas. Todos os valores encontram-se na Tabela 14.

A linearidade da curva analítica do Trolox<sup>®</sup> foi representada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,9962; esta curva foi utilizada nos cálculos do ensaio ABTS, onde 1000  $\mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup> correspondem a absorbância 0,525 ou seja a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 27). Os pontos encontrados nos diversos solventes utilizados foram lineares



em todas as amostras com valores de coeficientes de correlação adequados. A precisão foi avaliada pela proximidade dos resultados obtidos nos experimentos repetidos, expressa pelos desvios padrão (DP) (BRASIL, 2003). Foram obtidos todos os valores satisfatórios (menores que 5%) para os níveis de concentração, de todas as curvas analíticas realizadas.

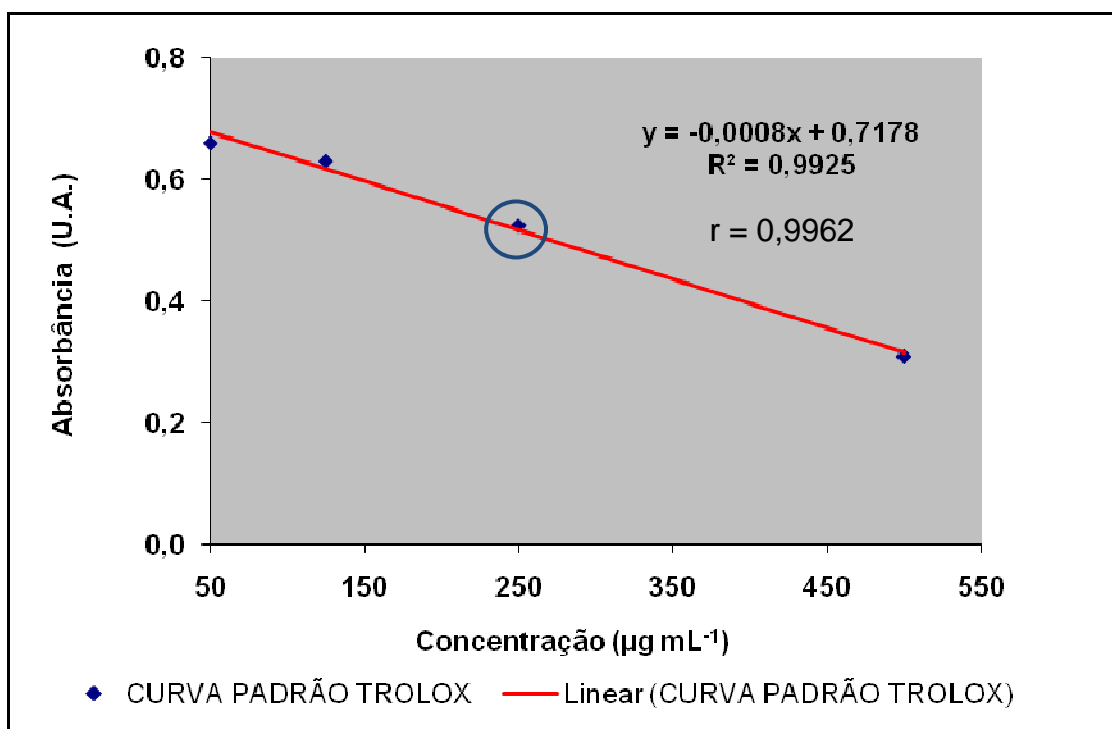


Figura 27: Curva analítica do Trolox<sup>®</sup> utilizada nos cálculos do ensaio ABTS.

Na reação com o ABTS<sup>•+</sup>, os extratos demonstraram eficientes resultados para a capacidade antioxidante frente ao EGb 761<sup>®</sup> (Tabela 15). Neste método o monocátion é formado antes da adição dos extratos com suposto potencial antioxidante. O ABTS<sup>•+</sup> é continuamente gerado ao longo do ensaio proporcionando resultados em tempo real ao longo dos 6 minutos. As curvas cinéticas do potencial antioxidante dos extratos AcEt, WAc, EtOH bruto e EtOH CA testados frente ao EGb 761<sup>®</sup> e ao Trolox<sup>®</sup> foram traçadas em função do tempo (Figuras 28, 29, 30 e 31).

O perfil cinético para todos os extratos testados, nas diversas concentrações, apresentou “performance” superior frente ao padrão (EGb 761<sup>®</sup>). Em relação ao Trolox<sup>®</sup>, as curvas cinéticas da capacidade antioxidante dos extratos AcEt, WAc,

EtOH bruto e EtOH CA ao longo do tempo do experimento foram similares e em alguns casos superiores (Figuras 28, 29, 30 e 31).

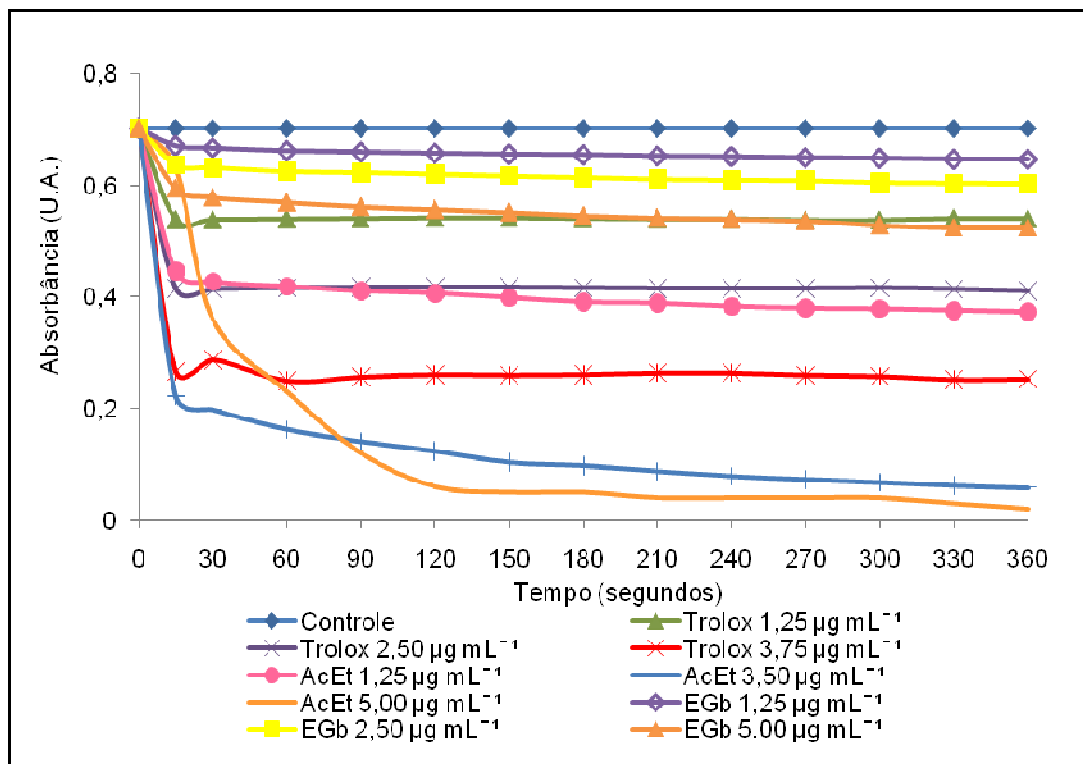


Figura 28: Curva cinética do potencial antioxidante do AcEt frente ao EGb e ao Trolox<sup>®</sup> no ensaio ABTS.

O AcEt foi investigado em três concentrações diferentes frente ao Trolox<sup>®</sup> e ao EGb 761<sup>®</sup> (Figura 28). A curva cinética da Figura 28 demonstrou o comportamento do extrato AcEt ao longo dos 6 minutos de ensaio, em comparação ao extrato padronizado EGb 761<sup>®</sup> a 5,00 µg mL<sup>-1</sup> pode-se observar que a concentração de 1,25 µg mL<sup>-1</sup> do extrato AcEt apresentou maior descoloramento da solução no mesmo tempo, e comportamento similar à substância de referência (Trolox<sup>®</sup>) a 2,50 µg mL<sup>-1</sup>. As concentrações de 1,25 e 2,50 µg mL<sup>-1</sup> do EGb<sup>®</sup> apresentaram perfil cinético similar para o potencial antioxidante, ou seja, praticamente não houve descoloração do monocátion durante o ensaio. O Trolox<sup>®</sup> a 1,25 µg mL<sup>-1</sup> exibiu um perfil semelhante ao do EGb a 5,00 µg mL<sup>-1</sup>. O AcEt a 1,25 µg mL<sup>-1</sup> apresentou um comportamento cinético similar ao Trolox<sup>®</sup> a 2,50 µg mL<sup>-1</sup>, o que sugere uma excelente atividade antioxidante para este extrato obtido das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis*. O AcEt a 3,50 µg mL<sup>-1</sup> apresentou um potencial antioxidante maior do que o Trolox<sup>®</sup> a 3,75 µg mL<sup>-1</sup>.

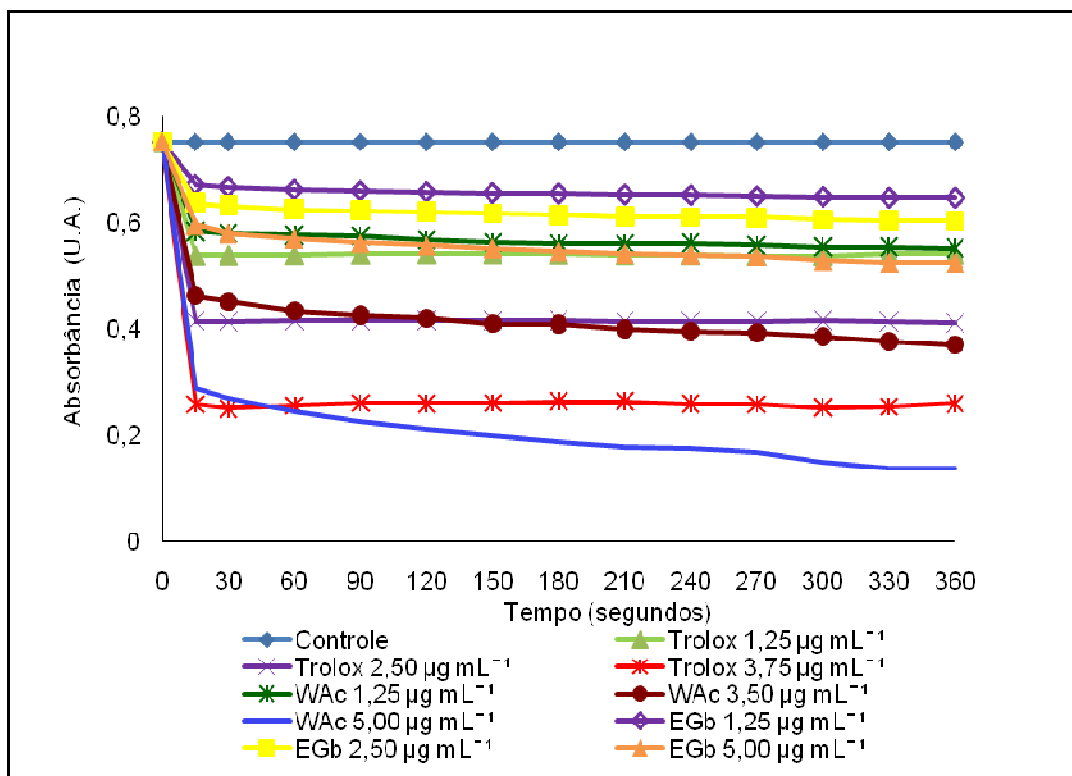


Figura 29: Curva cinética do potencial antioxidante do WAc frente ao EGb e ao Trolox<sup>®</sup> no ensaio ABTS.

A curva cinética da Figura 29 exibiu o comportamento do extrato WAc ao longo dos 6 minutos de ensaio, em comparação ao extrato padronizado EGb 761<sup>®</sup> a 5,00 µg mL<sup>-1</sup> observa-se que a concentração de 1,25 µg mL<sup>-1</sup> do extrato WAc apresentou descoloramento semelhante da solução no mesmo tempo, e comportamento similar à substância de referência (Trolox<sup>®</sup>) a 1,25 µg mL<sup>-1</sup>. A curva do WAc a 1,25 µg mL<sup>-1</sup> apresentou um perfil cinético semelhante ao Trolox<sup>®</sup> na mesma concentração e ao EGb a 5,00 µg mL<sup>-1</sup>. Isto mostrou uma excelente atividade antioxidante para este extrato frente ao Trolox<sup>®</sup> e ao extrato padronizado de *Gingko biloba*, EGb 761<sup>®</sup>. A concentração de 5,00 µg mL<sup>-1</sup> do extrato WAc nos quinze segundos iniciais levou a absorvância quase a zero, o que evidenciou forte potencial antioxidante.

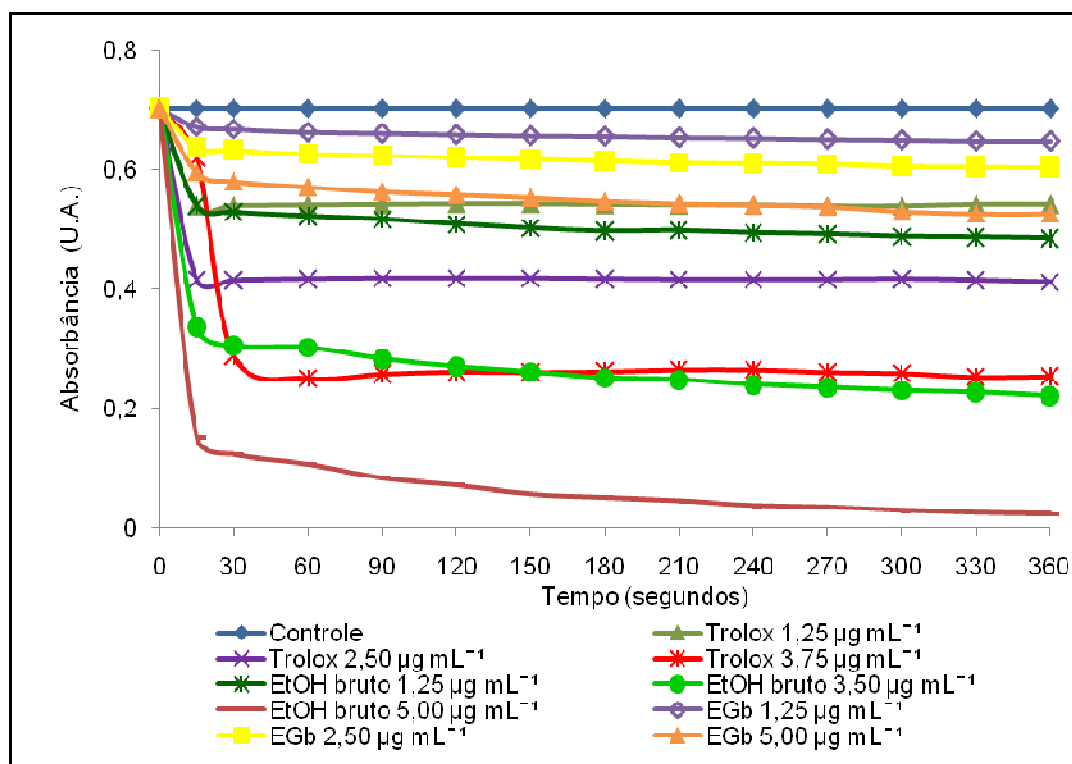


Figura 30: Curva cinética do potencial antioxidante do EtOH bruto frente ao EGb e ao Trolox<sup>®</sup> no ensaio ABTS.

A curva cinética da Figura 30 exibiu o comportamento do extrato EtOH bruto ao longo dos 6 minutos de ensaio, em comparação ao extrato padronizado EGb 761<sup>®</sup> a 5,00 µg mL<sup>-1</sup> pode-se observar que a concentração de 1,25 µg mL<sup>-1</sup> do extrato EtOH bruto apresentou maior descoloramento da solução no mesmo tempo, inclusive para a substância de referência (Trolox<sup>®</sup>) na mesma concentração do extrato em análise.

O perfil cinético do extrato EtOH bruto a 1,25 µg mL<sup>-1</sup> exibiu um potencial antioxidante semelhante ao Trolox<sup>®</sup> a 1,25 µg mL<sup>-1</sup> e ao EGb a 5,00 µg mL<sup>-1</sup>. Na concentração igual a 3,50 µg mL<sup>-1</sup> este extrato exibiu um perfil cinético semelhante ao Trolox<sup>®</sup> a 3,75 µg mL<sup>-1</sup>, o que evidenciou forte capacidade antioxidante frente à substância química de referência. O extrato EtOH bruto (5 µg mL<sup>-1</sup>) reduziu a absorbância a zero nos quinze segundos iniciais do ensaio, mostrando um forte potencial antioxidante frente ao EGb 761<sup>®</sup>.

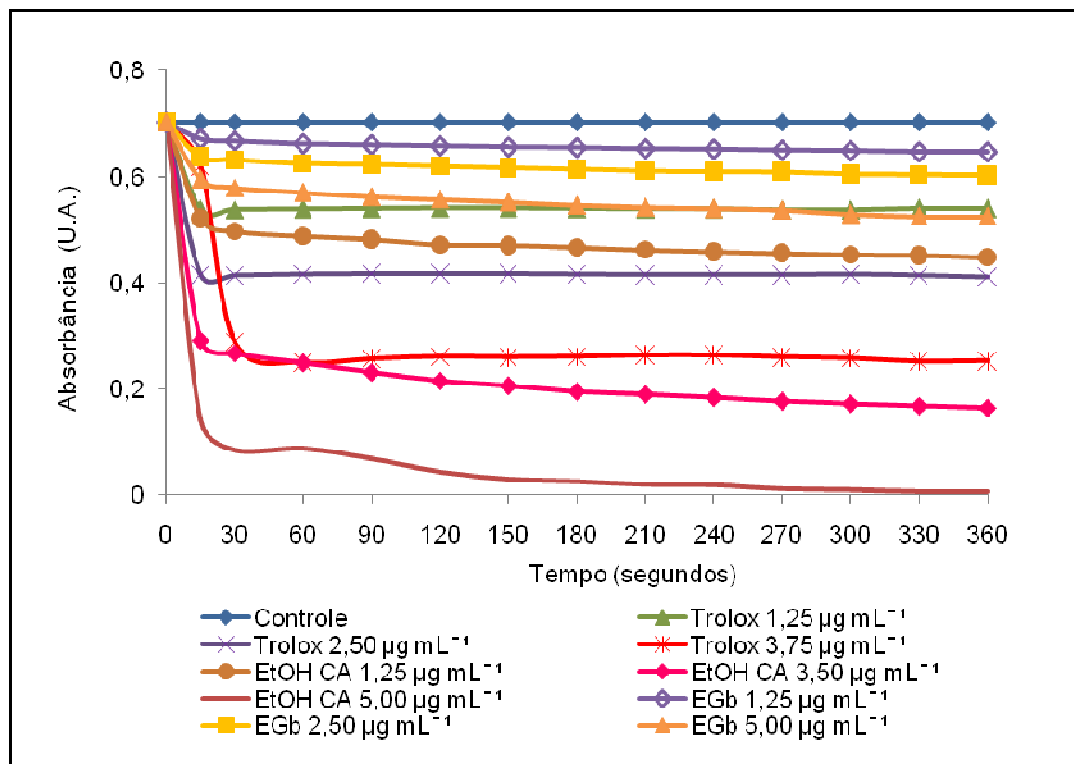


Figura 31: Curva cinética do potencial antioxidante do EtOH CA frente ao EGb e ao Trolox<sup>®</sup> no ensaio ABTS.

A curva do extrato EtOH CA a  $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou uma cinética antioxidante eficiente frente ao Trolox<sup>®</sup> a  $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  e ao EGb<sup>®</sup> a  $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e a partir dos 180 segundos aproximou-se da curva do Trolox<sup>®</sup> a  $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 31). A curva do EtOH CA a  $3,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  exibiu um perfil cinético melhor do que o Trolox<sup>®</sup> na concentração de  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O extrato EtOH CA a  $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  semelhante ao ocorrido com o extrato EtOH bruto reduziu a absorbância quase a zero em quinze segundos exibindo também alto potencial antioxidante em relação ao EGb 761<sup>®</sup> ( $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 7.2.3 ORAC

No ensaio ORAC, inicialmente, observou-se o espectro da FL nos parâmetros de fluorescência utilizados  $\lambda_{\text{excitação}}$ : 480 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$ : 515 nm (Figura 32).

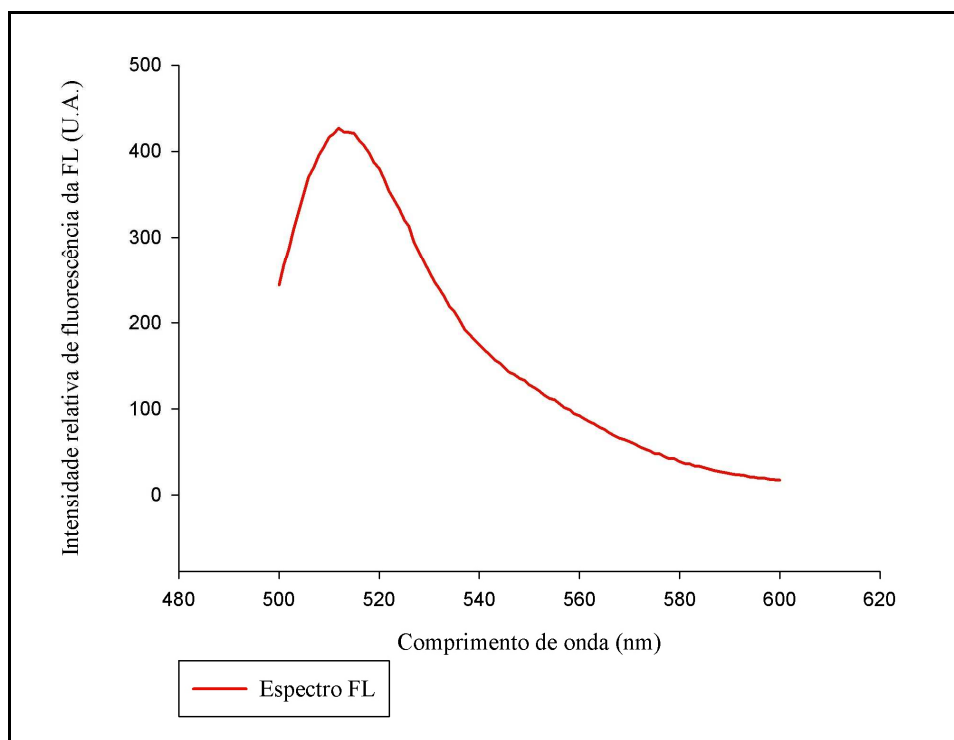


Figura 32: Espectro da FL utilizado para o ensaio ORAC.

No ensaio ORAC, observou-se a proteção da estrutura da FL pelas diferentes concentrações de Trolox<sup>®</sup> em comparação ao controle (FL + AAPH) e a fluoresceína livre em tampão fosfato (FL livre). As curvas de decaimento da fluorescência da FL, para investigação do efeito das concentrações de 1 e 10 mmol L<sup>-1</sup> de Trolox<sup>®</sup>, tiveram efeito protetor semelhante frente ao ataque dos radicais peroxila. Em relação ao Trolox<sup>®</sup> a 20 mmol L<sup>-1</sup> foi visto que durante os seis minutos iniciais o perfil cinético foi semelhante à concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup>. Entretanto, no período de 6 a 30 minutos foi verificada uma maior atividade antioxidante para o Trolox<sup>®</sup> a 20 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 33).

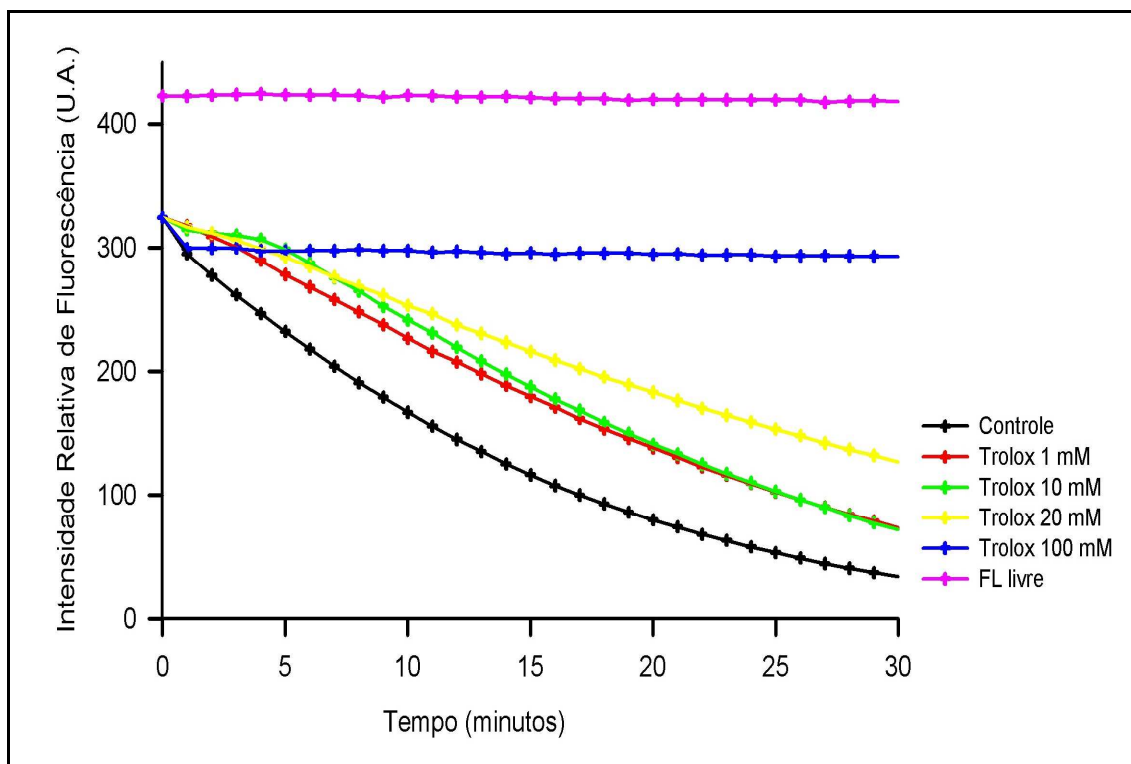


Figura 33: Efeito da concentração do Trolox® na curva de decaimento da fluorescência da FL.

Na Figura 34, observa-se que o extrato EtOH CA a  $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$  exibiu efeito protetor semelhante ao Trolox® a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente ao ataque dos radicais peroxila. Enquanto que a  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi similar ao EGb a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

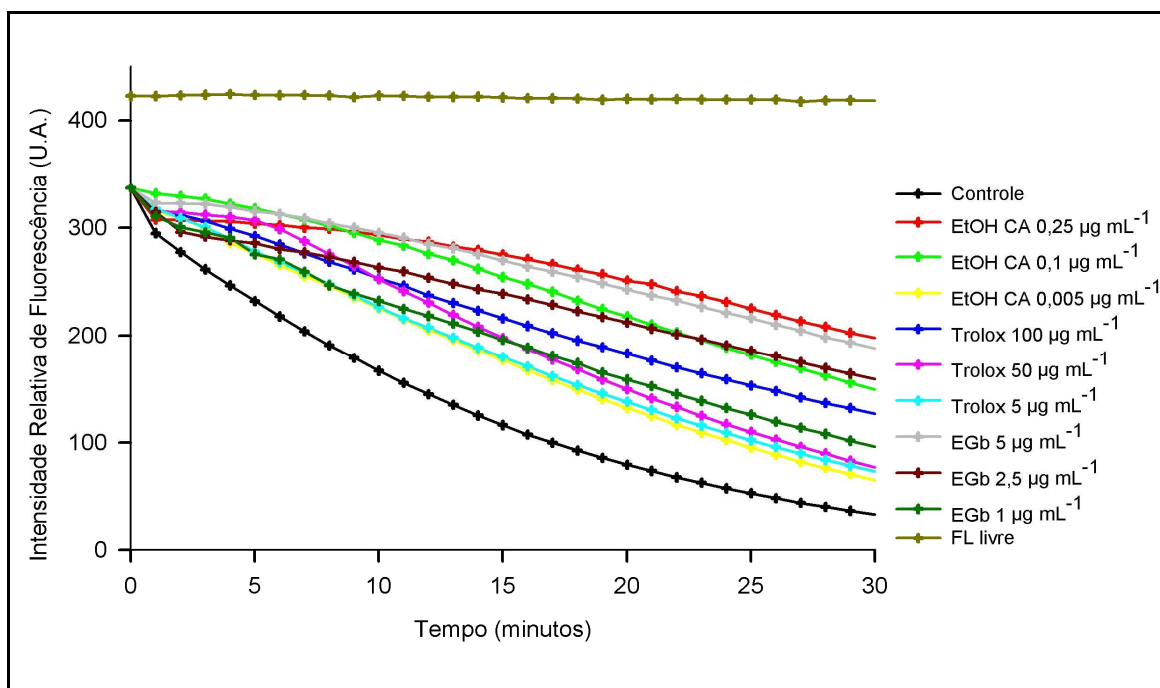


Figura 34: Efeito da concentração do extrato EtOH CA frente ao Trolox® e ao EGb na curva de decaimento da fluorescência da FL.

Na Figura 35, o extrato WAc a  $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$  exibiu efeito protetor à FL semelhante ao Trolox<sup>®</sup> a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente ao ataque dos radicais peroxila. Enquanto que WAc a  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi superior ao EGb a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

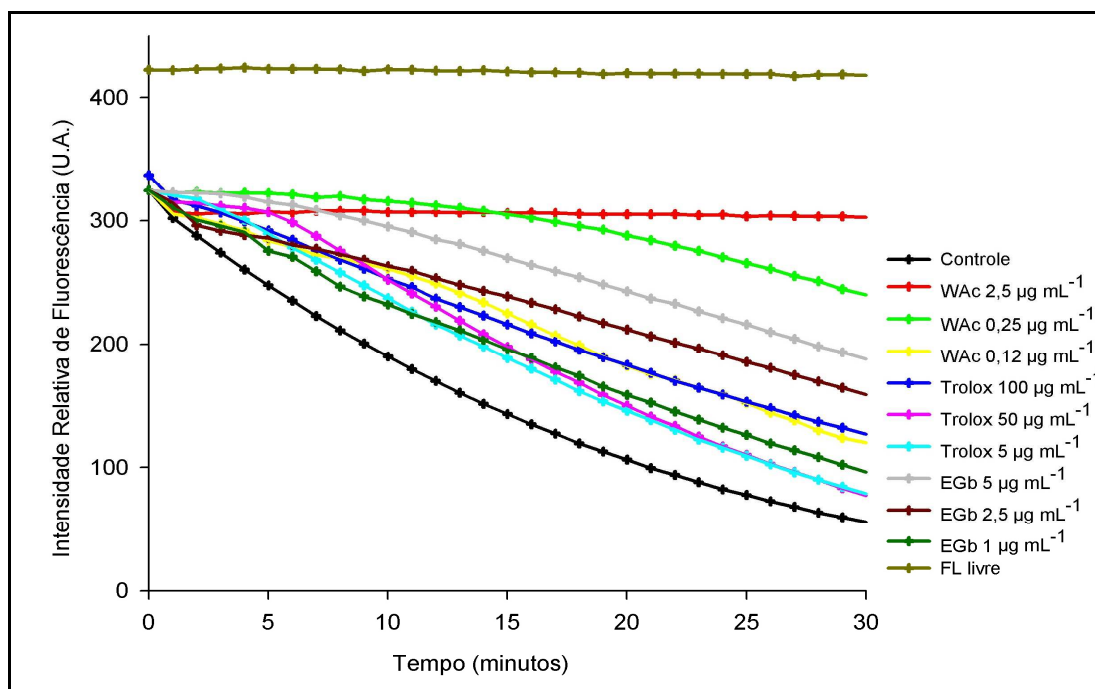


Figura 35: Efeito da concentração do extrato WAc frente ao Trolox<sup>®</sup> e ao EGb na curva de decaimento da fluorescência da FL.

Os extratos analisados pelo método ORAC exibiram atividade antioxidante consideravelmente eficiente em baixíssimas concentrações, o extrato EtOH CA ( $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) demonstrou alto valor ORAC relativo (Tabela 15).

Os resultados dos ensaios ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> estão em conformidade, e a ordem decrescente de potencial antioxidante foi: AcEt > WAc > EtOH bruto > EtOH CA > EGb 761<sup>®</sup> (Tabela 15).

Quanto menor o valor da  $CE_{50}$  de uma substância mais eficiente será o seu potencial antioxidante pelo método de captura dos radicais DPPH<sup>•</sup>. As  $CE_{50}$  dos extratos estudados preliminarmente foram bem inferiores ao EGb 761<sup>®</sup> o que significa uma maior atividade antioxidante dos extratos de *B. microstachya* var. *massambabensis* frente ao padrão de extrato vegetal utilizado. O melhor extrato neste ensaio foi o AcEt, e a sua capacidade antioxidante cerca de dez vezes maior do que o EGb 761<sup>®</sup> (Tabela 15).



Os resultados dos ensaios *in vitro*, DPPH, ABTS<sup>+</sup> e ORAC da capacidade antioxidante dos diferentes extratos encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados da capacidade antioxidante dos extratos das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis*, através de três diferentes métodos *in vitro*.

Extrato	Ensaio DPPH	Ensaio ABTS	Ensaio ORAC	
	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox <sup>®</sup> per g de Extrato)	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Valor ORAC relativo ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox <sup>®</sup> per g de Extrato)
EtOH bruto	6,06±0,48	884,96±0,45	2,00	1,19±0,72
			0,25	7,43±0,82
			0,05	32,06±0,83
EtOH CA	6,95±0,54	775,19±1,60	0,25	10,30±0,77
			0,10	22,39±0,76
			0,005	181,09±0,75
AcEt	3,37±0,01	2439,02±1,94	2,50	1,19±0,85
			0,50	4,46±0,69
			0,10	21,24±1,05
WAc	5,38±2,26	2173,91±0,10	2,50	1,33±1,18
			0,25	12,55±1,09
			0,12	13,68±0,78
EGb 761 <sup>®</sup>	31,16±1,14	262,47±0,10	5,00	0,52±0,67
			2,50	0,81±0,47
			1,00	1,29±0,11

Média ± DP (desvio-padrão) de n = 3 determinações.

Os métodos de varredura dos radicais livres DPPH<sup>\*</sup> e ABTS<sup>+</sup>, que investigaram radicais orgânicos mostraram uma “performance” semelhante na capacidade antioxidante dos extratos estudados. Embora no método ABTS<sup>+</sup>, quanto maior o valor expresso em equivalentes g de Trolox<sup>®</sup> per g de extrato, maior o potencial antioxidante do extrato analisado. No ensaio do ABTS<sup>+</sup>, o melhor extrato foi o AcEt exibindo uma capacidade antioxidante cerca de dez vezes maior do que o EGb 761<sup>®</sup>, enquanto que WAc, EtOH bruto, EtOH CA foram cerca de oito, quatro e três vezes superiores, respectivamente (Tabela 15).

### 7.3 Desenvolvimento das formulações antissolares e determinação do FPS *in vitro* pelo Método Mansur

Foi escolhida como creme-base (LC), uma loção aniônica de composição simples, para incorporação dos filtros solares e dos extratos vegetais. As formulações apresentaram aspecto visual e textura adequados a um produto cosmético. As três formulações antissolares loção cremosa com os filtros solares (LADEG LC FPS 15); loção cremosa com os filtros solares e o extrato etanólico clarificado a 1% (LADEG LC FPS 15 EtOH CA 1%) e loção cremosa com os filtros solares e o extrato WAc a 1% (LADEG LC FPS 15 WAc 1%) foram as preparações selecionadas para a realização dos testes de eficácia e segurança (Figura 36). Aparentemente não houve nenhum efeito dos excipientes utilizados na eficácia do produto final. Como foi observado pelo método de Mansur, os extratos incorporados no creme base sem os filtros apresentaram um FPS < 1 (Tabela 16). O efeito de proteção foi obtido após a incorporação dos filtros solares juntos com os extratos vegetais.



Figura 36: Aspecto visual final das formulações antissolares LADEG LC FPS 15 WAc 1%; LADEG LC FPS 15 EtOH CA 1% e LADEG LC FPS 15. Fotos da autora.

Tabela 16: Resultados dos FPS das formulações LADEG LC FPS 15, LADEG LC FPS 15 + extratos e LC + extratos.

Formulação	Filtros	FPS <i>in vitro</i>
LC FPS 15	sim	17,0 ± 0,25
LC FPS 15 + EtOH CA 1 %	sim	17,8 ± 0,77
LC FPS 15 + WAc 1 %	sim	16,9 ± 0,62
LC FPS 15 + WAc a 2 %	sim	16,7 ± 0,22
LC + EtOH CA 1 %	-	0,70 ± 0,06
LC + WAc 1 %	-	0,68 ± 0,02
LC + WAc 2 %	-	0,84 ± 0,01
LC + EtOH bruto 1 %	-	0,76 ± 0,05
LC + AcEt 1 %	-	0,66 ± 0,01

Média ± DP (desvio-padrão) de n = 3 determinações.

O aspecto visual foi primordial para a escolha das formulações a serem analisadas. Foram avaliadas três concentrações distintas dos extratos. A Figura 37 exibe a formulação contendo o extrato WAc a 2, a 1 e a 0,5 % incorporados no creme base. Destas três formulações, LADEG WAc a 1 % foi a escolhida.



Figura 37: Aspecto visual das formulações antissolares LADEG WAc a 2 %; 1 % e a 0,5 %. Fotos da autora.

#### 7.4 Análise Fototóxica em culturas de *S. cerevisiae* das formulações desenvolvidas e respectivos extratos

Para a análise fototóxica foram escolhidos os extratos EtOH CA e WAc devido a eficiente capacidade antioxidante *in vitro* e a coloração adequada à aplicação em formulações cosméticas. No teste de fototoxicidade foi observado a ausência de halo de inibição do crescimento do microorganismo após 48 horas sob irradiação com lâmpada UVA, e no escuro indicando que a amostra não é fototóxica. Quando submetido a RUV-A o controle positivo 8-MOP, substância amplamente utilizada em testes de fototoxicidade, exibiu a presença de halo de inibição no crescimento do microorganismo com cerca de 2 cm de diâmetro em torno do disco (Figura 38 b).

Nenhuma das formulações nem seus respectivos extratos apresentaram fototoxicidade frente à radiação ultravioleta A.

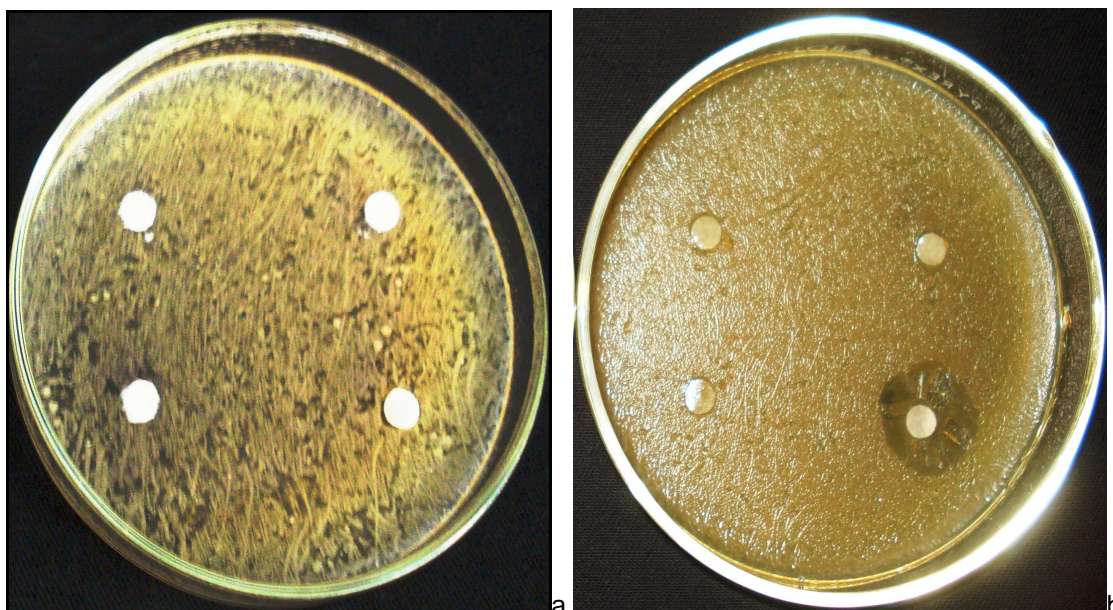


Figura 38: Placa no escuro após 48h, sem formação de halo (a)  
Placa sob iluminação UVA após 48h, com formação de halo no disco 4 (b)  
Nos discos 1 a 3: LC + FS; e no disco 4: 8-MOP. Fotos da autora.

A disposição dos discos nas placas está descrita no item 5.5 (Figura 17).

*S. cerevisiae* poderia ser proposto como um modelo celular para fornecer um rápido e inicial *screening* de capacidade antioxidante de extratos vegetais (SILVA *et al.*, 2005). Além disso, esta metodologia *ex vivo* efetivamente complementa os resultados dos ensaios *in vitro* produzindo uma análise mais completa do potencial antioxidante e fototóxico dos extratos vegetais testados.



## 7.5 Segurança das formulações desenvolvidas e respectivos extratos

### 7.5.1 HET-CAM

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 17. A formulação LADEG LOÇÃO CREMOSA FPS 15 (LC FPS 15) apresentou o valor médio de graduação dos fenômenos irritantes de 1,92; a formulação contendo o extrato EtOH CA a 1% incorporado e os filtros solares (LADEG LC FPS 15 + EtOH CA 1%) apresentou o valor de 1,50 e a formulação contendo o extrato WAc a 1% com filtros solares (LADEG LC FPS 15 + WAc 1%) incorporados apresentou o valor de 1,33. O extrato EtOH CA a 1% em TF salino pH 7,4 apresentou o valor médio de graduação dos fenômenos irritantes de 1,50 enquanto que o extrato WAc a 1% apresentou o valor zero, significando irritante leve e não irritante, respectivamente. Esses valores foram obtidos comparando os fenômenos observados com a graduação contida na Tabela 4 do item 5.6.1, na qual estão descritos os níveis de avaliação para cada um dos fenômenos observados.

Tabela 17: Graduação dos fenômenos irritantes por meio do ensaio HET-CAM e a classificação final do grau de irritação das formulações e respectivos extratos.

<b>Produto LADEG</b>	<b>1º exp.</b>	<b>2º exp.</b>	<b>3º exp.</b>	<b>Média</b>	<b>Classificação</b>
<b>LC FPS 15</b>	1,50	2,25	2,00	<b>1,92</b>	<b>Irritante Leve</b>
<b>EtOH CA a 1%</b>	0,00	3,00	1,50	<b>1,50</b>	<b>Irritante Leve</b>
<b>LC FPS 15 + EtOH CA a 1%</b>	2,75	1,50	0,00	<b>1,42</b>	<b>Irritante Leve</b>
<b>WAc a 1%</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	<b>Não Irritante</b>
<b>LC FPS 15 + WAc a 1%</b>	2,50	0,00	1,50	<b>1,33</b>	<b>Irritante Leve</b>

Ao comparar os valores de graduação dos fenômenos irritantes obtidos em função do tempo decorrido para sua ocorrência com a tabela de classificação do grau de irritação das formulações avaliadas (Tabela 5 do item 5.6.1), obtém-se a classificação final como “irritante leve” para as três formulações analisadas.

Essa classificação sugere que as formulações desenvolvidas não possuem potencial irritante, porém esse resultado precisa ser associado aos demais resultados dessa seção (CAM-TBS e RBC), para que seja possível uma avaliação final do grau de irritação ocular *in vitro* das formulações e extratos em análise.

De acordo com o protocolo estabelecido no setor de Farmacologia/Toxicologia do INCQS/FIOCRUZ, onde foram feitos os testes, a classificação obtida para um produto com valor médio classificado como irritante leve tem o mesmo efeito que um produto não irritante.

Os resultados apresentados neste ensaio foram baseados em mudanças macroscópicas ocorridas na MCA. Os testes foram feitos em triplicata por três analistas diferentes.

### **7.5.2 CAM-TBS**

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 18. A formulação LADEG LC FPS 15 apresentou o valor médio de graduação dos fenômenos irritantes de 2,86; a formulação LADEG LC FPS 15 + EtOH CA 1% apresentou o valor de 2,80 e a formulação LADEG LC FPS 15 + WAc 1% apresentou o valor de 5,48. O extrato EtOH CA a 1% em TF salino pH 7,4 apresentou o valor médio de graduação dos fenômenos irritantes de 2,51 enquanto que o extrato WAc a 1% apresentou o valor de 1,07. Esses valores foram obtidos com a quantificação do corante absorvido, que é correspondente ao dano causado na MCA, estabelecendo uma correlação ao grau de irritação ocular *in vitro* das formulações e dos extratos em teste. A classificação de cada formulação foi obtida com a média dos valores de absorbância do TBS dos 4 ovos nos 3 dias e comparada com os valores do material controle. Obteve-se a classificação final como “não irritante” para as três formulações e para os dois extratos analisados.

Quando comparados ao HET-CAM, estes resultados encontrados no CAM-TBS corroboram a classificação de produto “não-irritante” ou “irritante leve” tanto

para as formulações desenvolvidas no LADEG quanto para os respectivos extratos, sugerindo a segurança de uso dos mesmos.

Tabela 18: Graduação dos fenômenos irritantes por meio do ensaio CAM-TBS e a classificação final do grau de irritação das formulações e dos respectivos extratos.

<b>Produto LADEG</b>	<b>1º exp.</b>	<b>2º exp.</b>	<b>3º exp.</b>	<b>Média</b>	<b>Classificação</b>
<b>LC FPS 15</b>	-0,60	5,04	4,14	<b>2,86</b>	<b>Não Irritante</b>
<b>EtOH CA a 1%</b>	1,34	2,82	3,36	<b>2,51</b>	<b>Não Irritante</b>
<b>LC FPS 15 + EtOH CA a 1%</b>	6,24	2,82	-0,67	<b>2,80</b>	<b>Não Irritante</b>
<b>WAc a 1%</b>	0,40	1,68	1,14	<b>1,07</b>	<b>Não Irritante</b>
<b>LC FPS 15 + WAc a 1%</b>	6,85	5,84	3,76	<b>5,48</b>	<b>Não Irritante</b>

### 7.5.3 RBC

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 19. Todas as formulações obtiveram o grau de irritação avaliado como “não irritante” com o emprego do método RBC.

Como observado no método de correlação do índice de desnaturação e hemólise com o possível efeito de irritação ocular *in vitro* (RBC) não foi possível mensurar com precisão o potencial irritante das formulações, uma vez que os filtros solares interferiram na leitura espectrofotométrica por gerar sobrenadante leitoso, o que impediu a leitura exata dos dados. Obteve-se o grau “não irritante” para todas as formulações e respectivos extratos analisados. Este método é comumente utilizado para análise de formas farmacêuticas contendo ativos hidrossolúveis, portanto sugere-se que seja realizada, em estudos posteriores, a adequação na metodologia para aplicação em formulações cosméticas contendo ativos antissolares.

Tabela 19: Graduação dos fenômenos irritantes ( $IC_{50}$ ) e a correlação do índice de desnaturação (ID) com o possível efeito de irritação ocular in vivo (RBC) das formulações e respectivos extratos.

<b>Produto LADEG</b>	<b>Índice de Desnaturação (<math>IC_{50}</math>)</b>	<b>Índice de Irritação</b>	<b>Classificação</b>
<b>LC FPS 15</b>	> 10 %	> 100	<b>Não Irritante</b>
<b>EtOH CA a 1%</b>	> 10 %	> 100	<b>Não Irritante</b>
<b>LC FPS 15 + EtOH CA a 1%</b>	> 10 %	> 100	<b>Não Irritante</b>
<b>WAc a 1%</b>	> 10 %	> 100	<b>Não Irritante</b>
<b>LC FPS 15 + WAc a 1%</b>	> 10%	> 100	<b>Não Irritante</b>

#### 7.5.4 DRAIZE

A graduação dos fenômenos de formação de edema e eritema avaliados para as formulações desenvolvidas: LADEG LC FPS 15; LADEG LC FPS 15 + EtOH CA a 1% e LADEG LC FPS 15 + WAc a 1% e respectivos extratos: EtOH CA a 1% e WAc a 1% em TF salino pH 7,4 e classificação final do grau de irritação de cada formulação encontram-se descritos na Tabela 20.

De acordo com o Manual da Qualidade (INCQS/FIOCRUZ) nº 65.3330.003 item 8, para o ensaio de irritação cutânea primária (ICP), um produto será considerado satisfatório quando for classificado com baixo potencial irritante (não irritante ou irritante leve – ICP compreendido entre 0 e 1,9).



Tabela 20: Graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas nos ensaios de irritação cutânea *in vivo* (DRAIZE).

Produto LADEG	Índice de Irritação Cutânea	
	Primária (ICP)	Classificação
LC FPS 15	1,49	Irritante Leve
EtOH CA a 1%	1,59	Irritante Leve
LC FPS 15 + EtOH CA a 1%	1,89	Irritante Leve
WAc a 1%	1,5	Irritante Leve
LC FPS 15 + WAc a 1%	1,58	Irritante Leve

As formulações desenvolvidas: LADEG LC FPS 15, LADEG LC FPS 15 + EtOH CA a 1% e LADEG LC FPS 15 + WAc a 1% e respectivos extratos: EtOH CA a 1% e WAc a 1% em TF salino pH 7,4 foram considerados satisfatórios, pois os resultados ficaram compreendidos entre 1 e 1,9 (baixo potencial irritante), valores que estão em acordo com o perfil esperado para a segurança de uso das formulações antissolares.

## 7.6 Eficácia das Formulações Antissolares

### 7.6.1 Determinação do FPS *in vitro* por espectrofotometria pelo Método de Mansur e fotoestabilidade em simulador solar

Os resultados do FPS pelo método de Mansur (1986) e da fotoestabilidade em simulador solar das formulações desenvolvidas encontram-se descritos na Tabela 21. A loção cremosa base (LADEG LC FPS 15) contendo somente os filtros solares apresentou o valor de FPS *in vitro* de  $17,0 \pm 0,25$ ; a formulação contendo o extrato EtOH CA a 1 % e os filtros solares incorporados (LADEG LC FPS 15 + EtOH CA a 1 %) apresentou o valor de FPS *in vitro* de  $17,8 \pm 0,77$  e a formulação contendo o extrato WAc a 1 % com filtros solares incorporados (LADEG LC FPS 15 + WAc a 1 %) apresentou o valor de FPS *in vitro* de  $16,9 \pm 0,62$ .

Após a determinação do FPS *in vitro* das formulações foi verificada a fotoestabilidade (conforme descrito no item 5.8 da metodologia). As preparações foram submetidas à radiação em simulador solar, e novamente verificado o FPS. Essa metodologia pode ser utilizada de maneira complementar a determinação do FPS de uma preparação, pois garante a presença dos filtros solares na mesma. O uso do filme de pvc e placa de Petri indicam que esse método é simples, barato, de fácil aquisição e execução.

Tabela 21: Determinação do FPS das formulações pelo método Mansur antes e após irradiação em simulador solar.

<b>Formulação antissolar LADEG</b>	<b>FPS sem radiação</b>	<b>FPS após radiação</b>
<b>LC FPS 15</b>	$17,0 \pm 0,25$	$16,6 \pm 0,22$
<b>LC FPS 15 + EtOH CA a 1%</b>	$17,8 \pm 0,77$	$16,4 \pm 0,01$
<b>LC FPS 15 + WAc a 1%</b>	$16,9 \pm 0,62$	$16,6 \pm 0,13$

\*As formulações não exibiram diferença estatisticamente significativa (Dunn,  $p < 0,05$ ).  
Média  $\pm$  DP (desvio-padrão) de  $n = 3$  determinações.

Foi possível observar que o material utilizado como suporte (pvc e vidro), e o solvente utilizado na extração, não interferiram no resultado do ensaio. Após a radiação houve um decaimento no FPS da formulação, demonstrando o efeito da radiação solar sobre a estabilidade dos filtros solares. O efeito da adição dos extratos EtOH CA e WAc a 1 % na estabilidade dos filtros OMC, OCT e BZF-3 foi positivo, mantendo assim, o FPS constante, ao comparar antes e depois da radiação. A eficiência da fotoproteção é maior quando os filtros solares possuem estabilidade.

### 7.6.2 Determinação do Fator de Proteção UVA *in vitro* antes (FP-UVA<sub>0</sub>) e após a Irradiação (FP-UVA) e Comprimento de Onda Crítico ( $\lambda_c$ )

A Figura 39 mostra os espectros de absorbância no UV obtidos nas três placas analisadas da formulação base LADEG LC FPS 15.

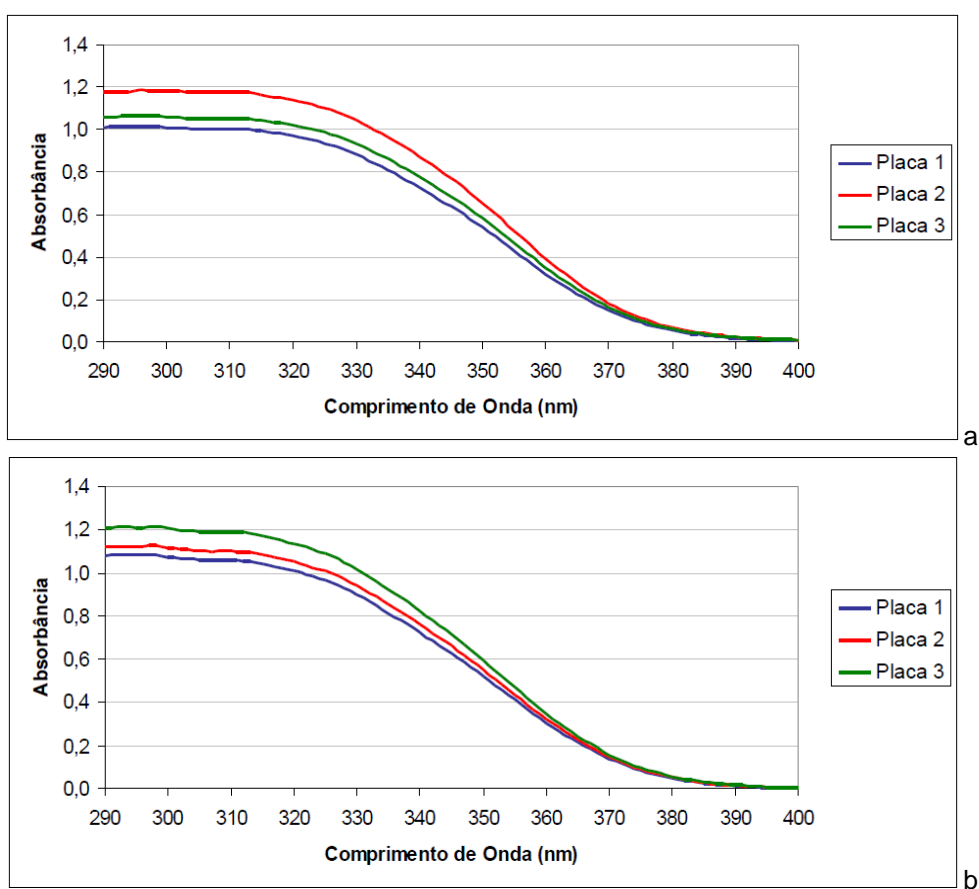


Figura 39: Espectros médios de absorbância no UV para as placas com a formulação LADEG LC FPS 15 aplicada, antes da irradiação (a) e após a irradiação (b).

A Figura 40 mostra os espectros de absorbância obtidos nas três placas analisadas da formulação LADEG LC FPS 15 + EtOH CA a 1 %.

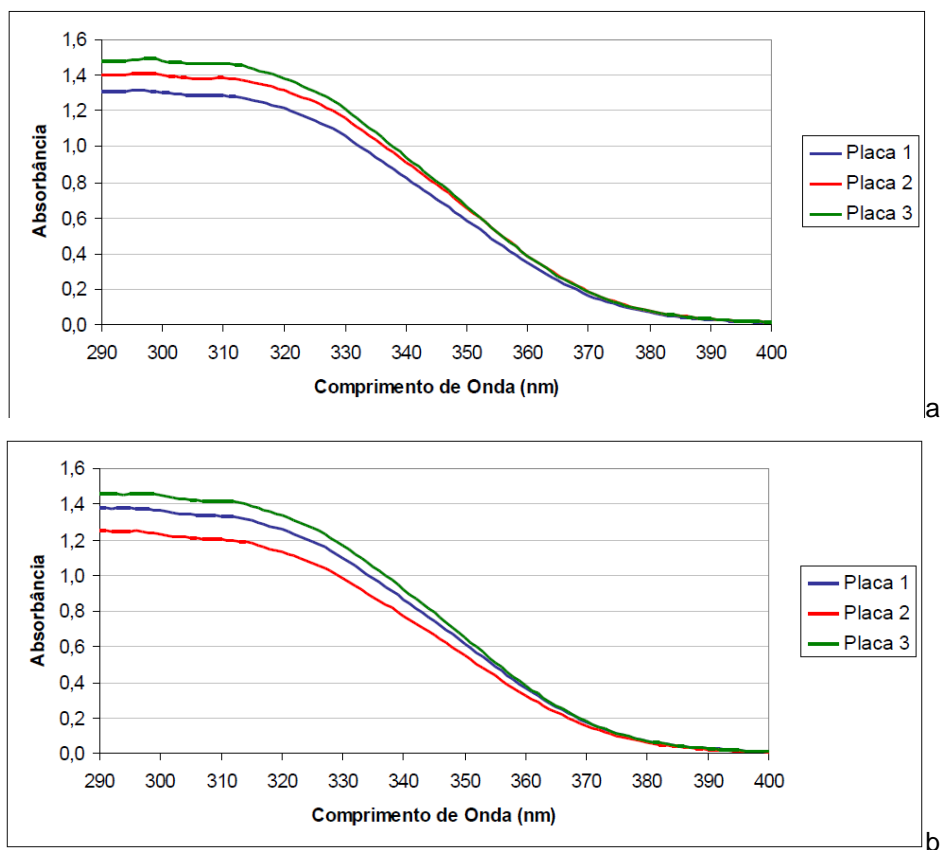
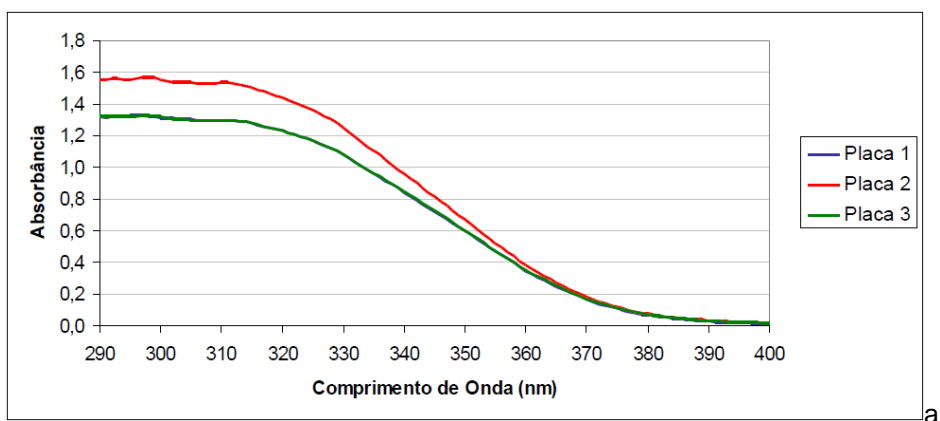


Figura 40: Espectros médios de absorbância no UV para as placas com a formulação LADEG LC FPS 15 + EtOH CA a 1 % aplicada, antes da irradiação (a) e após a irradiação (b).

A Figura 41 mostra os espectros de absorbância obtidos nas três placas analisadas da formulação LADEG LC FPS 15 + WAc a 1 %.



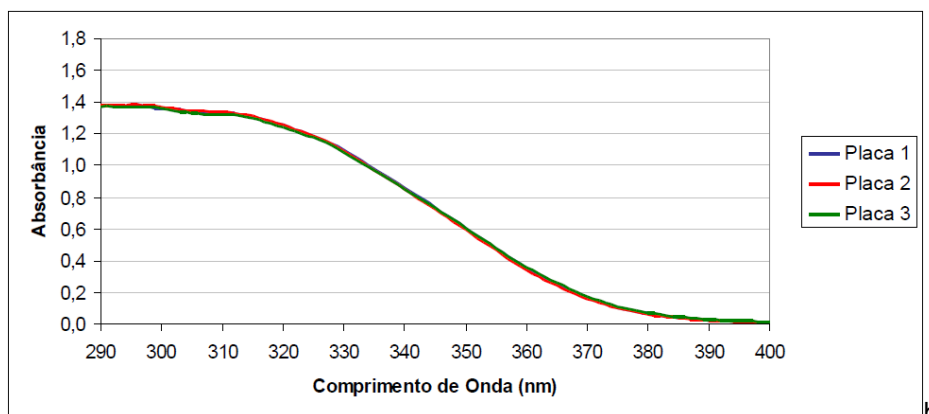


Figura 41: Espectros médios de absorvância no UV para as placas com a formulação LADEG LC FPS 15 + WAc a 1 % aplicada, antes da irradiação (a) e após a irradiação (b).

Na Tabela 22, estão descritos os valores de irradiação aplicados nas três placas de cada formulação, assim como os valores de comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) encontrados para cada formulação após a irradiação.

Tabela 22: Valores irradiação UVA ( $J/cm^2$ ) aplicados nas placas de cada formulação e os valores de comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) após a irradiação.

<b>Formulação antissolar</b>	<b>Dose UVA (<math>J/cm^2</math>)</b>	<b>Comprimento de onda crítico (<math>\lambda_c</math>)</b>
<b>LC FPS 15</b>	$3,15 \pm 0,04$	352 nm
<b>LC FPS 15 + EtOH CA a 1%</b>	$2,99 \pm 0,02$	352 nm
<b>LC FPS 15 + WAc a 1%</b>	$2,93 \pm 0,03$	352 nm

Os valores de comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) devem ser maiores que 370 nm para que, conjugado a outros parâmetros de avaliação, as formulações analisadas sejam consideradas eficazes frente à exposição à radiação UVA. Nos resultados obtidos de  $\lambda_c$ , observa-se que os valores estão abaixo do que se esperava de uma formulação que abrangesse o espectro de radiação UVA. O  $\lambda_c$  é um dos parâmetros utilizados para avaliar a capacidade de proteção UVA do produto, definido como o menor comprimento de onda em que a absorção do produto é igual a 90% da absorção total. Deve-se avaliar outros parâmetros sobre o potencial anti-UVA das formulações para conjugar com esse dado (COLIPA, 2009).

Os valores do FP-UVA das três formulações estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23: Valores de FP-UVA *in vitro* obtidos antes e após a irradiação.

<b>Formulação antissolar</b>	<b>FP-UVA<sub>0</sub> antes da irradiação</b>	<b>FP-UVA após a irradiação</b>
<b>LC FPS 15</b>	2,63 ± 0,03	2,50 ± 0,16
<b>LC FPS 15 + EtOH CA a 1%</b>	2,50 ± 0,01	2,40 ± 0,20
<b>LC FPS 15 + WAc a 1%</b>	2,45 ± 0,01	2,40 ± 0,20

A formulação LC FPS 15 obteve FP-UVA após a irradiação de  $2,50 \pm 0,16$ , enquanto que as formulações LADEG LC FPS 15 + EtOH CA a 1% e LADEG LC FPS 15 + WAc a 1% obtiveram o mesmo valor de  $2,40 \pm 0,20$ . A redução nos valores de FP-UVA após a irradiação foi maior para a formulação LADEG LC FPS 15, os extratos provavelmente auxiliaram na manutenção dos valores de FP-UVA após a irradiação, uma vez que a redução desse valor foi menos significativa quando comparada à formulação sem adição de extratos vegetais ( $p < 0,05$ ). Acredita-se que essa manutenção possa ter sido gerada pela proteção dos ativos frente à fotodegradação, já que esta provavelmente seja uma das características dos antioxidantes incorporados em formulações antissolares (JAIN & JAIN, 2010).

Foi possível observar valores de FP-UVA em torno de 2, esses valores deveriam corresponder a um terço (1/3) do valor do FPS obtido em cada formulação, para que fossem consideradas eficazes frente a exposição à radiação UVA. Porém os valores obtidos podem ser considerados satisfatórios, uma vez que encontram-se em concordância com a legislação vigente que exige o valor de FP-UVA de no mínimo 2, para assegurar a proteção dos usuários frente à exposição à radiação UVA. Portanto as formulações podem ser consideradas também protetoras frente à radiação UVA (COLIPA, 2009).

### 7.6.3 Determinação do FPS *in vivo* – Método COLIPA

Este estudo foi conduzido em conformidade com os princípios da Declaração de Helsinki, e de acordo com as regulamentações aplicáveis, incluindo o ICH E6: Good Clinical Practice. Antes do início da pesquisa, os voluntários na faixa etária de 35 a 55 anos (idade média: 47 anos), fototipo de II a III, foram informados do objetivo do estudo, sua metodologia e duração, e dos benefícios possivelmente esperados e restrições ligadas ao estudo. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado de acordo a Declaração de Helsinki e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa independente, foi assinado pelos voluntários. Os resultados foram anotados em fichas apropriadas. A documentação técnica da pesquisa encontra-se nos arquivos da Allergisa, onde será mantida por um período de 5 anos.

Os valores de FPS *in vivo* a seco para cada voluntário encontram-se descritos na Tabela 24.

Tabela 24: Valores de FPS *in vivo* das formulações desenvolvidas: LADEG LC FPS 15, LADEG FPS 15 EtOH CA a 1 % e LADEG FPS 15 WAc a 1%.

Voluntários	LADEG LC FPS 15	LADEG FPS 15 + EtOH CA a 1 %	LADEG FPS 15 + WAc a 1 %
1	12	15	15
2	17	21,3	17
3	18	16	14,4
4	22,6	12,8	14,4
5	14,4	20	18
6	14,4	20	22,6
7	18	13,6	22,6
8	11,5	20	22,6
9	18	24,9	18
10	11,6	20	14,4
<b>FPS <i>in vivo</i></b>	<b>15,7 ± 3,6</b>	<b>18,4 ± 3,84</b>	<b>17,9 ± 3,53</b>

A formulação LADEG LC FPS 15 apresentou o valor de FPS *in vivo* de 15,7 ± 3,6; a formulação LADEG FPS 15 EtOH CA a 1 % apresentou o valor de FPS *in vivo*

de  $18,4 \pm 3,8$  e a formulação LADEG FPS 15 WAc a 1 % apresentou o valor de FPS *in vivo* de  $17,9 \pm 3,5$ . A formulação LADEG LC FPS 15 o intervalo de confiança (95%) foi de 13,2 a 18,3; para a formulação LADEG FPS 15 EtOH CA a 1 % o intervalo foi de 15,6 a 21,1; para a formulação LADEG FPS 15 WAc a 1 % o intervalo foi de 15,4 a 20,4.

Não houve diferença estatisticamente significativa no valor do FPS *in vivo* obtido nas três formulações desenvolvidas ( $p < 0,05$ ). Os valores de desvio padrão foram elevados provavelmente devido a fatores biológicos, que possuem usualmente grande variabilidade. Acredita-se que esse resultado seja subestimado, pois o atual procedimento de avaliação do FPS *in vivo* especifica a taxa de aplicação em unidade de massa ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ), o que pode resultar em resultados incorretos quando se trata de formulações contendo ingredientes sólidos, os quais alteram a densidade da formulação, conseqüentemente o volume e a espessura aplicados serão subestimados. Herzog (2002) demonstrou o emprego de um método de ajuste para calcular valores reais de FPS *in vitro* e *in vivo* baseado na espessura da película, o qual prevê um aumento no valor de FPS de 50 % quando medido numa película de 20 mm em comparação ao uso da medida de massa ( $2,0 \text{ mg/cm}^2$ ).

Estes extratos colaboraram no aumento do FPS *in vivo* provavelmente pelo seu efeito antioxidante, na captação dos radicais livres reponsáveis pelo aparecimento do eritema. Como foi visto, os extratos das folhas de *B. microstachya* var. *massambabensis* não influenciaram no aumento do FPS *in vitro*, pelo aumento da absorção no UV das preparações, no entanto as formulações contendo os extratos apresentaram-se satisfatórias quanto a fotoestabilidade após irradiação.



## 8. Conclusão:

- ◆ O procedimento para obtenção dos extratos forneceu sete diferentes extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz que demonstraram eficiente atividade antioxidante frente ao extrato padronizado de *Gingko biloba* (EGb 761<sup>®</sup>).
- ◆ Pelo método de captação do radical livre DPPH<sup>\*</sup>, os extratos selecionados foram os seguintes: o etanólico bruto (EtOH bruto), o etanólico clarificado (EtOH CA), o extrato particionado com acetato de etila (AcEt) e o hidroacetônico (WAc). Nos métodos ABTS e ORAC os extratos selecionados também demonstraram eficiente atividade antioxidante frente aos padrões utilizados, tanto em relação ao EGb 761<sup>®</sup> quanto ao Trolox<sup>®</sup>. A utilização de três diferentes métodos *in vitro* permitiu uma avaliação da capacidade antioxidante minuciosa e do comportamento cinético dos extratos obtidos em diversos solventes.
- ◆ Os extratos selecionados extrato etanólico clarificado (EtOH CA) e o hidroacetônico (WAc) foram incorporados na loção cremosa antissolar gerando formulações consideradas satisfatórias nos testes de eficácia e segurança.
- ◆ As formulações exibiram estabilidade frente à radiação, e os resultados foram considerados satisfatórios em todos os testes realizados.
- ◆ A melhor preparação, com relação ao aspecto visual, foi a formulação contendo os filtros sintéticos e o extrato EtOH CA a 1 %.
- ◆ Foi possível concluir que as formulações contendo os extratos foram tão seguras e eficazes em relação à formulação base, pois mantiveram a fotoestabilidade dos ativos além não desencadearem toxicidade.
- ◆ O aumento do FPS não está relacionado à concentração dos extratos, mas à presença deles na formulação. O que foi devidamente comprovado pelo FPS *in vivo* a seco, onde os resultados exibiram maiores valores para as formulações contendo os extratos, sugerindo que a atividade captadora de radicais livres ocorreu na pele humana, devido à presença das substâncias antioxidantes contidas nos extratos.

## 9. Perspectivas:

- ◆ Desenvolvimento de uma formulação contendo o extrato particionado com AcEt.
  
- ◆ Estudos da atividade antioxidante das formulações contendo os extratos através da quimioluminescência detectada na pele humana;
  
- ◆ Eficácia e segurança dos extratos nanoencapsulados incorporados em nova formulação;
  
- ◆ Verificação do possível efeito sinérgico dos extratos adicionados de outros antioxidantes.
  
- ◆ Adequar novos procedimentos de avaliação da eficácia de formulações antissolares mundialmente empregados, para que sejam avaliadas as densidades das formulações e assim seja garantida a espessura ideal das camadas aplicadas, tanto nos ensaios de FPS *in vivo* quanto nos ensaios *in vitro*.

## 10. Referências Bibliográficas:

ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F.; PRESGRAVE, O., A., F.; SABAGH, F., P.; FREITAS, J. C. B. R.; PINTO, A.; **A reassessment of the *in vitro* RBC Haemolysis Assay with Defibrinated Sheep Blood for the Determination of the Ocular Irritation Potential of Cosmetic Products: Comparison with the *in vivo* Draize Rabbit Test.** *Alternatives to laboratory animals*, v. 36, p.275-284, 2008.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A.; **Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17 (2), p. 231-235, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K.; **Methods for testing antioxidant activity.** *Analytic*, v. 127, p. 183-198, 2002.

ARAÚJO, D. S. D. D.; SÁ, C. F. C. D.; FONTELLA-PEREIRA, J.; GARCIA, D. S.; FERREIRA, M. V.; PAIXÃO, R. J.; SCHNEIDER, S. M.; FONSECA-KRUEL, V. S.; **Área de Proteção Ambiental de Massambaba, Rio de Janeiro: caracterização fitofisionômica e florística.** *Rodriguésia*, v. 60 (1), p. 67-96, 2009.

ARAÚJO, E. M.; **Controle de Qualidade de candidatos a novos filtros solares derivados da castanha de caju.** *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas* – Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, 2004.

BADER, S.; CARINELLI, L.; COZZI, R.; COZZOLI, O.; **Natural hydroxyanthracenic polyglycosides as sunscreens.** *Cosmetics & Toiletries*, v. 96, p. 67-74, 1981.

BABY, A. R.; KANEKO, T. M.; PINTO, C. A. S. O.; SARRUF, F. D.; PEDRIALI, C. A.; BALOGH, T. S.; 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 (1), p. 23-27, 2008.

BELO, S. D.; **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Gingko biloba*.** *Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.*

BIANCHI, M. L. P. & ANTUNES, L. M. G.; **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** *Revista de Nutrição*, v. 12 (2), p. 123–130, Campinas, São Paulo, 1999.

BIANCO, E. M. & SANTOS, C. A. M.; **Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13 (2), p. 93-99, 2003.

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 (3), p. 238-241, 2010.

BLOIS, M. S.; **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** *Nature*, v. 181(26), p. 1199-1200, London, 1958.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C.; **Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method.** *Lebensmittel-Wissenschaft und Techonology*, v. 30 (6), p. 609-615, 1997.

BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A.; SILVA, F. A. M.; **Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante.** *Química Nova*, v. 22(1), p. 94-103, 1999.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA - Resolução – RDC nº 237 de 22 de agosto de 2002. **Regulamento técnico sobre protetores solares.** *Diário Oficial da União*, Brasília, 2002.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 de jul. 2009.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, maio de 2004.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA - Resolução – RDC nº 47 de 16 de março de 2006. **Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.** *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 17 mar. 2006. Disponível em: <http://www.e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 09 de dez. 2009.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA - Resolução – RDC nº 14 de 31 de março de 2010. **Registro de medicamentos fitoterápicos.** *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 29 mar. 2010.

CALDERON-MONTANO, J. M.; BURGOS-MORON, E.; PEREZ-GUERRERO, C.; LOPEZ-LAZARO, M.; **A review on the dietary flavonoid kaempferol.** *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, v. 11(4), p. 298-344, 2011.

CHO, E.J.; YOKOZAWA, T.; RHYU, D.Y.; KIM, S.C.; SHIBAHARA, N.; PARK, J.C.; **Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.** *Phytomedicine*, v. 10, p. 544-551, 2003.

CHIAVEGATTO, L. F. S.; BACALTCHUC, M. Y. P.; LIMA, M. T. L.; SANTOS, E. P.; GARCIA, S.; **Avaliação do Fator de Proteção Solar por Método *in vitro*.** *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 71, p. 99–99, 1990.

COLIPA – The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association – **Method for the *in vitro* Determination of UVA Protection provided by Sunscreen Products**, 2007. – Disponível em: <[www.colipa.com](http://www.colipa.com)>. Acesso em: 03/05/2010.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L.; **Changes in ultraviolet absorbance and 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.

DIFFEY, B. L.; **Indices of protection from in vitro assay of sunscreens.** In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects.* New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

DRAIZE, J. H.; GEOFFREY, W.; HERBERT, O. C.; **Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes.** *Journal of Pharmacology Exp. Ther.*, v. 83, p. 377-390, 1944.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno / ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, SP, v. 26 (2), p. 446-452, 2006.

EDLICH, R. F.; WINTERS, K. L.; LIM, H. W.; COX, M. J.; BECKER, D. G.; HOROWITZ, J. H.; NICHTER, L. S.; BRITT, L. D.; LONG, W. B.; **Photoprotection by sunscreens with topical antioxidants and systemic antioxidants to reduce sun exposure.** *Journal of long-term effects of medical implants*, v. 14 (4), p. 317-340, 2004.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; BAH C. S. F.; LIN P.; TSAO S. W.; NG T. B.; ***Bauhinia variegata* var. *variegata* trypsin inhibitor: From isolation to potencial medicinal applications.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 19, p. 56-72, 2003.

FAUCONNEAU, B.; WAFFO, T. P.; **Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests.** *Life Science*, v. 61, p. 2103-2110, 1997.

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 (1), p. 61–68, 1997.

FERREIRA, A. L. A. *et al.*; **Doxorubicin as an antioxidant: Maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 43, p. 740-751, 2007.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKTHAR, H.; **Photochemoprevention of skin câncer by botanical agents.** *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, v. 19, p. 56-72, 2003.

FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J.; **Oxidants, oxidative strêss and the biology of ageing.** *Nature*, v. 408, p. 239-247, 2000.

FREITAS, Z. M. F.; MACHADO, P. A.; ORTIZ, G. M. D.; SANTOS, E. P.; GONÇALVES, J. C. S.; **Evaluation of phototoxicity of sunscreens: 1,2,3-propanetriol 1,3-dipalmitoyl-2-p-methoxycinnamoyl and 1,2,3-propanetriol 1,3-dioctanoyl-2-p-methoxycinnamoyl.** *STP Pharma Sciences.* , v. 10(3), p. 239–242, 2000.

FREITAS, Z. M. F.; GONÇALVES, J. C. S.; SANTOS, E. P.; VERGNANINI, A.; **Glycerid esters of p-methoxycinnamic acid. A new sunscreen of the cinnamate class.** *International Journal of Cosmetic Science.* , v. 23, p. 147–152, 2001.

FUCHS, J.; **Potenciales and limitations of natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and  $\beta$ -carotene in cutaneous photoprotection.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 25, p. 848-873, 1998.



GARCIA, S.; SANTOS, E. P.; SILVA, A. J. R.; GIACOMO, G. C.; SOARES, H. C.; **Aplicação do extrato vegetal de Alecrim em Preparações Anti- Solares.** *Revista de la Ofil – Organización de Farmacéuticos Iberoamericanos* v. 2 (5), p. 309-311, 1992.

GASPAR, L. R. *et al.*; **Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreens.** *International Journal of Pharmacology*, v. 307(2), p. 123-128, 2006.

GEORGETTI, S. R.; VERRI-JR., W. A.; VINCENTINI, F. T. M. C.; CASAGRANDE, R.; FONSECA, M. J. V.; **Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after incorporation in topical formulations.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 64, p. 99-106, 2006.

GIADA, M. L. R. & MANCINI-FILHO, J.; **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos.** *Nutrire*, v. 28, p. 91-107, 2004.

GIADA, M. L. R.; **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada.** *Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos – Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2006.*

GIADA, M. L. R. & MANCINI-FILHO, J.; **Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three *in vitro* methods.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 60, p. 395-401, 2009.

GOMES, A. M. C. M.; **Avaliação da actividade captadora de espécies reactivas de oxigênio e de azoto por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos.** *Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade* – Universidade do Porto - Faculdade de Farmácia, Porto, Portugal, 2005.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y.; **The latest on skin protection.** *Clinics in Dermatology*, v. 26, p. 614-626, 2008.

GOULART, M. O. F.; VALENTIM, B. I.; de OLIVEIRA, C. A.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S.; **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** *Química Nova*, v. 32(3), p. 689-702, 2009.

GOUVÊA, C. M. C. P.; LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS-FILHO, P. R.; **Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16 (4), p. 531-536, 2006.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C.; **Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa.** *Química Nova*, v. 32 (3), p. 717-721, 2009.

HALLIWELL, B.; **Antioxidants and human disease: a general introduction.** *Nutrition Reviews*, v. 55, p. 49-52, 1997.

HARBONE, J. B. & MABRY, T. J.; **The flavonoids: advances in research.** *Chapman and Hall Ltd.*, v.744, Londres,1982.

HAYES, J. E.; ALLEN, P.; BRUNTON, N.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P.; **Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid.** *Food Chemistry*, v. 126, p. 948-955, 2011.

HENRIQUES, J. A. P.; PEREIRA, A. B., SCHRODER, N.; FERRAZ, A., FURTADO, G. V.; BENEVEGNÚ, V. C.; IANISTCKI, M.; OLIVEIRA, I. M.; GUECHEVA, T. N.; SILVA, J. ROSA R. M., PEREIRA, B. K.; **Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models.** *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 96, p.117-129, 2009.

HERZOG, B.; **Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model.** *Journal of Cosmetics Sciences*, v. 53, p. 11-26, 2002.

HIRATA, L. L.; **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum – Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.**

HOLBROOK, K. A.; WOLLF, K.; FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLF, K.; **Dermatology in general medicine – McGraw-Hill – cap. 16, p.241-253, 4 ed., New York, 1993.**

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C.; **Princípios Ativos de Plantas Superiores – EdUFSCAR v. 4, p. 38-40, 43-56, São Paulo, 2003.**

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. **Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 1815-1821, 2002.

INVITOX; Protocol Number 108. **CAM-TBS test.** *European Center for the Validation of Alternative Methods ECVAM*, 1996.

JAIN, S. K. & JAIN, N. K.; **Multiparticulate carriers for sun-screening agents.** *International Journal of Cosmetic Science*, v. 32, p. 89-98, 2010.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTINI, M. C.; **Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate.** *International Journal of Pharmacology*, v. 272, p. 45-55, 2004b.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C.; **Poly-epsilon-caprolactone nanoparticle containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization.** *Pharm. Dev. Tech.*, v. 9, p. 329-339, 2004a.

Journal Officiel de La République Française – Arrêté du 29 Novembre 1996. **Relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaire aux contrôles des produits cosmétiques.**

KHURY, E. & NAKANO, A.; **Novo método para avaliar protetores solares UV-A.** *Revista de Cosméticos e Tecnologia Cosmetics & Toiletries Brasil* v. 19 (3), p.116-119, 2007.

KOROUNAKIS, A. P.; REKKA, E. A.; KOROUNAKIS, P. N.; **Antioxidant activity of guaiazulene and protection against paracetamol hepatotoxicity in rats.** *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, v. 49, p. 938-942, 1997.

KUREBAYASHI, A. K. & MATHEUS, L. G. M.; **A radiação Ultravioleta e sua influência na pele e cabelos.** *Tecnopress : Associação Brasileira de Cosmetologia* – São Paulo, 2002.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25 (4), p. 726-732, 2005.

LAGARTO, A.; VEGA, R.; GUERRA, I.; GONZÁLEZ, R.; **In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test.** *Toxicology in Vitro*, v. 20, p. 699-702, 2006.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P.; **Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges.** *Progress in Lipid Research*, v. 46, p. 244-282, 2007.

LAMBERT, D.; **Et les produits solaires.** *Bulletin de la Société de Pharmacie de Lille*, nº 2, 1982.

LEO, R. R. T.; **Atividade Biológica e Análises Química e Morfológica de duas variedades de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinioideae) - Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania, CCS, Rio de Janeiro, 2005.**

LIEBSCH, M. & SPIELMAN, H.; **Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology.** *Toxicology Letters*, v. 127, p. 127-134, 2002.

LIM, Y-Y.; GOH, J-K.; CHEW, Y-L.; **Assesment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia.** *Food Chemistry*, v. 116, p.13-18, 2009.

LIU, ZAI-QUN; **Chemical methods to evaluate antioxidant ability.** *Chemical Reviews*, v. 110, p. 5675-5691, 2010.

MAMBRO, V. M. D. & FONSECA, M. J. V.; **Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, p. 287-295, 2005.

MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; TRONCOSO, A. M.; ASUERO, A. G.; KUSKOSKI, E. M.; **Aplicação de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25 (4), p. 726-732, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria.** *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 3 (61), p. 121-124, 1986.

MARCUCCI, M. C. & CAIEIRO, D. M.; **Composição química e atividade antioxidante de formulações comerciais contendo *Ginkgo biloba* L..** *Revista Fitos*, v. 5(3), 2010.

MARTINI, M.C. & SEILLER, M.; **Actifs et additifs en Cosmetologie.** Paris, *Technique & Documentation*, 2006.

MENEZES, F. S. & VICENTINO, A. R. R.; **Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácia com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.27 (3), p. 384-387, 2007.

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, 2004.

MENSOR, L. L.; **Avaliação da atividade antioxidante em plantas brasileiras –** *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas* - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

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

MONTEIRO, M. S. S. B.; **Filtros Solares em Nanocosméticos-Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia** - *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas*, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

NEVES, K.; **Espectro Solar, Sol e origem da radiação eletromagnética**. Tecnopress – *Edição Temática: Proteção Solar*, nº7, Ano 3, p.10-13, 2008.

NIKI, E.; **Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo***. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 503-515, 2010.

NORDLUNG, J. J.; BOISSY, R. E.; ACARING, V. J.; KING, R. A.; OETTING W. S.; ORTONNE, J. P.; **The pigmentary system** – *Blackwell Publishing - Oxford University Press* - 2 ed., Reino Unido, 2006.

OKUNO, E. & VILELA, C. A. P.; **Radiação Ultravioleta: Características e Efeitos**. *Ed. Livraria da Física*. São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, F. M.; FONSECA, Y. M.; FONSECA, M. J. V.; **Desenvolvimento de formulações tópicas antioxidantes**. *Revista de Cosméticos e Tecnologia Cosmetics & Toiletries* - Brasil, v. 20 (4), p. 64-68, 2008.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH, W. M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K.; **Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, p. 3122-3128, 2002.



OU, B.; HAMPSCH, W. M.; PRIOR, R. L.; **Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OZGEN, M.; REESE, R. N.; TÚLIO-JR., A. Z.; SCHEERENS, J. C.; MILLER, A. R.; **Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 1151-1157, 2006.

PATHAK, M. A.; **Photobiology of melanin pigmentation.** *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 9, p. 724-733, 1983.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays.** *Food Research International*, v. 39, p. 791-800, 2006.

PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA, S.; **Effect of nanoparticles encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate.** *International Journal of Pharmarmaceutics*, v. 246, p. 37-46, 2002.

PERUGINI, P., VETTOR, M., TURSILLI, R.; **Technological strategies to improve photostability of a sunscreen agent.** *Journal of Applied Cosmetology*, v.23, p. 61-71, 2005.

PETROVICK, P. R.; MENTZ, L. A.; de MELLO, J. C. P.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O.; **Farmacognosia - Da planta ao medicamento**. 5ª ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, Porto Alegre/ Florianópolis, cap. 23, p. 577-614, 2004.

PEYREFITTE, G.; **Dermocosmética y Estética - Biología de la piel.**, Masson, Barcelona, Espanha, cap. 5, p. 69-75, 1995.

PIETTA, P.; **Flavonoids as antioxidants**. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PODDA, M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M.; **Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing**. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 26, p. 578-582, 2001.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; **In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods**. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 27, p. 1173-1181, 1999.

PROSERPIO, G.; **Natural sunscreens: vegetable derivatives as sunscreens and tanning agents**. *Cosmetics & Toiletries*, v. 91(3), p. 34-46, 1976.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F.; **Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant Power assay**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p.3396-3402, 2000.

RANGEL, V. L. B. I. & CORRÊA, M. C.; **Fotoproteção**. *Cosmetics & Toiletries*, v. 14, p. 88-95, 2002.

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E. P.; ORTIZ, G. M. D.; **Photoprotective activity and preliminary studies on photodegradation of *Aloe* spp. and *Hamamelis virginiana* extracts**. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, Araraquara, v. 24 (2), p.179-187, 2003.

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E. P.; SILVA, A. B.; LEITÃO, A. C.; ORTIZ, G. M. D.; **Avaliação fototóxica e screening mutagênico de extratos de própolis, *Aloe* spp. e *Hamamelis virginiana***. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 26 (2), p. 105-111, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.; **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decolorization assay**. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26 (9/10), p. 1231-1237, 1999.

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**. *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas* – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

RIVELLI, D. P.; ROPKE, C. D.; de ALMEIDA, R. L.; da SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; WASICKY, A.; KATO, E. T. M.; BACHI, E. M.; BARROS, S. B. de MORAES; **Atividade antioxidante de extratos de *Passiflora* sp (maracujá) por ORAC**. *Cosmetics & Toiletries*, v. 20 (4), p. 54-59, 2008.

ROCHA, L. M.; **Cuidados na preparação de medicamentos com extratos padronizados de *Ginkgo biloba***. *Infarma*, v. 18(11/12), p. 28-31, 2006.

ROSA, M. B.; OLIVEIRA, T. G.; CARVALHO, C. A.; SILVA, F. D.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; PERES, R. L.; **Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus***. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 5, p.101-110, 2008.

ROUANET, J-M.; DECORDÉ, K.; DEL-RIO, D.; AUGER, C.; BORGES, G.; CRISTOL, J-P.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A.; **Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters**. *Food Chemistry*, v. 118, p. 266-271, 2010.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E. S. de; MORAIS S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D.; **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. *Comunicado on line* nº 127 EMBRAPA, 2007a.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E. S. de; MORAIS S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D.; **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>**. *Comunicado on line* nº 127 EMBRAPA, 2007b.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J.; **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil.** *Food Chemistry*, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SALATINO, A.; **Morfologia, Anatomia e Fitoquímica da folha de *Bauhinia holophylla* (Bongard) Steudel** – *Dissertação de Mestrado em Botânica*, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1976.

SANTOS, A. B. dos; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da SILVA; SANTOS, L. A.; SCHIMDT, T. M.; BAFFA, O.; **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 (8), p. 1483-1492, 2009.

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, p. 1-5, 1999.

SANTOS, G. B.; **Açaí (*Eutherpe olareacea*): aspectos químicos e farmacológicos.** *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SARVEIYA, V.; RISK S.; BENSON H. A. E.; **Skin penetration and systemic absorption of sunscreens after topical application** – *Journal of American Academy of Dermatology*, v.50 (3), p. 75-75, 2004.

SCOTT, L. *et al.*; **A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using bottom-up and top-down approaches.** *Toxicology in vitro*, v.24, p. 1-9, 2010.

SCOTTI, L. & VELASCO, M. V. R.; **Envelhecimento cutâneo à luz da Cosmetologia.** *Tecnopress Ed. E Publicidade* – 1. ed. – São Paulo, 2003.

SHAATH, N. A.; **The Encyclopedia of Ultraviolet Filters.** *Ed: Allured Publishing Corporation*, New York, U.S., 2007.

SILVA, K. L. da & CECHINEL-FILHO, V.; **Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico** - *Química Nova*, v. 25 (3), p. 449-454, 2002.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; RENNÓ, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO, A. B. M.; NOGUEIRA, F. L. P.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F. M.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A.; **Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants.** *Pharmacological Research*, v. 52, p. 229-233, 2005.

SILVA, E. G. da; BEHR, G. A., ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M. A. B., RAVAZOLLO, L. G.; BORDIGNON, C. L. J.; SILVA, F. A.; ABOY, A. L.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T.; REGINATTO, F. H.; PIZZOL, F. D.; MOREIRA, J. C. F.; **Antioxidant activities and free radical scavenging potencial of *Bauhinia michrostachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content** – *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30 (8), p. 1488–1496, 2007.

SOUZA, P. A. de; SILVA, C. G.; MACHADO, B. R. P.; de LUCAS, N. C.; LEITÃO, G. G.; ELEUTHERIO, E. C. A.; ORTIZ, G. M. D.; BENCHETRIT, L. C.; **Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolates compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20 (6), p. 922-928, 2010.

U.S.FDA/CDER; **Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation.** Department of health and human Services – Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research, 1997.

VAZ, A. M. S. F.; **Trepadeiras do gênero *Bauhinia* (Caesalpiniaceae) no Estado do Rio de Janeiro.** *Pesquisas Botânicas*, nº 44, p. 95-114, 1993.

VAZ, A. M. S. F. & MARQUETE, R.; **O gênero *Bauhinia* L. (Leguminosa-Caesalpinioideae): Taxonomia das espécies ocorrentes em Brasília, DF.** In: *Resumos do XLII Congresso Nacional de Botânica*, Goiânia: Sociedade Botânica do Brasil, 1991.

VAZ, A. M. S. F.; **Considerações sobre a taxonomia do gênero *Bauhinia* L. Sect *Tylotaea* Vogel (Leguminosa-Caesalpinioideae) do Brasil.** *Rodriguésia* v. 31, p. 127-234, 1979.

WORTH, A.P. & BALLS, M.; **The role of ECVAM in promoting the regulatory acceptance of alternative methods in the European Union.** *Altern. Lab. Anim.*, v. 29, p. 525-535, 2001.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; **Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.** *Biochemistry Pharmacology*, v. 56, p. 213-222, 1998.

YOSHIDA, T.; MORI, K.; HATANO, T.; **Studies on inhibition mechanism of antioxidation by tannins and flavonoids versus radical scavenging effects of tannins and related polyphenols in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.** *Chemistry Pharmacological Bulletin*, v. 37 (7), p. 1919-1921, 1989.



## Lista de Sites

<<http://www.beltina.org/health-dictionary/fitzpatrick-skin-type-classification.html>>- Acesso em 06/07/2011.

<<http://www.darwinstable.com/2010/07/21/free-radicals-why-they-matter/>> - Acesso em 21/07/2011.

<<http://laurielyandrade.blogspot.com/>> - Acesso em 06/07/2011.

<<http://www.natural-cures-for.com/herbs/gingko-biloba>> - Acesso em 21/07/2011.

<<http://no2tanning.info/premature> - Acesso em 20/07/2009.

<<http://www.plantsystematics.org/imgs/> - Acesso em 21/07/2011.

<<http://stopthesun.com/blog/wp-content/uploads//ew.jpg>> - Acesso em 06/07/2011.

<<http://www.who.int/uv/health/uv>> - Acesso em 12/08/2011.

<[http://en.wikipedia.org/wiki/Francisco\\_Goya](http://en.wikipedia.org/wiki/Francisco_Goya)> - Acesso em 01/07/2011.

Portal INCA: <<http://www.inca.org.br>> - Acesso em 02/02/2009.

Portal SKINCÂNCERFOUNDATION: <<http://www.skincancer.org/2008-Skin-Cancer-Facts.html>> - Acesso em 02/02/2009.

Portal SBD: <<http://www.sbd.org.br/publico/cancer/indice.aspx>> - Acesso em 12/09/2009.