



UNIVERSIDADE ESTATUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS de emulsões
contendo filtros químicos e extratos vegetais de espécies
do gênero *Byrsonima***

Elida Caroline de Mello Rodrigues

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara-SP
2020



UNIVERSIDADE ESTATUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS de emulsões contendo filtros químicos e extratos vegetais de espécies do gênero *Byrsonima*

Elida Caroline de Mello Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Vera Lucia Borges
Isaac

Araraquara-SP
2020

R696a

Rodrigues, Elida Caroline de Mello.

Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS de emulsões contendo filtros químicos e extratos vegetais de espécies do gênero *Byrsonima* / Elida Caroline de Mello Rodrigues. – Araraquara: [S.n.], 2020. 101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. *Byrsonima*. 2. Fotoproteção. 3 Fotoestabilidade. 4. Antioxidante. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

AGRADECIMENTOS

À **CAPES**, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

À Profa. **Dra. Vera Lucia Borges Isaac** por ter me aberto as portas do Laboratório de Cosmetologia, para me orientar e dividir comigo suas experiências em cosmetologia

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Prof. **Dr. Marcos Antonio Corrêa**, Prof. **Dr. André Gonzaga dos Santos**, Profa. **Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli**, Profa. **Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin** e, do Instituto de Química, Profa. **Dra. Sandra Helena Pulcinelli**, por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao professor **Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida**, do Departamento de Botânica da UNESP de Botucatu/SP, **Dra. Angélica Lino Rodrigues** e **Marília Quinalha**, que cederam as folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

À **Dra. Maria Candida Henrique Mamede**, do Instituto de Botânica- Herbário de São Paulo, por ter identificado a exsicata da espécie vegetal *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

Aos técnicos e responsáveis de laboratório: **Caio, Ilza, Angélica e Daniele** que me ajudaram no manuseio dos equipamentos

A todos os **amigos do Laboratório de Cosmetologia**: Any, Bruna Figueiredo, Gabriela, Júlia, Danieli, Fernanda, Jéssica, Bruna Rosa e Laís, que me incentivaram, tiraram minhas dúvidas e me ensinaram muitas coisas. Agradeço, também, pelo companheirismo, risadas e amizade.

E a todos os amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, minha família e aos amigos que fiz na igreja!

Muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o SENHOR, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué 1:9).

RESUMO

Devido aos altos índices de radiação ultravioleta no Brasil, o número de casos de câncer de pele tem aumentado, consideravelmente, nos últimos anos. Com isso, cresce, também, a busca por fotoprotetores eficientes que sejam menos agressivos, tanto para os consumidores, quanto para o meio ambiente. Uma alternativa encontrada foi a adição de ativos naturais a essas formulações fotoprotetoras como, por exemplo, extratos e óleos de espécies vegetais, contendo compostos capazes de aumentar o fator de proteção solar (FPS), sem acrescentar maiores quantidades de filtros orgânicos de efeito químico. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um fotoprotetor contendo filtros orgânicos de efeito químico e extratos de espécies vegetais do gênero *Byrsonima*, a fim de avaliar um possível efeito fotoestabilizador no FPS desta emulsão fotoprotetora. Para isso, foram obtidos extratos etanólicos 70° GL das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss e *Byrsonima pachyphylla* A. Juss, os quais foram analisados, por varredura espectrofotométrica, para verificar o potencial fotoprotetor. Também, foi determinado o teor de compostos fenólicos; avaliado o potencial antioxidante, pelas metodologias de inibição do radical DPPH• e de inibição do radical ABTS•⁺; citotoxicidade em células HepG2, HaCaT e HDFa. Ainda, foi desenvolvida uma emulsão fotoprotetora, na qual os extratos de *Byrsonima* foram incorporados, separadamente, para avaliar o fator de proteção solar, além de avaliar a estabilidade destas formulações. Os resultados obtidos mostraram que os extratos etanólicos 70° GL de *Byrsonima* apresentaram atividade antioxidante, potencial fotoprotetor contra os raios ultravioleta e efeito fotoestabilizador quando adicionados em um fotoprotetor contendo filtros orgânicos de efeito químico. As emulsões fotoprotetoras desenvolvidas se mantiveram estáveis. Além disso, foi constatada a presença de compostos fenólicos totais em ambos os extratos e não houve citotoxicidade elevada nas células HepG2 nas concentrações testadas. Diante disso, é possível notar que esses extratos apresentam grande potencial de aplicação em cosméticos fotoprotetores.

Palavras-chave: *Byrsonima*. Fotoproteção. Fotoestabilidade. Antioxidante.

ABSTRACT

Due to the high rates of ultraviolet radiation in Brazil, the number of skin cancer cases has increased considerably in recent years. As a result, the search for efficient photoprotectors that are less aggressive, both for consumers and for the environment, grows. An alternative found was the addition of natural actives to these photoprotective formulations such as, for example, extracts and oils from plant species, containing compounds capable of increasing the sun protection factor (SPF), without adding greater quantities of organic filters with a chemical effect. In this context, the objective of the present study was to develop a photoprotector containing organic filters with chemical effect and extracts of plant species of the genus *Byrsonima*, in order to evaluate a possible photo-stabilizing effect on the SPF of this photoprotective emulsion. For that, 70° GL ethanolic extracts were obtained from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss and *Byrsonima pachyphylla* A. Juss, which were analyzed by spectrophotometric scanning to verify the photoprotective potential. Also, the content of phenolic compounds was determined; the antioxidant potential was evaluated using the DPPH• radical inhibition and ABTS•⁺ radical inhibition methodologies; cytotoxicity in HepG2, HaCaT and HDFa cells. Also, a photoprotective emulsion was developed, in which the *Byrsonima* extracts were incorporated, separately, to evaluate the sun protection factor, in addition to evaluating the stability of these formulations. The results obtained showed that 70° GL *Byrsonima*'s ethanol extracts showed antioxidant activity, potential photoprotection against ultraviolet rays and photo-stabilizing effect when added to a photoprotector containing organic filters with chemical effect. The developed photoprotective emulsions remained stable. In addition, the presence of total phenolic compounds was found in both extracts and there was no high cytotoxicity in HepG2 cells at the concentrations tested. Therefore, it is possible to note that these extracts have great potential for application in photoprotective cosmetics.

Keywords: *Byrsonima*. Photoprotection. Photostability. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da penetração da radiação ultravioleta na pele.....	18
Figura 2. Incidência de radiação solar sobre a pele desprotegida e da pele protegida por filtros orgânicos e inorgânicos.....	22
Figura 3. Folhas e flores de <i>Byrsonima pachyphylla</i> A. Juss.....	30
Figura 4. Folhas e flores de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	30
Figura 5. Representação da placa de 96 poços.....	37
Figura 6. Equipamento Optometrics SPF 290S.....	39
Figura 7. Preparo do material vegetal.....	43
Figura 8. Preparo do extrato dividido em etapas de 1 a 4.....	45
Figura 9. Varredura espectrofotométrica dos extratos de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss e <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	46
Figura 10. Perfil espectrofotométrico do filtro Ethylhexyl Methoxycinnamate.....	48
Figura 11. Perfil espectrofotométrico do filtro Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine.....	48
Figura 12. Perfil espectrofotométrico do filtro Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine [•] , active amount.....	49
Figura 13. Varredura espectrofotométrica da combinação dos filtros Ethylhexyl Methoxycinnamate, Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine e Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine [•] , active amount.....	50
Figura 14. Varredura espectrofotométrica dos extratos de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss nas quatro estações do ano.....	51
Figura 15. Reação da atividade sequestrante do radical DPPH [•] pelos extratos etanólicos de <i>Byrsonima</i>	52
Figura 16. Atividade sequestrante do radical DPPH [•] pelo extrato etanólico 70°GL de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss.....	53
Figura 17. Atividade sequestrante do radical DPPH [•] pelo extrato etanólico 70°GL de <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	54
Figura 18. Perfil de captura do radical DPPH [•] pelo ácido gálico.....	55
Figura 19. Atividade sequestrante do radical ABTS ^{•+} pelos extratos etanólicos 70°GL de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss e <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	57

Figura 20. Perfil de captura do radical ABTS ^{•+} pelo trolox.....	57
Figura 21. Estrutura química dos radicais DPPH [•] e ABTS ^{•+}	58
Figura 22. Curva analítica do ácido gálico para determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	59
Figura 23. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HDFa, após tratamento com extrato <i>B. pachyphylla</i> A. Juss.....	64
Figura 24. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HDFa, após tratamento com extrato <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	64
Figura 25. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HaCaT, após tratamento com extrato <i>B. pachyphylla</i> A. Juss.....	65
Figura 26. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HaCaT, após tratamento com extrato <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	65
Figura 27. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HepG2, após tratamento com extrato <i>B. pachyphylla</i> A. Juss.....	66
Figura 28. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HepG2, após tratamento com extrato <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	66
Figura 29. Dia 1 das emulsões desenvolvidas, sendo 1) Creme base; 2) Fotoprotetor com filtros orgânicos de efeito químico; 5) Fotoprotetor com extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5%.....	73
Figura 30. Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5% em A) 25±2° C, B) 40±2° C e C) 5±2° C após 15 dias de análise.....	73
Figura 31. Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5% em A) 25±2° C, B) 40±2° C e C) 5±2° C após 30 dias de análise.....	74
Figura 32. Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5% em A) 25±2° C, B) 40±2° C e C) 5±2° C após 70 dias de análise.....	74
Figura 33. Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5% em A) 25±2° C, B) 40±2° C e C) 5±2° C após 90 dias de análise.....	74
Figura 34. Valores de pH da emulsão base.....	75

Figura 35. Valores de pH da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5%.....	75
Figura 36. Valores de pH da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico.....	76
Figura 37. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s ⁻¹) da emulsão base submetida a condições de estresse durante o período de avaliação da estabilidade.....	77
Figura 38. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s ⁻¹) da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5% submetida a condições de estresse durante o período de avaliação da estabilidade.....	77
Figura 39. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s ⁻¹) da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico submetida a condições de estresse durante o período de avaliação da estabilidade.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmula das emulsões desenvolvidas.....	40
Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão das absorbâncias, em diferentes comprimentos de onda, dos extratos de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss e <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	47
Tabela 3. Quantidade de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de folhas de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss e <i>B. intermedia</i> A. Juss.....	59
Tabela 4. Comparação entre os teores de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico de diferentes autores e os obtidos neste trabalho.....	62
Tabela 5. Componentes das emulsões desenvolvidas e suas funções.....	68
Tabela 6. Fator de proteção solar das emulsões desenvolvidas.....	70
Tabela 7. Valores de FPS das emulsões desenvolvidas.....	79

LISTA DE QUADOS

Quadro 1. Filtros solares aprovados pelo Mercosul e suas respectivas concentrações máximas permitidas.....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABIHPEC: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ABTS^{•+}: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B. intermedia A. Juss.: *Byrsonima intermedia* A. Juss.

B. pachyphylla A. Juss.: *Byrsonima pachyphylla* A. Juss

DEM: Dose eritematogênica mínima

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsufóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPPH[•]: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila;

ERO: Espécie reativa de oxigênio

IC₅₀: Concentração capaz de provocar morte celular em 50%

INCA: Instituto Nacional de Câncer

INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

FDA: *Food and Drug Administration*

FPS: Fator de proteção solar

°GL: Graus *Gay Lussac*

HaCaT: *Human immortalized keratinocytes*

HDFa: *Human Dermal Fibroblasts adult*

HepG2: *Liver Hepatocellular Carcinoma*

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

q.s.p.: quantidade suficiente para

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: rotação por minuto

SBD: Sociedade Brasileira de Dermatologia

SPF: *Sun Protection Factor*

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. A pele.....	16
2.2. Radiação ultravioleta.....	17
2.3. Radicais livres.....	19
2.4. Antioxidantes.....	20
2.5. Fotoprotetores.....	21
2.6. Extratos vegetais e o mercado dos cosméticos fotoprotetores.....	26
2.7. Compostos fenólicos.....	27
2.8. Espécies vegetais do gênero <i>Byrsonima</i>	28
3. OBJETIVO.....	31
3.1. Objetivos Específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Material e equipamentos.....	32
4.2. Métodos.....	33
4.2.1. Preparo do material vegetal.....	33
4.2.2. Obtenção dos extratos.....	33
4.2.2.1. Maceração.....	33
4.2.2.2. Rotaevaporação.....	33
4.2.2.3. Liofilização.....	33
4.2.3. Avaliação do potencial fotoprotetor dos extratos por varredura espectrofotométrica.....	34
4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	34
4.2.4.1. Metodologia de inibição do radical DPPH•.....	34
4.2.4.2. Metodologia de inibição do radical ABTS• ⁺	35
4.2.5. Análise de compostos fenólicos totais.....	36
4.6. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de folhas do gênero <i>Byrsonima</i>	36
4.7. Desenvolvimento das emulsões.....	38
4.8. Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS da emulsão fotoprotetora contendo extrato de folhas do gênero <i>Byrsonima</i>	39
4.9. Estudo de estabilidade das emulsões.....	41
4.9.1. Teste de centrifugação.....	41

4.9.2. Avaliação macroscópica.....	41
4.9.3. Determinação do pH.....	41
4.9.4. Determinação da viscosidade.....	42
4.9.5. Determinação do fator de proteção solar (FPS) e avaliação do efeito fotoestabilizador.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Preparo do material vegetal.....	43
5.2. Obtenção dos extratos.....	43
5.3. Avaliação do potencial fotoprotetor dos extratos por varredura espectrofotométrica.....	45
5.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	52
5.4.1. Metodologia de inibição do radical DPPH [•]	52
5.4.2. Metodologia de inibição do radical ABTS ^{•+}	56
5.5. Análise de compostos fenólicos totais.....	58
5.6. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de folhas do gênero <i>Byrsonima</i>	63
5.7. Desenvolvimento das emulsões.....	67
5.8. Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS das emulsões fotoprotetoras contendo extrato de <i>Byrsonima</i>	70
5.9. Estudo de estabilidade das emulsões.....	72
5.9.1. Teste de centrifugação.....	72
5.9.2. Avaliação macroscópica.....	72
5.9.3. Determinação do pH.....	74
5.9.4. Determinação da viscosidade.....	76
5.9.5. Determinação do fator de proteção solar (FPS) e avaliação do efeito fotoestabilizador.....	78
6. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO – Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos.....	94

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem registrado elevados índices de radiação solar e, em consequência disso, elevadas taxas de radiação ultravioleta (UV), colaborando com o aumento de número de casos de câncer de pele no país, devido, principalmente, à posição geográfica que ocupa.

A classificação das radiações eletromagnéticas da luz solar é realizada de acordo com o intervalo de comprimento de onda e com a frequência da radiação. A radiação UV, por exemplo, de 280 a 400 nm, traz benefícios, como produção de melanina e vitamina D3, além de auxílio no tratamento de doenças dermatológicas.

Por terem efeito cumulativo, os danos causados pela radiação UV aceleram o processo de envelhecimento, podendo contribuir, também, para o aparecimento de câncer de pele. Estes danos podem ser edemas, eritemas, distúrbios imunológicos, danos ao DNA, ativação de proteínas de estresse, aumento de espécies reativas de oxigênio, as EROs; redução da eficácia de sistemas antioxidantes naturais, edemas e eritemas, uma vez que é capaz de penetrar em diferentes camadas celulares da pele

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, (INCA), para os anos de 2018 e 2019, ocorreriam 85.170 novos casos de câncer de pele não melanoma em homens e 80.410 em mulheres, no Brasil. Devido a esses dados, há que se buscar alternativas para promover um aumento da capacidade fotoprotetora dos filtros solares, que tenham, concomitantemente, capacidade antioxidante, sem provocar irritabilidade e sem causar danos ao meio ambiente.

Nas últimas décadas, o mercado de fotoprotetores tem se voltado para a multifuncionalidade, na busca de um componente que não seja, apenas, um bom filtro da radiação UV, de amplo espectro, foto estável e não tóxico, mas, também, de agregado valor cosmético. Assim, a busca e o uso de matérias primas vegetais, que apresentem atividade fotoprotetora ou capacidade de aumentar o FPS dos filtros orgânicos de efeito químico, têm sido alvos para pesquisas.

Em vista disso, extratos e óleos vegetais têm sido utilizados em produtos cosméticos a fim de auxiliar na proteção contra a radiação UV e neutralizar os radicais livres produzidos na pele após a exposição ao sol.

Na tentativa de contribuir com soluções para esta problemática, este trabalho sugere a incorporação de extratos de espécies vegetais do gênero *Byrsonima* em emulsões fotoprotetoras.

O extenso uso das espécies vegetais desse gênero motivou vários trabalhos acerca da constituição química e do potencial farmacológico dessas espécies, interesse que tem aumentado nos últimos anos. Dessa forma, esta pesquisa visou analisar e caracterizar o potencial do efeito fotoestabilizador do FPS de uma emulsão fotoprotetora contendo filtros orgânicos de efeito químico e extratos de *Byrsonima*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A pele

A pele forma a superfície externa do corpo, constituindo por volta de um sexto do peso corporal total, o que a torna o maior órgão do corpo humano. Ela é formada pela epiderme, uma porção epitelial de origem ectodérmica, e a derme, porção conjuntiva de origem mesodérmica. Dentre as múltiplas funções da pele, estão a proteção contra lesões mecânicas, químicas e térmicas, produção e excreção de metabólitos, termorregulação e detecção de estímulos sensoriais. Além disso, na pele, especificamente na epiderme, é produzido e acumulado um pigmento chamado melanina, responsável por proteger o corpo contra os raios UV (CORRÊA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Epiderme

A epiderme, camada mais externa do corpo, é constituída por epitélio estratificado basal, pavimentoso queratinizado, composto principalmente de queratinócitos, responsáveis pela renovação, coesão e barreira da epiderme. Além dos queratinócitos, a epiderme apresenta mais três tipos de células: melanócitos, células de Merkel e células de Langherans. A epiderme se renova a cada 15 a 30 dias dependendo da região do corpo, da idade e de influências externas (CHIARI, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

As células epiteliais estão dispostas em cinco camadas: camada basal ou germinativa, onde há constante renovação celular; camada espinhosa, a qual confere à epiderme uma manutenção na coesão das células e resistência ao atrito; camada granulosa, onde se forma uma barreira impermeável contra a entrada de substâncias e a saída de água; camada lúcida, encontrada apenas nas regiões palmar e plantar e, por fim, camada córnea, a qual tem espessura muito variável e suas células não viáveis são achatadas, anucleadas e desidratadas (GARCIA, 2014; MADISON, 2003).

A formação do estrato córneo, é a principal função da epiderme pois, além de auxiliar na manutenção da hidratação cutânea, essa camada também controla a penetração de substâncias externas. Essa barreira é formada por lamelas lipídicas proteicas, presentes nos espaços extracelulares, entre os corneócitos. Outra função importante da epiderme é a proteção contra a radiação solar, seja por difração e/ou reflexão da energia radiante. Isso ocorre graças aos melanócitos, onde é produzida e armazenada a melanina, responsável pela coloração da pele e proteção contra os raios ultravioleta (CORRÊA, 2012).

Derme

A derme é um tecido conjuntivo que contém fibras proteicas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e glândulas sebáceas e sudoríparas. É a responsável pela união da pele a hipoderme, dando sustentação mecânica, força e espessura, além de nutrir a epiderme e seus anexos. A derme é constituída de fibras colágenas e elásticas reticulares e contém entre 20 e 40% da água total do corpo. Nela está presente os proteoglicanos, os quais apresentam propriedades hidrofílicas (CORRÊA, 2012; CHIARI, 2011).

A superfície externa da derme, onde encontram-se as papilas dérmicas, é irregular. Essa camada papilar possui terminações nervosas sensoriais que proporcionam tato e percepção de temperatura e dor, além de fibrilas de colágeno, que contribuem para a junção da derme com a epiderme (MADISON, 2003).

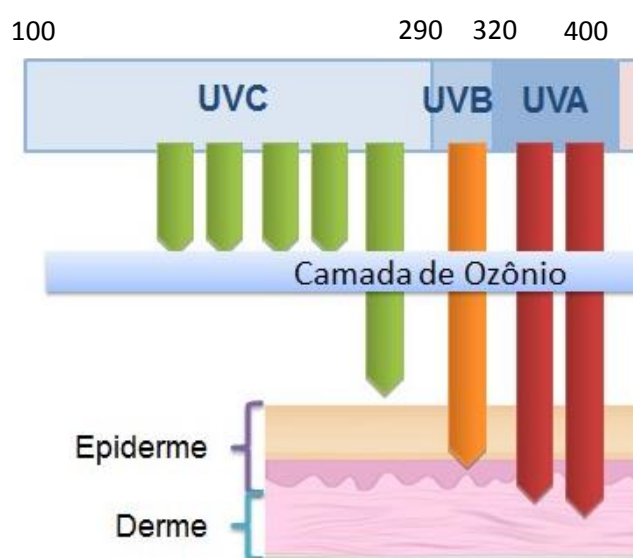
Outra camada presente na derme é a camada reticular, onde estão presentes os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, todas derivadas da epiderme. Essa camada mais profunda é constituída de tecido conjuntivo denso e é rica em feixes de colágeno, proporcionando elasticidade à pele. Nesta camada, são encontrados folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, todas derivadas da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

É até a derme que a radiação ultravioleta A penetra, estimulando o bronzeamento, causando o fotoenvelhecimento, entre outras coisas. O mesmo não acontece com os raios UVB, uma vez que, eles apresentam baixo poder de penetração, assim, eles atingem somente a epiderme, causando queimaduras (GARCIA, 2014).

2.2. Radiação ultravioleta

A radiação solar, a maior causadora dos cânceres de pele, é dividida em radiação ultravioleta, que tem comprimento de onda de 100-400 nm, luz visível (400-780nm) e a radiação infravermelha, que possui comprimento de onda maior que 780 nm. A radiação UV, por sua vez, é dividida em UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm), como mostra a Figura 1 (FIGUEIREDO, 2016).

Figura 1. Representação esquemática da penetração da radiação ultravioleta na pele



Fonte: Adaptado de <http://isic.net.br/artigo-32>

A radiação UVA, a mais abundante entre as radiações ultravioletas, é subdividida em UVA-I (340-400nm) e UVA-II (320-340nm). Ao atingir a derme, é capaz de degenerar o colágeno, alterar o metabolismo dos fibroblastos e promover bronzeamento imediato, por meio do escurecimento da melanina. Por ter a capacidade de ser absorvida pelos cromóforos da pele e também pode agir de maneira indireta, formando radicais livres, podendo provocar o estresse oxidativo. A somatória desses efeitos pode gerar, a longo prazo, fotoenvelhecimento, fotocarcinogênese e imunossupressão. Por ser a radiação mais presente e com maior poder de penetração, ela oferece grandes riscos à saúde humana (WIDEL et al., 2013; FLOR, 2007).

A radiação UVB, apresenta baixo poder de penetração, dessa forma, atua apenas na epiderme, podendo causar eritemas graves, doenças infecciosas e danos em nível molecular, reduzindo a chance de o organismo reconhecer e destruir uma célula maligna. É responsável por promover a biotransformação do ergosterol epidérmico em vitamina D, sendo este, um efeito desejável (GARCIA, 2014; FLOR, 2007).

E a radiação UVC, é uma radiação capaz de destruir o DNA de bactérias e microrganismos, podendo, também, prejudicar os olhos e pele nos humanos. É a mais perigosa entre as três, mas é bloqueada pela camada de ozônio, por isso, ela não tem sido apontada como uma causadora de câncer de pele ou de outro tipo de disfunção. Mas, a preocupação em relação essa radiação vem aumentando por dois motivos, a diminuição dos níveis da camada de ozônio e sua frequente utilização como germicida. Com a

popularização do uso da radiação UVC como germicidas em ambientes que necessitam da esterilidade, é possível que os profissionais estejam se expondo a altas doses de UVC (JIMÉNEZ, 2016)

É sabido que a radiação solar é necessária à saúde e bem-estar de todos, pois, além de atuar no processo da formação de vitamina D, ajuda no tratamento de icterícia, ela também é necessária no processo de fotossíntese dos vegetais. Mas, quando recebida em excesso, a radiação solar pode causar efeitos nocivos como, eritema, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), redução da eficácia dos sistemas antioxidantes naturais, distúrbios imunológicos, entre outros (MUNHOZ, 2012; SCHALKA; REIS, 2011; CHIARI, 2011).

2.3. Radicais livres

Os radicais livres, gerados a partir do oxigênio, são átomos ou associação de átomos que contém um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. Eles são capazes de atacar e danificar quase todas as moléculas encontradas no organismo. Quando formados, eles ligam-se, rapidamente, a diferentes compostos. Com isso, eles podem doar seu elétron não pareado ou capturar o elétron de outra molécula. Assim, a molécula atacada transforma-se em um radical, iniciando uma reação em cadeia (PIMENTEL, 2006).

Quando esses elétrons estiverem centrados nos átomos de oxigênio, eles serão denominados EROs (espécies reativas do oxigênio). Como exemplo de EROs podem ser citados, ânion superóxido (O_2^-), peroxila (RO_2^-), radical hidroxila (OH^-), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico (L^-), oxigênio singlete ($1O_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e o peróxinitrito ($ONOO^-$), entre outros. Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), peróxinitrito ($ONOO^-$) e o oxigênio singlete ($1O_2$), não sejam radicais livres, eles podem sofrer reações e formar radicais livres (FONSECA, 2008; RUFINO et al.; 2007).

Os radicais livres também são gerados no processo de produção de energia, na forma de trifosfato de adenosina (ATP), fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas. O corpo humano possui vários sistemas de defesa antioxidante contra as EROs, mas quando há um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e os sistemas de defesa, pode haver o estresse oxidativo. O excesso de EROs pode causar danos oxidativos nas proteínas e lipídios celulares, DNA e RNA. Esse acúmulo de radicais livres pode estar envolvido, também, no desenvolvimento de doenças

como câncer, Alzheimer e doenças cardíacas (PIMENTEL, 2006; SPERA, 2014; NAGMOTI et al., 2012).

2.4. Antioxidantes

Os radicais livres, formados principalmente por ações exógenas, como por exemplo, a radiação UV, são combatidos pelos antioxidantes, sejam eles endógenos ou exógenos. De acordo com Halliwell (2000) *antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo* (SPERA, 2014).

Os antioxidantes atuam de várias formas no organismo como, por exemplo, suprimindo a formação de EROs, seja pela inibição enzimática ou quelando elementos envolvidos na formação dos radicais livres ou apenas mantendo o mecanismo de defesa antioxidante regulado e protegido (ANDALLU et al., 2014; GONÇALVES, 2008).

Os mecanismos de defesa antioxidante endógeno são divididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Como sistemas enzimáticos temos, enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Já os antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides e vitamina C (CINCOTTO, 2016; SOUSA, 2013).

É importante salientar que, nem sempre os antioxidantes endógenos conseguem combater os radicais livres na mesma velocidade que eles são formados. Dessa forma, é de extrema importância o consumo de compostos antioxidantes, naturais ou sintéticos, em alimentos, cosméticos e bebidas. No setor cosmético, os produtos com ativos antioxidantes estão ficando cada vez mais valorizados, principalmente os de origem natural (PIMENTEL, 2006; MANSUR, 2011).

Cincotto (2016) constatou em seu trabalho que o extrato de *Morus nigra L.* apresenta eficácia para a captura de espécies reativas (radical superóxido e ácido hipocloroso), além de ter a capacidade de impedir ou retardar a lipoperoxidação em membranas biológicas. A função antioxidante presente nas frutas e vegetais está relacionada à presença de moléculas como compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides, ácido ascórbico, tocoferóis, cumarinas, alcaloides e terpenóides (BARBOSA, 2010; ROLIM et al., 2013; CINCOTTO, 2016).

Esses compostos são capazes de impedir os danos oxidativos ou de reparar os danos causados pelos radicais livres. Por esse motivo, extratos vegetais com ação

antioxidante são estudados cada vez mais para o desenvolvimento de cosméticos antienvelhecimento (SILVA et al., 2010; RUFINO et al., 2007).

Para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais existem diversos testes *in vitro*, como varredura de radicais livres DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), monocatión ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) que investigam radicais orgânicos e o método ORAC (capacidade de absorbância do radical oxigênio) que investiga o ataque dos radicais ROO• (peroxila) a sonda fluoresceína (FL) (3,6 – diidroxiespiro (isobenzofurano-1-3H-9-9H-xanteno3-ona), TBARS, sistema de co-oxidação do β- caroteno/ácido linoléico, FRAP, entre outros (MANSUR, 2011).

Como a radiação ultravioleta está diretamente ligada com a formação de radicais livres, formulações fotoprotetoras contendo antioxidantes naturais estão sendo desenvolvidas a fim de otimizar as características do produto. Dessa forma, o efeito fotoprotetor pode ser maior e os radicais livres produzidos após a exposição excessiva à radiação ultravioleta serão neutralizados (NASCIMENTO, 2014; SOUZA et al., 2010).

2.5. Fotoprotetores

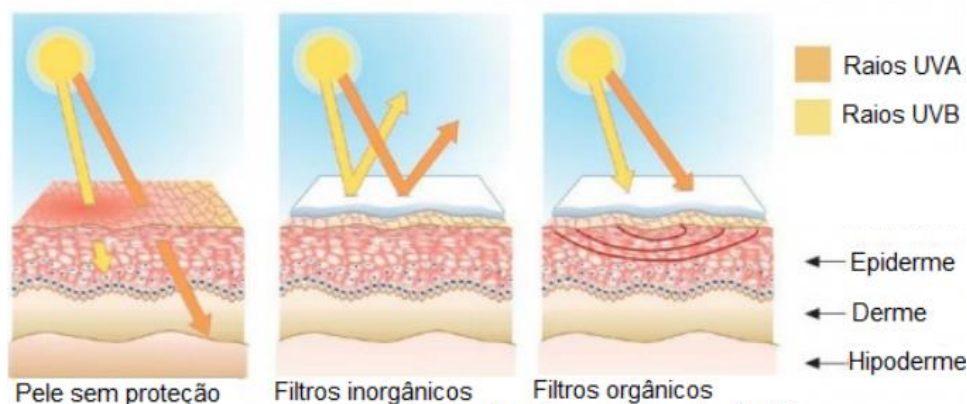
A popularização dos fotoprotetores ocorreu por volta da década de 70, com a incorporação de diversos filtros UVB em loções e cremes e, no ano de 1979, iniciou-se verdadeiramente o uso de filtros UVA. Mas, foi apenas depois dos anos 80 que o protetor solar começou a ser usado como prevenção de danos causados pela radiação ultravioleta, quando estudos mostraram o papel da radiação UV no desenvolvimento de neoplasias cutâneas (SCHALKA; REIS, 2011)

Fotoprotetor ou protetor solar foi definido pela ANVISA, em 2012, como “qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-los contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação” (BRASIL, 2012). Os fotoprotetores são formulados a partir da combinação de alguns filtros solares com veículos e essa associação é capaz de formar diversos compostos finais, com diferentes espectros de ação contra a radiação UV, capazes de minimizar os efeitos deletérios causados por esses raios (NASCIMENTO, 2014).

Filtros solares, ingredientes ativos utilizados em formulações fotoprotetoras, são moléculas ou complexos moleculares responsáveis por promover fotoproteção contra radiações UV e luz visível, dependendo dos seus espectros de ação. Eles são divididos

em filtros físicos ou inorgânicos e filtros químicos ou orgânicos (Figura 2) (GODINHO et al., 2017; MONTEIRO, 2010).

Figura 2. Incidência de radiação solar sobre a pele desprotegida e da pele protegida por filtros orgânicos e inorgânicos.



Fonte: Adaptado de BASF.

Os protetores físicos se depositam na camada mais superficial da pele formando uma barreira, refletindo e dispersando a luz UV. Também são capazes de absorver a radiação ultravioleta dependendo do tamanho da partícula. Os filtros solares inorgânicos mais conhecidos são: óxido de zinco, dióxido de titânio, caulim e óxido de ferro. São, geralmente, mais seguros clinicamente; entretanto, podem apresentar coloração opaca e esbranquiçada sobre a pele, obstruindo os poros e favorecendo a transferência do produto para as roupas, o que pode comprometer sua eficácia, além de dificultar aderência ao uso (BALOGH, 2011)

Já os filtros químicos são formados por moléculas orgânicas capazes de absorver a radiação UV e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas ao ser humano. Porém, existem, também, substâncias orgânicas capazes de absorver, dispersar e refletir ao mesmo tempo essa radiação. Assim que a radiação UV é absorvida ocorre a excitação do orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) para orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor (DAVOLOS, 2007).

Os fotoprotetores orgânicos são classificados, de acordo com a região de proteção ultravioleta, em filtros UVA e UVB. Estes compostos normalmente não possuem um amplo espectro de proteção contra a radiação UV como, por exemplo, as benzofenonas,

que protegem somente em UVA. Os salicilatos e cinamatos agem contra os raios UVB (NASCIMENTO, 2014).

Embora existam inúmeros filtros solares no mercado mundial, nem todos são aprovados pelos órgãos regulamentadores globais. O Quadro 1 apresenta os filtros ultravioletas aprovados pelo Mercosul, para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, de acordo com a RESOLUÇÃO-RDC Nº 69, DE 23 DE MARÇO DE 2016.

Quadro 1. Filtros solares aprovados pelo Mercosul e suas respectivas concentrações máximas permitidas

INCI name	Concentração máx m/m (%)
Camphor benzalkonium methosulfate	6
Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid (& salts)	10
Butyl methoxydibenzoylmethane	5
Benzylidene camphor sulfonic acid & salts	6
Octocrylene	10
Cinoxate	3
Benzophenone-8	3
Menthyl anthranilate	5
Tea-salicylate	12
Phenylbenzimidazole sulfonic acid (& sodium, potassium,tea salts)	8
Ethylhexyl methoxycinnamate	10
Benzophenone-3 (1)	10
Benzophenone-4 (acid)	10
Benzophenone-5	5
PABA	15
Homosalate	15
Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	6
Titanium dioxide	25
Peg-25 paba	10
Ethylhexyl dimethyl paba	8
Ethylhexyl salicylate	5
Isoamyl p-methoxycinnamate	10
4-methyl benzylidene camphor	4
3-benzylidene camphor	2
Ethylhexyl triazone	5
Zinc oxide	25
Drometrizole trisiloxane	15
Diethylhexyl butamido triazone	10
Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphe- nol	10
Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate	10
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	10
Polysilicone-15	10
Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	10
Tris-biphenyl triazine (2)	10

Fonte: RDC 69

O protetor solar deve apresentar em sua composição filtros UV com espectro de absorção na faixa da radiação UVA e UVB e ser fotoestável e para garantir sua eficácia

fotoprotetora. O Fator de Proteção Solar (FPS) das formulações deve ser medido e pode ser definido como o quociente entre a dose eritematogênica mínima (DEM) na pele protegida com o fotoprotetor em análise e a DEM na pele desprovida de proteção, ou seja, quanto maior o FPS, maior será o tempo permitido para uma exposição segura. Em outras palavras, o FPS é uma indicação do tempo em que a pessoa pode ficar exposta ao sol sem sofrer eritemas. A DEM é a quantidade de energia efetiva utilizada para a produção da primeira reação eritematogênica perceptível (NASCIMENTO, 2014; SCHALKA, 2009).

A determinação do FPS, no Brasil, é realizada seguindo métodos *in vivo*, utilizando voluntários sadios com diferentes tipos de pele, seguindo as referências descritas na resolução da ANVISA - RDC Nº 30, de 1 de junho de 2012. Como alternativa a esse teste, foram desenvolvidas metodologias *in vitro*, afim de permitir o controle de qualidade, selecionando as formulações com melhor desempenho, com facilidade de manuseio e menor custo. Assim, esses resultados servirão de base para o estudo com voluntários. Essas metodologias baseiam nas propriedades absorptivas ou na capacidade de espalhamento dos filtros (MANSUR, 1986).

Em 2003, foi realizado um estudo no Hospital Geral de Massachusetts, Laboratório de Fotomedicina Wellman (Estados Unidos), afim de comparar as metodologias *in vivo*, Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS) e Phototest em humanos, com a metodologia *in vitro*, utilizando o equipamento Optometrics. Eles concluíram que os dois métodos realizados com voluntários e o teste *in vitro*, apresentaram resultados próximos (VELASCO et al., 2011).

O equipamento Optometrics SPF 290S é um espectrofotômetro com esfera de integração, que mede a absorção óptica do fotoprotetor. A partir dos valores obtidos nos comprimentos de onda da faixa do ultravioleta, é calculado matematicamente o FPS da amostra através do software (winSPF) acoplado ao equipamento (KHURY; BORGES, 2011).

O FPS do protetor solar pode ser aumentado pela adição de algumas substâncias de origem natural, como óleos essenciais e extratos de espécies vegetais. Algumas apresentam capacidade de absorção da radiação UV pelos cromóforos da molécula, associada à possível atividade antioxidante dos óleos, extratos, entre outros. Baseando-se nisso, o estudo de ativos naturais capazes de atuar de forma sinérgica com os filtros solares e/ou garantir a fotoestabilidade da formulação tem se intensificado nos últimos anos (MUNHOZ et al, 2012; VELASCO et al., 2008).

2.6. Extratos vegetais e o mercado dos cosméticos fotoprotetores

De acordo com dados estatísticos referentes ao mercado cosmético, desde 2003, pode ser observado um crescimento médio de 12% ao ano, enquanto somente o mercado de fotoprotetores cresce, em média, 35% ao ano (BALOGH et al, 2011). Atualmente, o mercado brasileiro de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos ocupa a 4ª posição no ranking mundial, perdendo apenas para Estados Unidos, China e Japão. E, se tratando de proteção solar, o Brasil está classificado em 3º lugar (ABIHPEC, 2019).

Juntamente com o crescimento do consumo de cosméticos no Brasil, cresce, também, o grau de exigência dos consumidores brasileiros, assim como a busca por produtos multifuncionais e de origem natural. Hoje, os brasileiros, de forma geral, prezam por produtos fáceis de espalhar, com textura leve, sensorial fresco, toque seco e com secagem rápida. Em relação aos fotoprotetores, a demanda por proteção total aumentou, ou seja, agora tem-se uma preocupação em proteger a pele de qualquer fator capaz de provocar irritação e envelhecimento, como a radiação ultravioleta, luz azul, energia luminosa, radiação infravermelha, luz visível e poluição (ABIHPEC, 2019).

É sabido que os filtros ultravioletas podem provocar mudanças nos ecossistemas uma vez que, esses compostos são liberados no ambiente aquático de forma abundante. Mas, infelizmente, ainda não estão bem esclarecidos os efeitos desses compostos sobre a microbiota. Dessa forma, o desenvolvimento de fotoprotetores mais seguros e eficientes, com quantidades reduzidas de filtros sintéticos em sua formulação, mas com alto fator de proteção solar, é um dos alvos de interesse para pesquisadores (STAKEK, 2018; MANSUR, 2011).

O conhecimento popular e o conhecimento científico sobre o potencial terapêutico e as propriedades de compostos de origem natural, estão servindo de base para a criação de novos cosméticos com potencial antioxidante e fotoprotetor, com o intuito de utilizar menor quantidade e variedade de matérias primas sintéticas, mas, sem deixar de se preocupar com a prevenção do envelhecimento precoce e até algumas doenças (ORLANDA; VALE, 2015).

A aceitabilidade dos consumidores em relação ao uso de ativos de origem natural se dá, também, ao fato de eles apresentarem, em sua maioria, um conjunto de ações como, atividade antioxidante, regeneradora, anti-inflamatória, fotoprotetora, despigmentante, anticelulite e umectante, ao invés de uma única ação. Mas, é importante deixar claro que, mesmo sendo de origem natural, devem ser realizados testes de segurança, eficácia e

qualidade, a fim de garantir o bem-estar do consumidor sem oferecer riscos (CINCOTTO, 2016; ALMEIDA, 2013).

Dentre as matérias primas mais utilizadas pelas indústrias cosméticas para o desenvolvimento de produtos naturais, estão os extratos vegetais. No estudo realizado por Souza e colaboradores (2013), foi possível observar que o extrato de acerola (*Malpighia glabra* L.), incorporado em uma emulsão, apresentou atividade antioxidante. O mesmo aconteceu no estudo realizado por Almeida (2013), que determinou o potencial antioxidante do extrato de *Ascophyllum nodosum*, uma alga marinha marrom (SOUZA et al., 2013; ALMEIDA, 2013; CHIARI, 2011).

Alguns extratos vegetais podem ser considerados antioxidantes naturais uma vez que, apresentam capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de nitrogênio, por redução com a doação de um átomo de hidrogênio. Entre os responsáveis por promover essa atividade antioxidante, estão os compostos fenólicos, por exemplo, flavonoides, quercetina, catequina, antocianinas, ácidos fenólicos, entre outros. Estudos demonstraram que os flavonoides atuam dissipando a radiação ultravioleta absorvida de maneira inofensiva, agindo apenas nas camadas superficiais da pele (CAIXÊTA, 2014; ABE et al., 2007; CINCOTTO, 2016).

Além da atividade antioxidante, alguns compostos fenólicos também apresentam atividade fotoprotetora já comprovada. Ramos e colaboradores (1996), incorporaram extratos brutos de *Hamamelis virginiana* L., *Matricaria recutita* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Rhamnus prushiana* DC. e *Cinnamomum zeylanicum* Blume, os quais são ricos em flavonoides, taninos e antraquinonas, em formulações fotoprotetoras e constaram que houve um aumento no FPS dessas formulações (MUNHOZ et al., 2012; SILVA et al., 2010).

2.7. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados naturalmente a partir das reações do metabolismo secundário das espécies vegetais. Eles atuam como protetores de agressores externos e estão envolvidos no crescimento e reprodução das espécies vegetais. Alguns estudos têm sugerido que a função primária dos compostos fenólicos não é a proteção contra a herbivoria, mas, sim, a proteção contra os danos fototóxicos, por meio de sua atividade antioxidante, uma vez que, através de reações químicas, ocorre o sequestro de

espécies reativas de oxigênio geradas nos processos oxidativos naturais (POLONINI, 2014; TSAO, 2010; SOUSA, 2013; RODRIGUES, 2018).

Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas (como antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora), mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os compostos fenólicos são classificados, de acordo com sua estrutura química, em flavonoides, ácidos fenólicos, aminas fenólicas e polifenóis não-flavonoides. Eles estão presentes em diversas espécies vegetais e frutas, principalmente aquelas de cores fortes, as quais contêm elevada quantidade de antocianinas, carotenoides, flavonoides e taninos (hidrolisados ou condensados). Além da propriedade antioxidante, tem sido demonstrado que os compostos fenólicos podem ter a capacidade de reduzir a toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (FERNÁNDEZ et al., 2016; CHIARI, 2011; ALVES, 2011)

Por serem substâncias aromáticas e apresentarem semelhança estrutural próxima aos filtros orgânicos de efeito químico, as substâncias fenólicas apresentam intensa absorção na região do ultravioleta, sendo assim, apresentam efeito promissor como fotoprotetores naturais. Plonini e colaboradores (2014) constaram, em seu estudo, a atividade fotoprotetora do extrato de *L. sericea*. Foi possível verificar que, tal atividade, está relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos e não à capacidade antioxidante. Assim como esse, outros estudos também vêm demonstrando boas expectativas com relação ao uso comercial de substâncias fenólicas como filtro solar (MUNHOZ et al., 2012; POLONINI, 2014)

2.8. Espécies vegetais do gênero *Byrsonima*

O gênero *Byrsonima* pertence à família *Malpighiaceae*, a qual apresenta aproximadamente 73 gêneros e 1.315 espécies e lianas (ou cipós). Suas espécies estão distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais, especialmente na América do Sul em áreas de Cerrado, sendo que, no Brasil, essa família é representada por 44 gêneros e 561 espécies (MAMEDE et al., 2015; CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016).

O gênero *Byrsonima*, um dos maiores gêneros da família *Malpighiaceae*, é encontrado, normalmente, no cerrado brasileiro, onde, cerca de 50% das espécies são

encontradas nas regiões Norte, Nordeste e região Central do Brasil, mas também pode ser encontrado em regiões serranas do Sudeste. Dispõe cerca de 150 espécies, as quais são conhecidas por possuírem ação anti-inflamatória, adstringente e antioxidante. Foi estudado que a presença de fenólicos, flavonoides, triterpenos, quercetina, entre outros compostos encontrados nas espécies vegetais desse gênero apresentavam valor significativo (SIMPLICIO, 2011; BERTOLDI, 2012), o que justifica a realização desta pesquisa, em busca de atividade antioxidante e/ou fotoprotetora da *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss.

As espécies desse gênero, conhecidas de forma geral como “murici”, “muricizeiro”, “murici-do-campo” e “canjica”, apresentam características típicas das espécies vegetais do cerrado, as quais normalmente são arbóreas, de porte médio e com galhos retorcidos. São espécies vegetais de fácil adaptação, se desenvolvendo bem em clima quente, com boa ventilação e solos areno-argilosos. As espécies são diferenciadas pelas cores das flores e frutos e pelos locais de ocorrência. Os frutos são consumidos em forma de doces, bebidas, licores e geleias, já as folhas, cascas e raízes são utilizadas popularmente no tratamento de infecções intestinais, diarreia, inflamações do trato genital feminino e garganta e, também, como antimicrobiano (PEREIRA, 2011; SALDANHA e SOARES, 2015).

A espécie *B. pachyphylla* A. Juss (Figura 3), nativa do Brasil, é conhecida popularmente como “murici”. Segundo Melo (2014), essa espécie é uma das mais abundantes do cerrado. Foi constatada por Braga (2015), através de testes espectrofotométricos, a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do extrato de *B. pachyphylla* A. Juss. Costa (2010) mostrou, em seu trabalho, a eficiente atividade bacteriostática de diversas frações do extrato dessa espécie vegetal, além de sugerir a presença de derivados do ácido gálico, flavonoides e catequinas no extrato metanólico das folhas.

Figura 3. Folhas e flores de *B. pachyphylla* A. Juss



Fonte: Fotografia realizada pela autora

B. intermedia A. Juss (Figura 4), também nativa do cerrado brasileiro, é conhecida como “murici amarelo” e suas folhas e o tronco são utilizados popularmente contra diarreias, disfunções gástricas e cicatrização de feridas. De acordo com alguns estudos fitoquímicos, as folhas dessa espécie apresentam derivados da quercetina, ácido gálico, além de um flavonoide chamado amentoflavona, o qual apresenta vários efeitos terapêuticos já comprovados na literatura (CARDOSO, 2015). No estudo realizado por Pinto e Kolb (2016), foi comprovado que o extrato de *B. intermedia* A. Juss. continha taninos, triterpenos, saponinas e antraquinonas.

Figura 4. Folhas e flores de *B. intermedia* A. Juss



Fonte: CARDIM, 2011

3. OBJETIVO

Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito fotoestabilizador do FPS de emulsões contendo filtros orgânicos de efeito químico e extratos de espécies vegetais do gênero *Byrsonima*.

3.1. Objetivos Específicos

Obtenção das folhas das espécies vegetais do gênero *Byrsonima*

Obtenção dos extratos de folhas das espécies vegetais do gênero *Byrsonima*

Análise do potencial fotoprotetor dos extratos obtidos por varredura espectrofotométrica em todas as estações do ano

Avaliação da atividade antioxidante pela metodologia de inibição do radical DPPH[•]

Avaliação da atividade antioxidante pela metodologia de inibição do radical ABTS^{•+}

Análise de compostos fenólicos totais

Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos de folhas das espécies vegetais do gênero *Byrsonima*

Desenvolvimento de emulsão e avaliação da estabilidade

Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS de filtros orgânicos de efeito químico com os extratos de folhas de espécies vegetais do gênero *Byrsonima*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e equipamentos

Materiais: Ácido ascórbico, ácido gálico, ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (trolox), água destilada, álcool absoluto (Synth e Chemis), álcool 70° GL, álcool isopropílico, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), antibiótico penicilina 100 U/mL, Álcool cetosteárico 20 OE, Álcool Cetosteárico etoxilado, Adipato de dibutila, bicarbonato de sódio, bromato de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), BHT, cloreto de sódio (Synth), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), Estearato de octila, EDTA Na₂, fita da Transpore®, fosfato de sódio monobásico anidro (Synth), fosfato de sódio bibásico anidro (Synth), folin-ciocalteau (Imbralab), garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm², radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich®), Metilparabeno, meio de cultura DMEM (Cultilab), persulfato de potássio, placas de 96 poços para cultura celular (estéreis), propilenoglicol, Propilparabeno, reagente Folin-Ciocalteau, soro fetal bovino (Cultilab), tampão fosfato pH 7,4, tampão fosfato pH 6,8, tampão fosfato-salino (PBS), tripsina, Octyl Methoxycinnamate, Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine e Aqua (and) Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (and) Polymethylmethacrylate.

Equipamentos: Agitador (AT: 56, Phoenix®), balança analítica (Owa labor®), balança analítica (Shimadzu AY220), balança semi-analítica (Gehaka BG2000), banho frio (TE-2005, Tecnal®), centrífuga (Hitachi® High Speed Refrigerate Himac CR22GII), estufa de ar circulante (Soc Fabel modelo 170), espectrofotômetro de transmitância (SPECTROStar nano, BMG LABTECH®), Lavadora Ultra-Sônica Digital (Sanders medical), liofilizador (Christ Alpha 2-4 LD plus), micro moinho de facas (Willye TE-648), Optometrics SPF 290S, refrigerador (Sanyo®), pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 µL, 100, 1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf), optometrics SPF 290, peagômetro digital (Gehaka PG 1800), reômetro (AR 2000ex), rotoevaporador (BUCHI switzerland R-215).

4.2. Métodos

4.2.1 Preparo do material vegetal

As folhas de *B. pachyphylla* A. Juss foram coletadas, em março de 2018, no Campus da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), em Araraquara/SP, localizada na Rodovia Araraquara/Jaú km 01. Foi preparada uma exsicata, a qual foi identificada e depositada em herbário. As folhas de *B. intermedia* A. Juss. foram cedidas pelo professor Doutor Luiz Fernando Rolim de Almeida, do Departamento de Botânica da UNESP de Botucatu/SP, pela Doutora Angélica Lino Rodrigues e pela Mestre Marília Quinalha.

O material vegetal foi seco em estufa com circulação e renovação de ar por 72 horas à temperatura média de 40° C. Após isso, foi pulverizado no Micro Moinho de facas Tipo Willye e, posteriormente, armazenado em congelador (ROLIM, 2013).

4.2.2 Obtenção dos extratos

4.2.2.1. Maceração

A partir do material seco, foi preparado um extrato pelo método de maceração, na qual o solvente escolhido foi etanol 70° GL, na proporção de 1:20 (m/v). As espécies vegetais foram colocadas em frascos âmbar, junto com o solvente (Farmacopeia Brasileira, 2019). O processo de extração durou sete dias, sendo que, durante esses dias, os extratos foram agitados por uma hora em Lavadora Ultra-Sônica Digital. Após os sete dias os extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss foram filtrados e armazenados em geladeira.

4.2.2.2. Rotaevaporação

Os extratos foram rotaevaporados em banho quente entre 37°C e 40°C, com banho frio à 5°C e rotação por volta de 75 rpm. E, então, foram acondicionados em uma garrafa de vidro âmbar e armazenados em geladeira (MIGOTO, 2018).

4.2.2.3. Liofilização

Para isso, as amostras foram previamente congeladas à temperatura de -80°C, em frascos específicos. Depois de congeladas, elas foram colocadas no liofilizador em um processo que durou 4 dias. Terminada a liofilização, os extratos secos foram retirados dos frascos e armazenados em frascos âmbar, na geladeira (LIMA, 2017).

4.2.3. Avaliação do potencial fotoprotetor dos extratos por varredura espectrofotométrica

A capacidade fotoprotetora dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, foi avaliada a partir da varredura em espectrofotômetro, entre os comprimentos de onda de 220 a 400 nm. Os extratos etanólicos, solubilizados em etanol 70° GL, estavam na concentração de 83,333 µg.mL⁻¹. Foi utilizado etanol 70° GL, como branco.

Em paralelo a isso, a capacidade fotoprotetora do extrato de *B. pachyphylla* A. Juss, foi avaliada em todas as estações do ano. Para isso, as folhas de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss foram coletadas no início de cada estação. E o preparo do material vegetal, bem como a obtenção do extrato, foi realizado de acordo com a metodologia descrita anteriormente, mas, neste caso, os extratos não foram rotaevaporados e liofilizados. Para verificar o potencial fotoprotetor, os extratos foram solubilizados em etanol 70° GL, ficando na concentração de 154,00 µg.mL⁻¹.

4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante

4.2.4.1. Metodologia de inibição do radical DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss foi realizada pela metodologia de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) segundo Chiari, 2011. Neste ensaio, 1,0 mL de solução dos extratos foi adicionado a 2,5 mL de solução etanólica de DPPH• (0,004%; m/v). A reação foi mantida ao abrigo de luz, durante 30 minutos, para posterior avaliação espectrofotométrica, com determinação dos valores de absorbância a 515 nm. Como branco, foi utilizado 1,0 mL do solvente dos extratos e 2,5 mL do solvente do DPPH•. E, como controle, foi utilizado 1,0 mL do solvente dos extratos e 2,5 mL de solução etanólica do radical DPPH•.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando o ácido gálico como substância padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada extrato para o padrão de ácido gálico. A porcentagem de inibição do radical DPPH• foi calculada pela equação a seguir, tanto para o ácido gálico, quanto para os extratos (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = \frac{(A_{\text{máx}} - A_{\text{teste}})}{A_{\text{máx}}} \times 100,$$

Onde:

% Inibição = porcentagem de inibição do radical DPPH•;

$A_{\text{máx}}$ é a absorbância do radical DPPH• em 515 nm na ausência de amostra (controle);

A_{teste} é a absorbância do radical DPPH• em 515 nm na presença de amostra.

A partir dos valores de porcentagem de inibição foi possível obter uma curva analítica, a qual foi usada para calcular a concentração expressa em valor de IC_{50} , representando a quantidade de extrato necessária para inibir 50% dos radicais DPPH• em solução.

4.2.4.2. Metodologia de inibição do radical ABTS•⁺

O ensaio foi realizado de acordo com Rufino et al., 2007, com modificações. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque de ABTS 7 mM, adicionando 192 mg do reagente ABTS em um balão volumétrico e o volume foi completado para 50 mL, com água destilada. Foi preparada, também, uma solução de persulfato de potássio 140 mM, dissolvendo-se 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada no balão volumétrico de 10 mL. E, para preparar a solução padrão de trolox 2mM, foram adicionados 25 mg de trolox em um balão volumétrico de 50 mL com álcool etílico. O preparo do radical ABTS•⁺ foi realizado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL de persulfato de potássio. Essa mistura foi mantida na ausência de luz, por 16 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL do radical ABTS•⁺ foi solubilizado em álcool etílico até que uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$, a 734 nm fosse obtida.

Para a determinação da curva padrão de trolox 2mM, foram preparadas soluções em várias concentrações (de 100 µM a 1.500 µM). Em ambiente escuro, foram transferidos 30 µL de cada solução de trolox para tubos de ensaio, juntamente com 3 mL de solução do radical ABTS•⁺. Após 6 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 734nm. O álcool etílico foi utilizado como branco.

Em um ambiente escuro, 30 µL de soluções dos extratos de *Byrsonima*, em diferentes concentrações, foram adicionados a 3 mL do radical ABTS•⁺. A leitura foi realizada, após 6 minutos, em espectrofotômetro, a 734nm. E, como branco, foi utilizado álcool etílico. Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada extrato. A porcentagem de inibição do radical ABTS•⁺ foi calculada pela equação a seguir, tanto para o trolox, quanto para os extratos vegetais.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(A_{\text{máx}} - A_{\text{teste}})}{A_{\text{máx}}} \times 100$$

Onde:

%Inibição = porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+};

A_{máx} = absorbância do radical ABTS^{•+} na presença de amostra em 734 nm;

A_{teste} = absorbância do radical ABTS^{•+} na ausência de amostra em 734 nm.

4.2.5. Análise de compostos fenólicos totais

A análise dos compostos fenólicos dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, foi realizada seguindo a metodologia adaptada de Neves et al. (2009). Para isto, uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi transferida para um tubo e foram adicionados 2,5 mL de reagente de Folin Ciocalteu diluídos em água destilada 1:10. Essa solução foi deixada em repouso, por 8 minutos, e foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%. O carbonato de sódio a 4%, preparado no dia, foi solubilizado em água destilada e aquecido, para que houvesse completa solubilização. Os tubos foram deixados em repouso, ao abrigo da luz, por 2 horas.

Posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro, em 740 nm. Foi construída uma curva analítica do ácido gálico contendo 100, 80, 60, 40 e 20 µg.mL⁻¹, usado como padrão para o experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada extrato. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para calcular o teor de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico e os resultados foram expressos em µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100 µg do extrato.

4.6. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de folhas do gênero *Byrsonima*

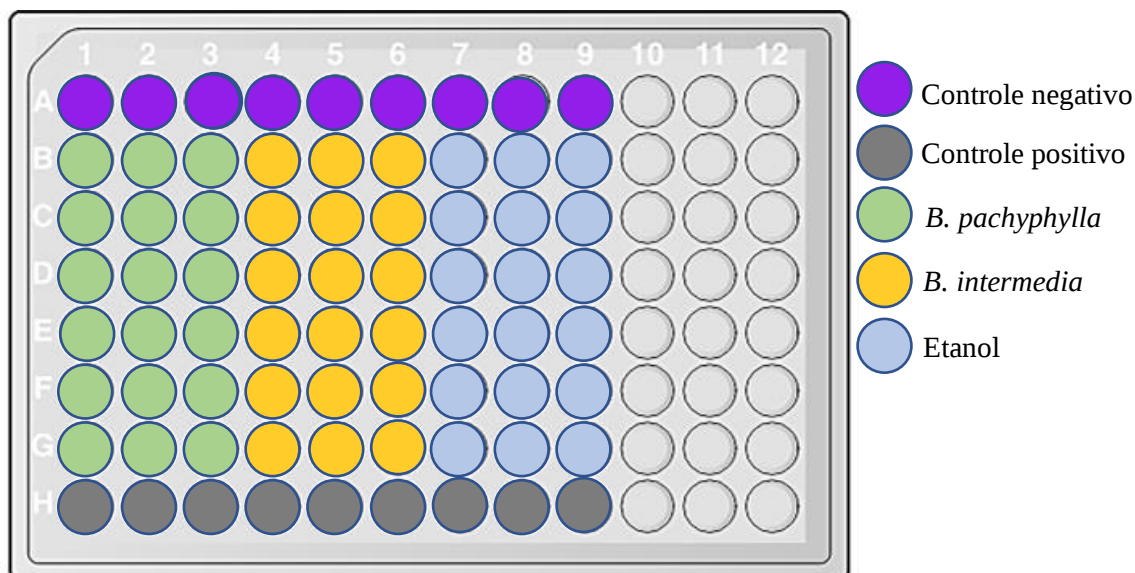
A avaliação do potencial citotóxico dos extratos foi feita segundo a metodologia do corante MTT 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide. Essa avaliação foi realizada em células de hepatoma humano (HepG2), queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCaT) e em fibroblastos humanos primários da derme (HDFa) (MOSMANN, 1983).

As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibiótico (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas de células foram incubadas a 37±2° C em atmosfera contendo 5% de gás carbônico (CO₂). Assim que atingiram de 80 a 90%

de confluência, as células foram tripsinizadas e, após alguns minutos, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura DMEM, com soro fetal bovino. Então, essa suspensão de célula foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado meio de cultura no *pellet* de células, em quantidade suficiente para que se formasse uma suspensão com densidade de 1×10^6 células/mL, a qual foi semeada em placas de 96 poços e, então, as placas foram incubadas, por 24 horas, para a completa adesão celular.

No dia seguinte, após a adesão das células, o meio de cultura presente nas placas foi removido e as células foram tratadas com 100 μ L de controle positivo (Dimetilsulfóxido a 10% em meio de cultura DMEM), 100 μ L de controle negativo (meio de cultura DMEM com soro fetal bovino a 5%), 100 μ L dos extratos, em meio de cultura DMEM, em diferentes concentrações e 100 μ L de etanol 5%, em meio de cultura DMEM, o qual foi utilizado como solvente das amostras, como mostra a Figura 5. As placas foram incubadas a 37° C.

Figura 5. Representação da placa de 96 poços



Fonte: Elaborado pela autora.

Após as 24 horas de tratamento, as amostras foram removidas e as placas foram lavadas com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (BRUGGISSER et al., 2002) e foram adicionados, em cada poço, 100 μ L de MTT na concentração de 1 mg/mL, em PBS. As placas foram incubadas a 37° C por 3 horas. E, então, a solução de MTT foi retirada e 100 μ L de álcool isopropílico absoluto foram adicionados, em cada poço, para que os

cristais de formazana formados fossem solubilizados. As placas foram agitadas por, aproximadamente 10 minutos, e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de placas, no comprimento de onda de 595 nm.

Foram realizados ao menos três ensaios independentes para cada metodologia, sendo que, cada um deles, foi realizado em triplicata. Com os valores de absorbância obtidos, foi calculada a porcentagem de células mortas, de acordo com a equação 1, em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento (ZHANG et al., 2004). A partir dessa porcentagem, foi determinada, também, a porcentagem de células vivas, de acordo com a equação 2 e, com esses valores, foi construída uma curva analítica.

$$\% \text{ células mortas} = \frac{(Abs_{Cn} - Abs_{Am})}{Abs_{Cn}} \times 100 \quad (1)$$

Abs_{Cn}: Absorbância do controle negativo;

Abs_{Am}: Absorbância da amostra.

$$\% \text{ células vivas} = 100 - \% \text{ células mortas} \quad (2)$$

A partir da equação da reta, o valor de IC₅₀ foi calculado no programa Prisma (Versão 5.01), por meio da curva de regressão não linear, utilizando a concentração logaritmica *versus* a porcentagem de células vivas. O IC₅₀ representa a concentração de extrato necessária para que a viabilidade celular seja de 50%.

4.7. Desenvolvimento das emulsões

Foi desenvolvida uma emulsão base, à qual foi adicionada uma mistura de filtros orgânicos de efeito químico, para obtenção de uma emulsão fotoprotetora, que apresenta FPS igual a 36,8 de acordo com o “BASF - *Sunscreen Simulator*”. Os critérios avaliados para a criação dessa emulsão fotoprotetora foram secagem rápida e sensação não oleosa.

Com as emulsões definidas (base e fotoprotetora), foram incorporados a elas, separadamente, os extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss. A concentração foi definida baseando-se no potencial antioxidante e potencial citotóxico.

4.8. Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS da emulsão fotoprotetora contendo extrato de folhas do gênero *Byrsonima*

Para a avaliação do FPS e do efeito fotoestabilizador das emulsões, foi utilizado o equipamento Optometrics SPF 290S (Figura 6). Para realizar a medição, seguindo o protocolo do fabricante, foram aplicados 110 mg das amostras na fita Transpore® (55 cm²) e espalhados, para que formassem um filme uniforme de 2 mg/cm². E, então, as fitas foram deixadas em repouso, por 15 minutos, e, depois, foram realizadas as leituras. Os valores de FPS foram determinados em triplicata para cada amostra.

Figura 6. Equipamento Optometrics SPF 290S



Fonte: OPTOMETRICS, 2014

As leituras foram realizadas pela emissão da radiação ultravioleta, gerada pela lâmpada de Xenônio do equipamento e comprimento de onda entre 290 e 400 nm. O FPS das amostras foi calculado pelo software winSPF, acoplado ao Optometrics, a partir dos valores obtidos nos comprimentos de onda na faixa da radiação ultravioleta (CHIARI et al., 2014)

Para avaliar o efeito fotoestabilizador do FPS, do fotoprotetor contendo extratos de folhas do gênero *Byrsonima*, foram preparadas seis formulações variando a presença dos extratos (Tabela 1).

Tabela 1. Fórmula das emulsões desenvolvidas

INCI name	Nome comercial	Quantidade (m/m %)					
		1	2	3	4	5	6
Ceteareth - 20	Álcool Cetoestearílico etoxilado 20 OE	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Cetearyl Alcohol	Álcool cetoestearílico	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Glyceryl Stearate	Monoestearato de glicerila	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Dibutyl adipate	Adipato de dibutila	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Ethylhexyl stearate	Estearato de octila	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Caprylic/Capric Triglyceride	Triglicerídeos de ácido cáprico caprílico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	Tinosorb® S	-	3,00	3,00	-	3,00	-
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount	Tinosorb® S Lite Aqua	-	4,00	4,00	-	4,00	-
Ethylhexyl Methoxycinnamate	Metoxicinamato de Etilhexila	-	6,00	6,00	-	6,00	-
Butylated hydroxytoluene	BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Propylene Glycol	Propilenoglicol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Propylparaben	Propilparabeno	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Methylparaben	Metilparabeno	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Disodium EDTA	EDTA Na ₂	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Aqua	Água q.s.p	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>B. pachyphylla</i> A. Juss extract	Extrato de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss	-	-	0,5	0,5	-	-
<i>B. intermedia</i> A. Juss extract	Extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss	-	-	-	-	0,5	0,5

Fonte: Elaborada pela autora.

4.9. Estudo de estabilidade das emulsões

Após o preparo das seis emulsões fotoprotetoras e a avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS das formulações contendo extrato de *Byrsonima*, foram escolhidas apenas três formulações para dar continuidade, no estudo de estabilidade. As formulações escolhidas foram: emulsão base, emulsão contendo filtros orgânicos de efeito químico e emulsão contendo filtros orgânicos de efeito químico e extrato de *B. intermedia* A. Juss. Foi escolhido o extrato de *B. intermedia* A. Juss, pois ele apresentou resultados mais promissores em relação ao extrato de *B. pachyphylla* A. Juss.

O estudo de estabilidade acelerada, conduzido por 90 dias, foi realizado conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004) e Isaac e colaboradores (2008).

As emulsões foram separadas em alíquotas e submetidas a diferentes temperaturas: $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ (geladeira), $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (estufa) e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ambiente). As amostras foram distribuídas em 4 potes com capacidade de 50 g, para cada condição de temperatura, para realizar os ensaios no 15º, 30º, 70º e 90º dia após o preparo da emulsão.

As variáveis avaliadas foram: características organolépticas (aspecto, odor e cor), características físicas (viscosidade e valor de pH) e separação de fases e/ou coalescência. E como amostra de referência, foram adotadas as avaliações do dia 1, correspondendo à 24 h após a manipulação da formulação.

4.9.1. Teste de centrifugação

Para realização deste ensaio, 5 g de cada amostra foram submetidos à centrifugação, por 15 minutos, a 3.000 rpm. (BRASIL, 2004).

4.9.2. Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica foi executada para avaliar alterações no aspecto, coloração e odor das formulações, mas, também, para observar uma possível separação de fase. As avaliações do dia 1 (24 h após a manipulação), foram consideradas como referência (BRASIL, 2004).

4.9.3. Determinação do pH

Após dispersão das amostras a 10% (m/m) (ISAAC, 2004), em água destilada, o pH foi determinado em pHmetro, Gehaka PG1800, conforme protocolo proposto (BRASIL, 2004). Os valores de pH foram determinados em triplicata.

4.9.4. Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada para cada amostra, em triplicata, utilizando o Reômetro rotacional modelo AR 2000 Ex. As amostras foram submetidas à taxa de cisalhamento de 0 a 100 s⁻¹. Esta análise foi realizada utilizando o sensor do tipo cone-placa (C40/ 2° Ti) a 25±1° C (CHIARI et al., 2012).

4.9.5. Determinação do fator de proteção solar (FPS) e avaliação do efeito fotoestabilizador

A avaliação do FPS e do efeito fotoestabilizador das formulações foram realizados no período de 90 dias, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente (Item 4.8.). As avaliações do dia 1, correspondendo à 24 h após a manipulação, foram consideradas como referência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparo do material vegetal

A exsicata de *B. pachyphylla* A. Juss foi identificada pela Doutora Maria Candida H. Mamede, no Instituto de Botânica- Herbário de São Paulo. Após a identificação, a exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UNESP de Botucatu/SP, sob o número de registro 33635. A exsicata de *B. intermedia* A. Juss também se encontra catalogada no herbário da UNESP de Botucatu, sob o número de registro 27881.

Na Figura 7, podem ser visualizadas as etapas do processo de preparação do material vegetal.

Figura 7. Preparo do material vegetal



Fonte: Fotografia obtida pela autora

As folhas foram secas em estufa de ar circulante, por 72 horas, com o intuito de desidratar as folhas, desfavorecendo, assim, a proliferação de micro-organismos, além de evitar novas reações enzimáticas, evitando a deterioração e a alteração do material vegetal. As folhas secas foram pulverizadas em moinho de facas, com peneiras em aço inox, com malha 20, a fim de reduzir o tamanho de partículas dos materiais vegetais, aumentando a superfície de contato com o solvente de extração (ANDREO; JORGE, 2006).

5.2. Obtenção dos extratos

Com os materiais vegetais secos e pulverizados, iniciou-se a extração pelo método de maceração. O etanol 70°GL foi escolhido, como solvente extrator, pois dados na

literatura mostram que esses solventes orgânicos são capazes de extrair substâncias bioativas, além de ser de um solvente atóxico e com baixo custo (OLIVEIRA, 2011).

Etanol e água são os solventes mais empregados para a extração de antioxidantes. Dentre os extratos etanólicos, metanólicos e aquosos de folhas de *Panax ginseng*, o extrato etanólico apresentou maior ação sequestradora de radicais livres e continha, também, maior quantidade de compostos fenólicos (JUNG et al., 2006). Em paralelo a isso, no estudo de Andreo e Jorge (2006), foi constatado que a água é um solvente que extrai os compostos fenólicos com atividade antioxidante, de forma eficiente, devido à sua polaridade (ANDREO; JORGE, 2006).

Rodrigues et al (2018), avaliou a atividade antioxidante de diferentes extratos de *B. verbassifolia* e, dentre esses extratos, os que apresentaram maiores atividades antioxidantes foram os extratos hidroetanólicos. Tal resultado apenas reforça a escolha do uso do solvente hidroetanólico no presente estudo.

A rotaevaporação é um processo de separação térmica de compostos líquidos através de evaporação em seu ponto de ebulição e, conseqüentemente, condensação (MIGOTO, 2018). Esse processo foi realizado com o intuito de evaporar todo o álcool presente no extrato, restando somente a água. Assim, depois de macerados e filtrados, os extratos foram rotaevaporados, a fim de retirar o etanol presente no extrato.

A liofilização é um processo de estabilização no qual uma substância está previamente congelada e, então, a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida primeiramente por sublimação e, posteriormente, dessorção (LIMA, 2017). E, assim, para garantir a conservação dos extratos, toda água presente foi retirada, pelo método de liofilização. Os extratos liofilizados foram acondicionados em frascos âmbar, na geladeira (Figura 8).

Figura 8. Preparo do extrato dividido em etapas de 1 a 4

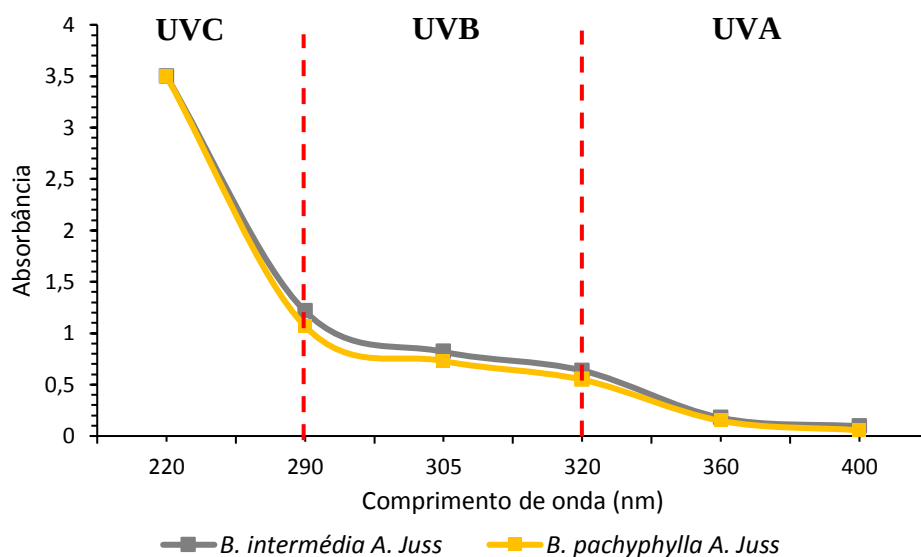


Fonte: Fotografia obtida pela autora

5.3. Avaliação do potencial fotoprotetor dos extratos por varredura espectrofotométrica

A capacidade fotoprotetora dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, foi avaliada a partir da varredura em espectrofotômetro, entre os comprimentos de onda de 220 a 400 nm. A varredura foi realizada com o objetivo de verificar a absorção nas regiões UVA, UVB e UVC. A capacidade fotoprotetora dos extratos de *Byrsonima* está demonstrada na Figura 9. Os extratos foram analisados na concentração de 83,333 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi utilizado o etanol 70° GL como branco.

Figura 9. Varredura espectrofotométrica dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss



Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a Figura 9 e os resultados apresentados na Tabela 2, foi possível observar que ocorreu maior absorção no comprimento de onda de 220 nm e, em segundo lugar, no comprimento de onda de 290 nm, em ambos os extratos vegetais. Sendo assim, é possível afirmar que os extratos apresentam maior potencial fotoprotetor UVB e UVC. Embora tenha sido pequena a absorção na faixa da radiação UVA, não deve ser descartado o potencial fotoprotetor nessa faixa de absorção.

Para obter um resultado mais preciso do valor de absorbância na faixa de absorção referente à radiação UVC, foi realizada uma leitura em concentração menor, de $10,416 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, a qual apresentou valores de absorbância iguais a 0,814 e 1,256 para os extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, respectivamente, no comprimento do onde de 220 nm. E, no comprimento de onda de 290 nm, os valores de absorbância encontrados foram 0,127 e 0,172 para os extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss.

É sabido que a radiação UVC é absorvida pelas camadas de ozônio, mas, recentemente, foi descoberto um buraco na camada de ozônio nas regiões polares, o que levou à preocupação sobre a séria ameaça ao sistema biológico. Outro fator a ser levado em consideração, é a exposição a essa radiação a partir de fontes artificiais, as quais podem causar sérios danos, como ceratite ultravioleta (ROY,2017).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão das absorbâncias em diferentes comprimentos de onda dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss

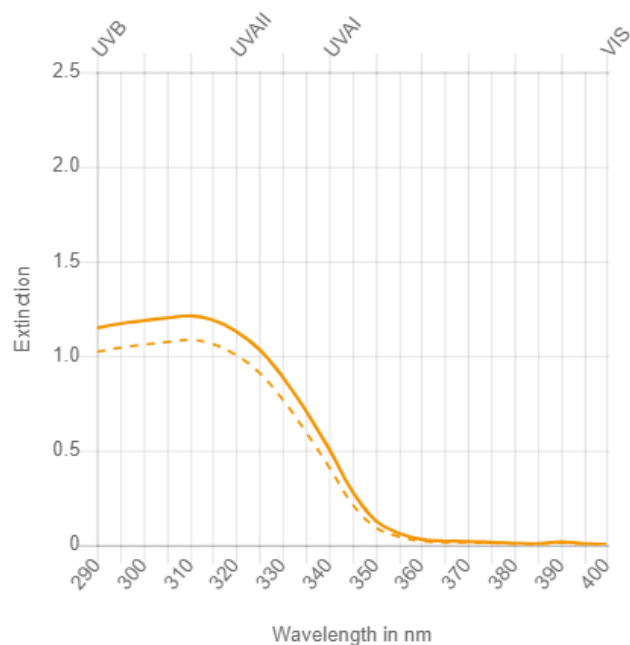
Comprimento de onda (nm)		Absorbância	
		<i>B. pachyphylla</i> A. Juss	<i>B. intermedia</i> A. Juss
220	UVC	$3,5 \pm 0,000$	$3,5 \pm 0,000$
290		$1,068 \pm 0,034$	$1,214 \pm 0,042$
305	UVB	$0,729 \pm 0,041$	$0,819 \pm 0,041$
320		$0,548 \pm 0,044$	$0,637 \pm 0,042$
360	UVA	$0,148 \pm 0,004$	$0,177 \pm 0,023$
400		$0,056 \pm 0,001$	$0,095 \pm 0,014$

Fonte: Elaborado pela autora

As Figuras 10, 11 e 12 mostram o perfil espectrofotométrico dos filtros escolhidos para incorporar na emulsão fotoprotetora, Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (Tinosorb[®] S), Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount (Tinosorb[®] S Lite Aqua) e Ethylhexyl Methoxycinnamate (Metoxicinamato de Etilhexila).

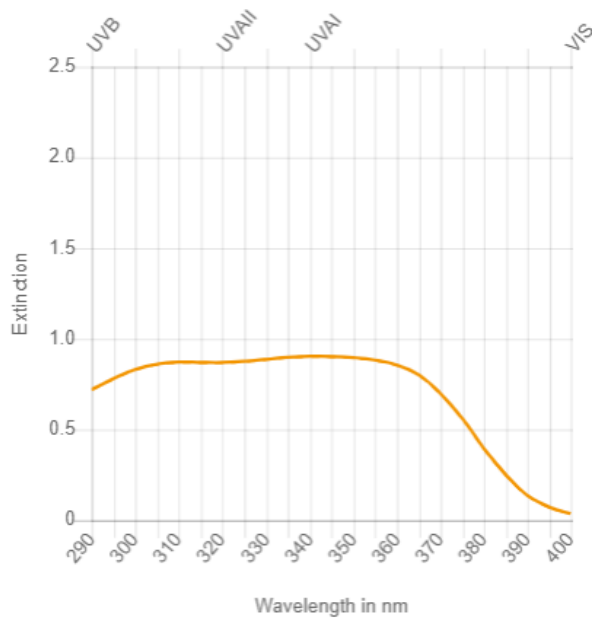
As concentrações utilizadas para esta avaliação foram as mesmas empregadas na emulsão fotoprotetora. É possível observar que o filtro Ethylhexyl Methoxycinnamate apresentou maior coeficiente de extinção molar entre os comprimentos de onda de 290 a 320 nm, e os filtros Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine e Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount apresentaram maior coeficiente de extinção molar na faixa de 300 a 360 nm, aproximadamente, mas ambos os filtros Tinosorb[®] (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine e Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount) apresentaram valores de coeficiente de extinção molar inferiores, quando comparados ao Ethylhexyl Methoxycinnamate.

Figura 10. Perfil espectrofotométrico do filtro Ethylhexyl Methoxycinnamate



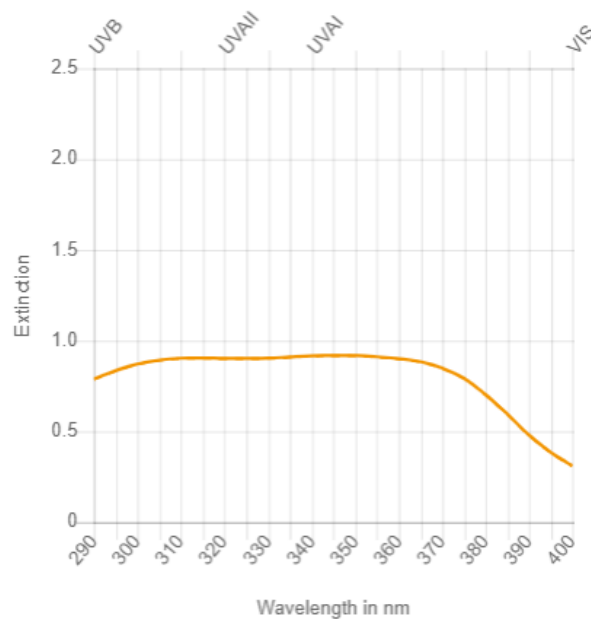
Fonte: Sunscreen Simulator – BASF

Figura 11. Perfil espectrofotométrico do filtro Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine



Fonte: Sunscreen Simulator – BASF

Figura 12. Perfil espectrofotométrico do filtro Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount

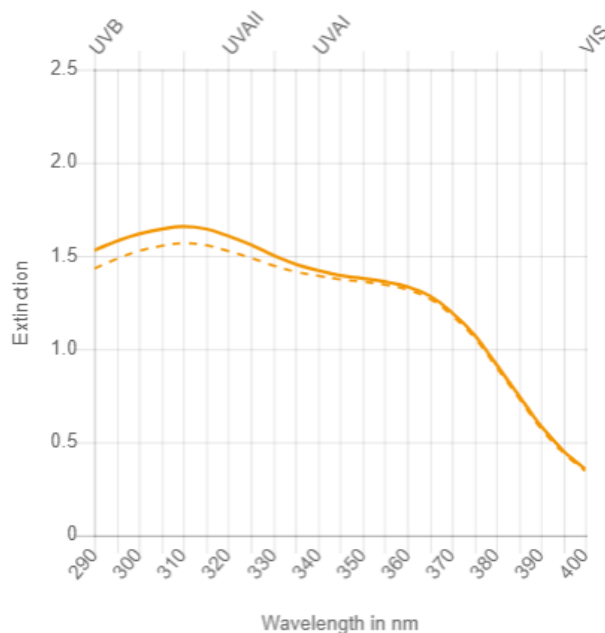


Fonte: Sunscreen Simulator - BASF

A Figura 13 mostra o perfil do espectro dos filtros combinados, nas mesmas concentrações colocadas na formulação. Nota-se que o perfil mudou, possibilitando inferir uma interação química entre os filtros, de forma positiva, aumentando o coeficiente de extinção molar. Desse modo, é possível sugerir que, ao adicionar o extrato de *Byrsonima*, possa ocorrer, também, novas mudanças, aumentando a fotoproteção.

Além disso, a combinação dos filtros orgânicos de efeito químico com o extrato vegetal, seja *B. pachyphylla* A. Juss ou *B. intermedia* A. Juss, permitiu que todas as regiões do ultravioleta, UVA, UVB e UVC, fossem atingidas.

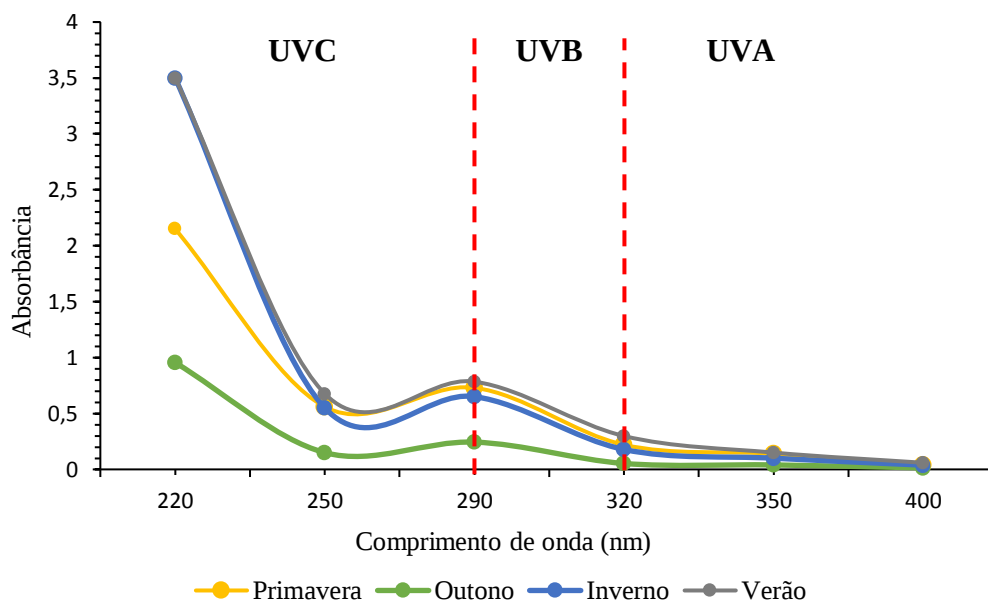
Figura 13. Perfil espectrofotométrico da combinação dos filtros Octyl Methoxycinnamate, Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine e Bis Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount



Fonte: Sunscreen Simulator BASF

E, para o monitoramento do potencial fotoprotetor do extrato de *Byrsonima* em diferentes condições climáticas, foi realizada a varredura espectrofotométrica do extrato etanólico 70° GL das folhas de *B. pachyphylla* A. Juss, nas quatro estações do ano, como mostra a Figura 14. As folhas de *B. pachyphylla* A. Juss foram coletadas no início de cada estação. Os extratos solubilizados em etanol 70°GL, estavam na concentração de 154,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, como branco, foi utilizado o etanol 70°GL.

Figura 14. Varredura espectrofotométrica dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss nas quatro estações do ano



Fonte: Elaborado pela autora

Os extratos analisados na concentração de $154,00 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, apesar de absorver a radiação nos comprimentos de onda correspondentes às radiações UVA, UVB e UVC, apresentaram maior absorção nos comprimentos de onda correspondente à radiação UVC, em todas as estações do ano. Foi possível observar que a varredura realizada com os extratos obtidos com as folhas, colhidas na estação verão, apresentaram maiores valores de absorbância, principalmente no comprimento de onda de 220 nm, seguida da varredura realizada com os extratos obtidos com as folhas colhidas na estação inverno. Já nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm, o extrato preparado com as folhas colhidas na estação primavera, foi o segundo maior.

Essa diferença de absorbância na varredura dos extratos obtidos das folhas de *B. pachyphylla* A. Juss, nas diferentes estações do ano, pode ser explicada pela influência do clima na sintetização de alguns compostos. Martins (2012) demonstra, em seu estudo, que houve variações na concentração de alguns compostos e, consequentemente, nas atividades biológicas das espécies vegetais analisadas em diferentes épocas do ano. Da mesma forma, Pereira & Maia (2007), constataram que as condições climáticas e a quantidade de água no solo podem afetar o metabolismo secundário do vegetal.

Alguns exemplos de fatores que podem alterar a taxa de metabólitos secundários são a sazonalidade, temperatura, radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica, entre

outros, o que mostra a importância de realizar uma busca, em todas as estações do ano, dos compostos de maior interesse como, por exemplo, os compostos fenólicos. Assim, é possível descobrir a melhor época do ano para fazer a coleta do material vegetal de forma mais eficiente (SING; TODARIA, 2012; TANKO et al. 2005).

Os extratos liofilizados de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss estudados no presente trabalho, foram preparados com as folhas colhidas na estação outono. Levando em consideração que neste experimento da varredura dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss obtidos com folhas colhidas nas diferentes estações do ano, o extrato referente à estação outono foi a que apresentou menores valores de absorbância, em todos os comprimentos de onda avaliados, é possível inferir que os resultados de atividade antioxidante e potencial fotoprotetor, por exemplo, seriam ainda mais promissores nos extratos preparados com folhas colhidas na estação verão.

5.4. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi determinada pelas metodologias dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}.

5.4.1. Metodologia de inibição do radical DPPH[•]

O radical DPPH[•] possui coloração violeta intensa e, quando ele é estabilizado pelo antioxidante da amostra, neste caso, os extratos de *Byrsonima*, a solução violeta sofre descoloração para o amarelo claro (Figura 15). A intensidade é proporcional à concentração de substância antioxidante, ou seja, quanto mais clara a solução, mais forte o potencial antioxidante da amostra analisada. Deste modo, torna-se possível avaliar a captura dos radicais DPPH[•] pelo antioxidante testado (MOREIRA, 2010).

Figura 15. Reação da atividade sequestrante do radical DPPH[•] pelos extratos etanólicos de *Byrsonima*

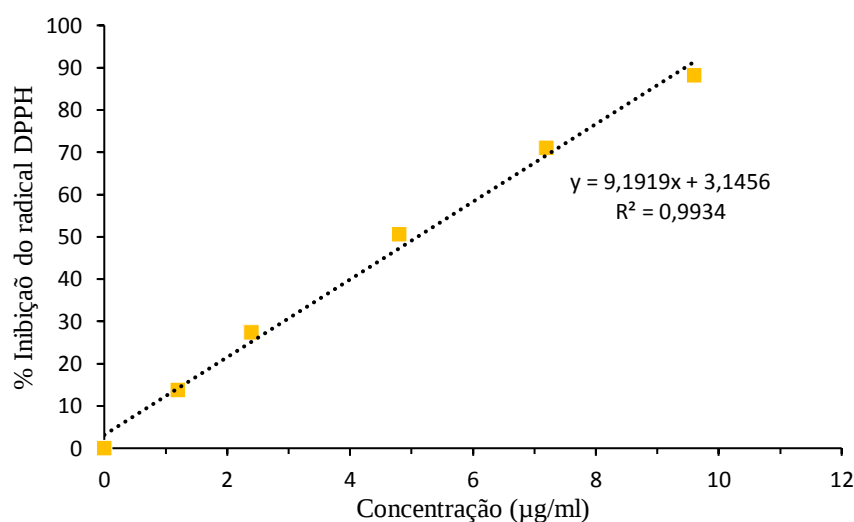


Fonte: Elaborado pela autora

As concentrações avaliadas para ambos extratos foram de $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $12,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O valor de IC_{50} encontrado para a *B. pachyphylla* A. Juss foi $5,097 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para a *B. intermedia* A. Juss foi $4,933 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Sendo assim, ambos apresentaram atividade antioxidante superior à do extrato *Psidium guajava* L, avaliado por Chiari (2011), pela mesma metodologia de análise, o qual teve seu valor de IC_{50} igual à $0,2905 \text{ mg.mL}^{-1}$ ou $290,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

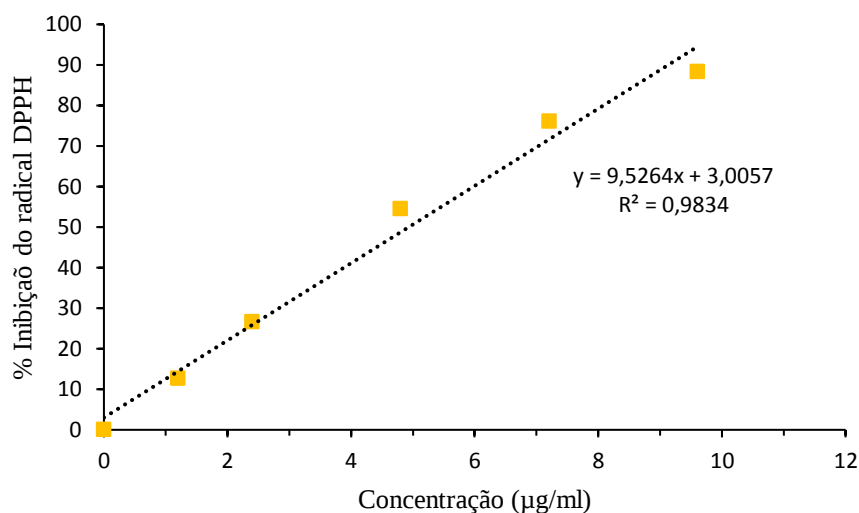
Sofidiya (2012), avaliou a atividade antioxidante das folhas de *Flabellaria paniculata* Cav., espécie vegetal pertencente à família *Malpighiaceae*, assim como a *B. pachyphylla* A. Juss e a *B. intermedia* A. Juss. Nesse estudo, a porcentagem de inibição do radical DPPH• do extrato etanólico absoluto das folhas de *F. paniculata* Cav. foi de 7,43%, na concentração de $80 \mu\text{g. mL}^{-1}$. De acordo com as Figuras 16 e 17, é possível observar que as porcentagens de inibição do radical DPPH•, dos extratos etanólicos da *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, são superiores, em comparação com a *F. paniculata* Cav, desde a concentração mais baixa, $1,2 \mu\text{g. mL}^{-1}$, a qual teve o valor de % de inibição do radical DPPH• igual a 12,64% e 13,67% para *B. intermedia* A. Juss e *B. pachyphylla* A. Juss, respectivamente.

Figura 16. Atividade sequestrante do radical DPPH• pelo extrato etanólico 70° GL de *B. pachyphylla* A. Juss



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 17. Atividade sequestrante do radical DPPH• pelo extrato etanólico 70° GL de *B. intermedia* A. Juss



Fonte: Elaborado pela autora

Rolim (2013) avaliou a atividade antioxidante do extrato etanólico 95° GL das folhas de *B. gardneriana* e o IC₅₀ encontrado para esse extrato foi de 4,955 mg.mL⁻¹ ou 4955 µg.mL⁻¹, ou seja, a atividade antioxidante do extrato etanólico 95° GL da *B. gardneriana*, no estudo de Rolim, também foi inferior à atividade antioxidante dos extratos etanólicos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss deste estudo, provavelmente pela capacidade de solubilização dos compostos bioativos em diferentes solventes extratores.

Segundo Gálvez (2010), a comunidade científica está dando mais importância ao impacto causado pelo estresse oxidativo em todas as áreas da saúde e, como a radiação UV é conhecida por causar danos oxidativos às células da pele, substâncias antioxidantes estão sendo pesquisadas para aplicações tópicas e sistêmicas.

De acordo com Andrade et al. (2018), a atividade antioxidante presente nos extratos de espécies vegetais é justificada pela presença de compostos fenólicos. Rolim e colaboradores (2013) explicam, em seu estudo, que há correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante nos testes realizados com o extrato de *B. gardneriana*. Foi indicado que os flavonoides, componentes isolados no estudo, são responsáveis pela atividade antioxidante desta espécie vegetal.

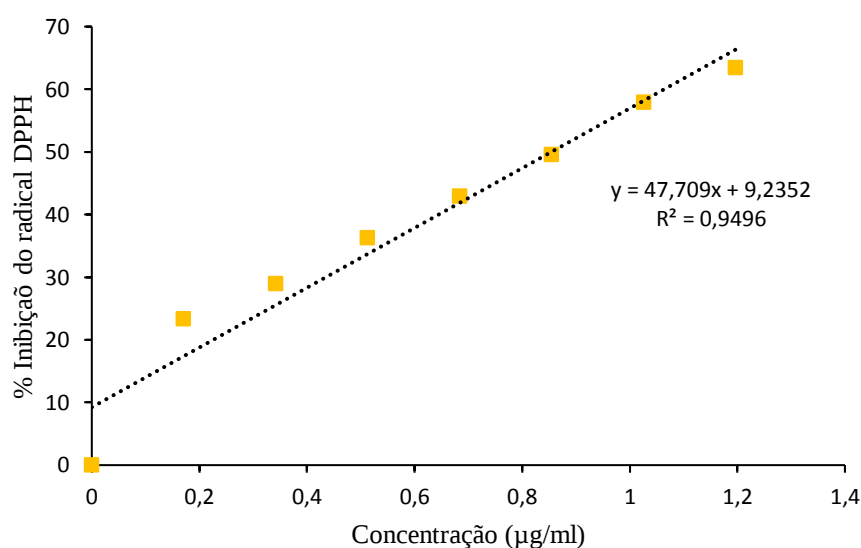
Peres et al. (2013) avaliou a atividade antioxidante de extratos de acetato de etila de sete frutas nativas do Brasil, dentre elas, a *B. intermedia* A. Juss, a qual apresentou valor de IC₅₀ de 1,38 µg.mg⁻¹. Embora a atividade antioxidante encontrada tenha sido

maior, quando comparada à atividade antioxidante dos extratos de *Byrsonima* do presente estudo, deve-se levar em consideração que o solvente utilizado, acetato de etila, pode causar irritação no trato respiratório, na pele e nos olhos do operador, além de tornar o ambiente inflamável e ser tóxico à vida aquática, e, principalmente, não é um solvente adequado para uso cosmético (Quimidrol, 2007).

Braga (2015) avaliou a atividade antioxidante do extrato metanólico de *B. pachyphylla* A. Juss e, nesse teste, o IC_{50} encontrado, $3,16 \mu\text{g. mL}^{-1}$, foi menor que o IC_{50} encontrado nos extratos etanólicos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Jus deste estudo. O metanol é um solvente utilizado, com mais frequência, em alguns processos, devido a sua cadeia curta e polaridade. Entretanto, o etanol está se tornando mais popular, por ser renovável e menos tóxico; assim, o risco de ocorrer acidentes com o operador é menor. Além disso, o metanol não é um solvente adequado para uso cosmético, devido a sua toxicidade, conforme a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) descrita no Anexo.

A curva analítica do ácido gálico foi construída como mostra a Figura 18 e o valor de IC_{50} encontrado foi $0,8544 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Cincotto (2016) realizou, em seu trabalho, uma comparação entre três padrões no ensaio de inibição do radical DPPH[•] (ácido gálico, ácido ascórbico e trolox). Os resultados indicaram que o ácido gálico foi o padrão mais potente dentre os três, o qual teve seu valor de IC_{50} igual a $0,853 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Figura 18. Perfil de captura do radical DPPH[•] pelo ácido gálico



Fonte: Elaborado pela autora

Fazendo um comparativo entre o valor de IC_{50} do padrão ácido gálico e o IC_{50} dos extratos de *Byrsonima*, é possível inferir que seria necessário utilizar uma concentração superior de extrato para inibir a mesma quantidade do radical DPPH[•], em relação ao ácido gálico. Apesar de o ácido gálico ser uma referência em relação a atividade antioxidante, seu uso é dificultado devido à sua facilidade em se degradar quando exposto à luz, diferente dos extratos de *Byrsonima*. Além disso, considerando os princípios da química verde, a atividade antioxidante proveniente de materiais vegetais, como os extratos de *Byrsonima*, é avaliada como sendo mais vantajosa (LENARDÃO et al., 2003).

5.4.2. Metodologia de inibição do radical ABTS^{•+}

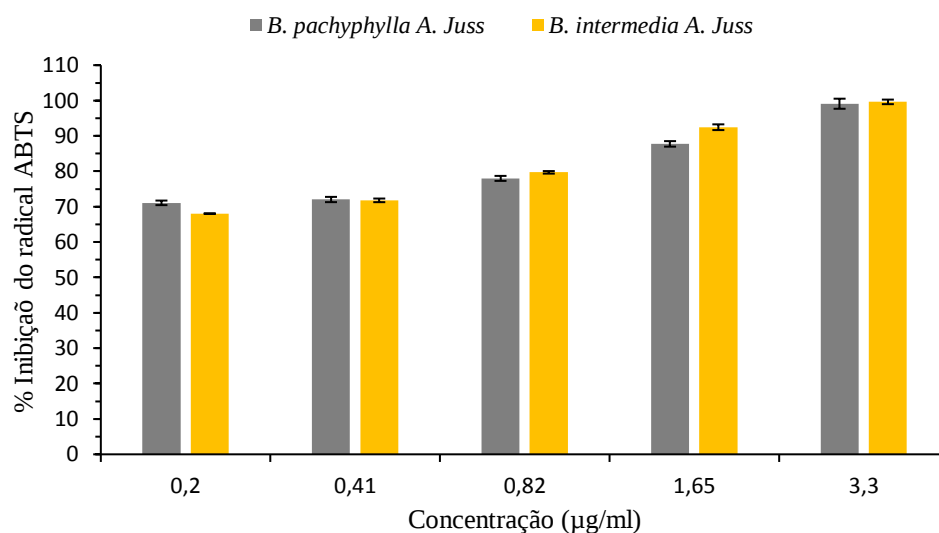
A atividade antioxidante dos extratos etanólicos 70°GL de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss foi determinada, também, pela metodologia do radical ABTS^{•+} para a obtenção de mais dados sobre estes extratos. O radical ABTS^{•+} é formado pela reação com persulfato de potássio (MARQUELE et al., 2006; ALMEIDA, 2013).

Para avaliar a atividade antioxidante pela metodologia de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}), foi utilizada metodologia proposta por Rufino et al. (2007). O radical ABTS^{•+} é formado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio, na ausência de luz, à temperatura ambiente, por, aproximadamente, 16 horas (RUFINO et al., 2007).

Neste ensaio, observa-se a descoloração do meio reacional, no qual o radical ABTS^{•+}, em sua forma oxidada, apresenta coloração verde e, após a adição de substâncias antioxidantes, se torna incolor. Quanto mais próximo do incolor, maior a atividade antioxidante e maior a concentração da amostra analisada.

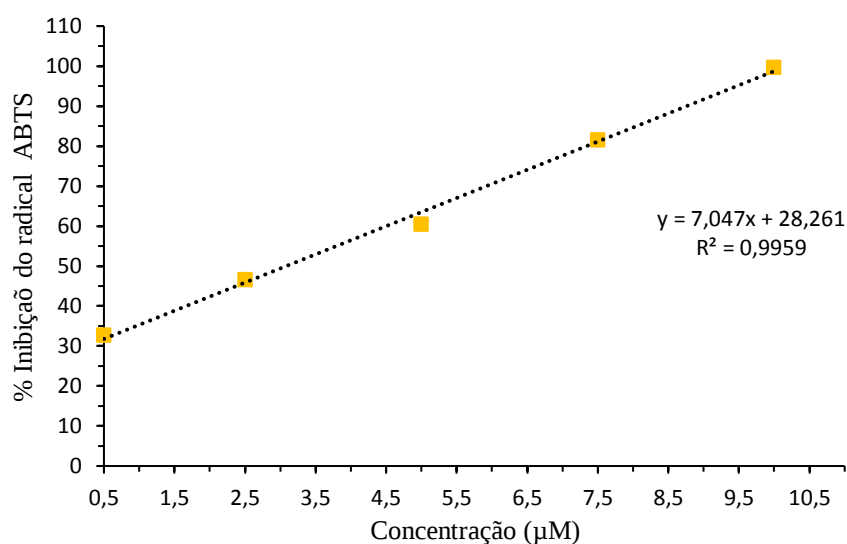
A menor concentração testada, para ambos os extratos, na atividade sequestrante do radical ABTS^{•+}, foi 0,2 µg.mL⁻¹. Nessa concentração, a porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} encontrada foi 71,0% para o extrato de *B. pachyphylla* A. Juss e 68,3% para o extrato de *B. intermedia* A. Juss (Figura 19); ou seja, mesmo em concentração muito baixa, os extratos de *Byrsonima* foram capazes de inibir mais que 50% o radical ABTS^{•+}. Foi construída uma curva analítica com o Trolox, a fim de certificar a eficiência da metodologia, como mostra a Figura 20.

Figura 19. Atividade sequestrante do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelos extratos etanólicos 70° GL de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 20. Perfil de captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo Trolox



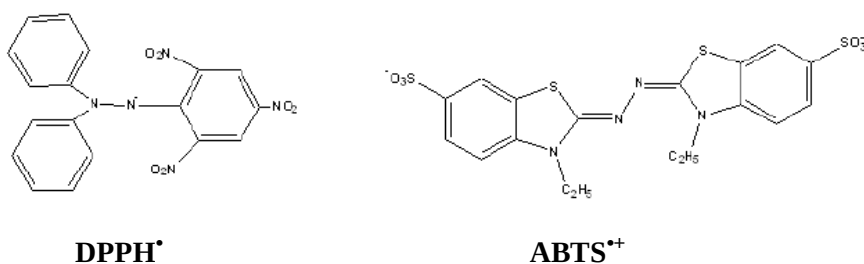
Fonte: Elaborado pela autora

Rolim e colaboradores (2013), também avaliaram a atividade antioxidante da *B. gardneriana* A. Juss pelas metodologias de sequestro dos radicais $\text{DPPH}^{\bullet}$ e $\text{ABTS}^{\bullet+}$. E, assim, como aconteceu no presente trabalho, os extratos de *B. gardneriana* A. Juss

apresentaram melhor atividade antioxidante na metodologia de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

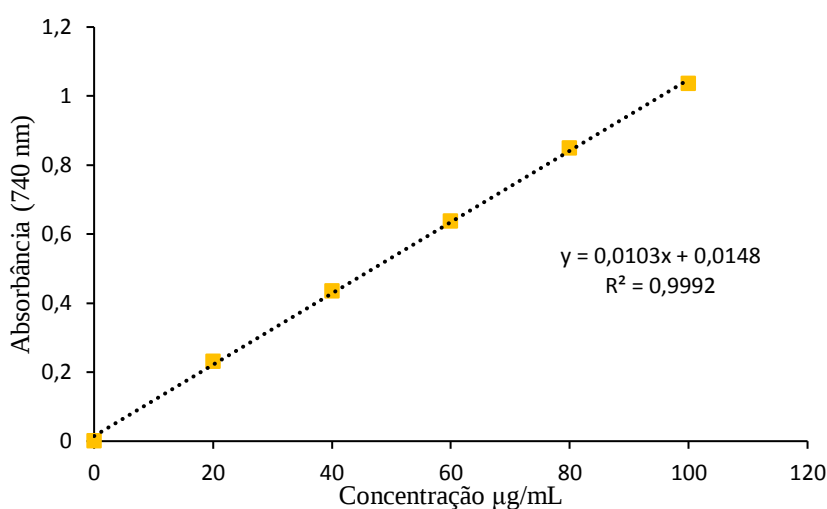
A metodologia de captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e a metodologia de captura do radical $\text{DPPH}^{\bullet}$ utilizam um radical modelo e ambos são baseados em reações de oxido-redução, analisadas espectrofotometricamente. As diferenças entre eles estão relacionadas com as estruturas químicas (Figura 21) e o potencial redox, o que torna as suas colorações diferentes (CINCOTTO, 2016).

Figura 21. Estrutura química dos radicais $\text{DPPH}^{\bullet}$ e $\text{ABTS}^{\bullet+}$



O ácido gálico foi utilizado como padrão e sua curva analítica, mostrada na Figura 22, foi utilizada como parâmetro para os cálculos das concentrações de compostos fenólicos, as quais foram expressas em µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100 µg de extrato.

Figura 22. Curva analítica do ácido gálico para determinação do teor de compostos fenólicos totais



Fonte: Elaborado pela autora

Os extratos etanólicos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Jus foram avaliados na concentração de 41,66 µg.mL⁻¹ quanto à presença de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidades de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de folhas de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss

Extratos vegetais	µg CFEAG*/ 100µg de extrato (média ± DP)
<i>B. pachyphylla</i> A. Juss	49,44±1,23 ^a
<i>B. intermedia</i> A. Juss	66,45±1,29 ^b

^{a, b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,001)

*CFEAG: compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico; DP: desvio padrão

Fonte: Elaborado pela autora

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que o extrato de *B. intermedia* A. Juss contém maior quantidade de compostos fenólicos que o extrato de *B.*

pachyphylla A. Juss. Embora a diferença tenha sido muito pequena em relação à atividade antioxidante dos dois extratos, o extrato de *B. intermedia* A. Juss também apresentou melhor atividade antioxidante pelo método do radical DPPH[•]. Importante ressaltar que os extratos de *Byrsonima* avaliados neste ensaio, foram preparados com as folhas colhidas na estação outono. Levando em consideração que, no experimento da varredura dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss obtidos com folhas colhidas nas diferentes estações do ano, o extrato referente à estação outono foi o que apresentou menores valores de absorbância em todos os comprimentos de onda avaliados, é possível inferir que a quantidade de compostos fenólicos totais presentes nos extratos seria ainda maior nos extratos preparados com folhas colhidas na estação verão.

Peres et al. (2013) descobriu, em seu estudo, que a quantidade de fenólicos totais presentes em um material vegetal se correlacionou, significativamente, com a capacidade antioxidante. Segundo Rolim e colaboradores (2013), essa correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante tem sido amplamente estudada em compostos vegetais. Os polifenóis têm sido apontados como os responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos.

De acordo com Silva e Rogez (2013), os compostos fenólicos totais, presentes no extrato de folhas de *Byrsonima crassifolia*, apresentam compostos como quercetina-3-O- α -L-glicosídeo, epigallocatequina galato e ácido gálico, o qual é encontrado em maior quantidade.

Peres et al. (2013) determinaram o conteúdo de compostos fenólicos totais de extratos de sete frutas nativas do Brasil, dentre elas, a *B. intermedia* A. Juss. Os teores de compostos fenólicos encontrados para o extrato etanólico e para a fração de acetato de etila foram de $119,12 \pm 9,28$ μ g de GAE/mg de extrato e $181,12 \pm 14,84$ μ g de GAE/mg de extrato, respectivamente. Convertendo mg de extrato para 100 μ g de extrato, os resultados encontrados são 11,91 μ g de GAE/100 μ g de extrato e 18,11 μ g de GAE/100 μ g de extrato; ou seja, ambos os valores são inferiores aos valores encontrados para os extratos etanólicos 70° GL de *Byrsonima*, avaliados no presente estudo, corroborando, mais uma vez, que o solvente extrator é significativo para a solubilização e/ou extração dos compostos bioativos das espécies vegetais.

No estudo de Romão (2016), foi avaliado o teor de compostos fenólicos totais de extratos de folhas de *C. verbenacea*. O extrato que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi o extrato etanólico 70° GL, o qual apresentou 14,44 μ g de compostos

fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100 µg de extrato; ou seja, um valor abaixo dos valores encontrados nos extratos de *Byrsonima*.

Isso também pôde ser observado quando comparado com o extrato de *Ascophyllum nodosum*, avaliado no estudo de Almeida (2013), o qual apresentou 7,04 µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100 µg de extrato. Assim, as diferentes espécies vegetais, bem como os diferentes gêneros, podem apresentar metabólitos em concentrações diferentes, o que implica em atividades cosméticas mais ou menos efetivas.

A atividade antioxidante dos extratos de *Byrsonima* estudados nesse trabalho, podem ser maiores que os valores de atividade antioxidante obtidos pelos autores citados, favorecendo o emprego dos extratos de *Byrsonima* para a obtenção de um produto antioxidante e que apresente efeito fotoprotetor ou, mesmo, fotoestabilizador.

Segundo o estudo de Shouquin (2005), há uma grande influência na extração de flavonoides, compostos pertencentes à classe dos fenólicos totais, pela concentração de etanol e água. Eles afirmaram que, quando o volume de etanol presente no solvente é menor que 75% (v/v), a extração dos flavonóides é maior e, quando a concentração de etanol é maior que 75%, esta extração de flavonoides é reduzida. Desta forma, o teor alcoólico pode ser uma das razões pelas quais os extratos etanólicos 70° GL de *Byrsonima* tenham apresentado valores superiores de compostos fenólicos em relação ao extrato etanólico de *B. intermedia* A. Juss no estudo de Peres et al. (2013).

A presença dos compostos fenólicos nos extratos de *Byrsonima* é um grande passo na obtenção de um cosmético contendo produtos de origem vegetal, uma vez que os compostos fenólicos encontrados nas espécies vegetais podem apresentar a capacidade de proteger os componentes celulares contra os efeitos fototóxicos causados pela luz ultravioleta. A atividade dos compostos fenólicos pode ser atribuída a sua habilidade de quelar metais, sequestrar radicais livres, entre outros (ROSA, 1996).

A Tabela 4 compara os teores de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico de diferentes autores e os obtidos neste trabalho.

Tabela 4. Comparação entre os teores de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico de diferentes autores e os obtidos neste trabalho.

Autor	Extrato	Resultado
Peres et al. (2013)	Etanólico do fruto <i>B. intermedia</i> A. Juss	119,12 ± 9,28 µg de GAE/mg de extrato
Peres et al. (2013)	Fração de acetato de etila do fruto de <i>B. intermedia</i> A. Juss	181,12 ± 14,84 µg de GAE/mg de extrato
Romão (2016)	Etanólico 70° GL de folhas de <i>C. verbenacea</i>	14,44 µg CFEAG/100 µg de extrato
Almeida (2013)	Aquoso de <i>Ascophyllum nodosum</i>	7,04 µg CFEAG/100 µg de extrato
Rodrigues (2020)	Etanólico de folhas de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss	49,44±1,23 µg CFEAG/ 100µg de extrato
Rodrigues (2020)	Etanólico de folhas de <i>B. intermedia</i> A. Juss	66,45±1,29 µg CFEAG/ 100µg de extrato

Fonte: Elaborado pela autora

5.6. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de folhas do gênero *Byrsonima*

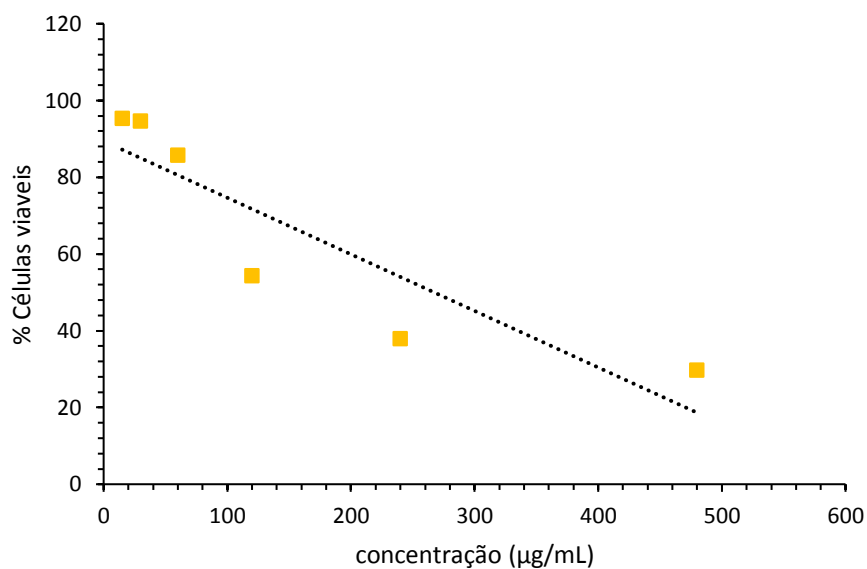
A avaliação da citotoxicidade dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss foi realizada com três linhagens celulares, HepG2, HDFa e HaCaT. A linhagem de células HepG2, são caracterizadas por serem células de hepatoma humano, capazes de avaliar se os metabólitos formados, pela metabolização das substâncias presentes no extrato, apresentam toxicidade a esta linhagem celular. As células HDFa, são fibroblastos humanos e estão presentes, em maior proporção, na derme. E a linhagem de célula HaCaT, queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes, foi utilizada por se tratar de um estudo para fins cosméticos; portanto, será aplicado na pele, a qual apresenta, como principal tipo celular na epiderme, o queratinócito (CHIARI, 2011; ROMÃO, 2016).

O potencial citotóxico dos extratos foi avaliado pelo método do 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), que tem, como princípio, a determinação da capacidade de células vivas em reduzirem o MTT, formando cristais insolúveis de formazana, os quais têm coloração violeta.

Os extratos foram testados nas mesmas concentrações, de 15 a 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, nas três linhagens celulares, a fim de comparar o potencial citotóxico entre as linhagens. Na avaliação citotóxica com as linhagens HepG2, a concentração máxima dos extratos de *Byrsonima* testada não atingiram 50% de morte celular, ou seja, a citotoxicidade foi menor quando comparada às linhagens celulares HaCaT e HDFa, as quais apresentaram valores de IC_{50} igual a 199,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 263,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, respectivamente, nas células HaCaT e 150,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 216,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para os extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, respectivamente, nas células HDFa. No estudo de Cincotto (2016), o extrato etanólico 70° GL de folhas de *Morus nigra* L. apresentou citotoxicidade menor em células da linhagem HepG2, corroborando com os resultados deste estudo, quando a citotoxicidade, em células HepG2, foi menor quando comparada às células HaCaT e HDFa.

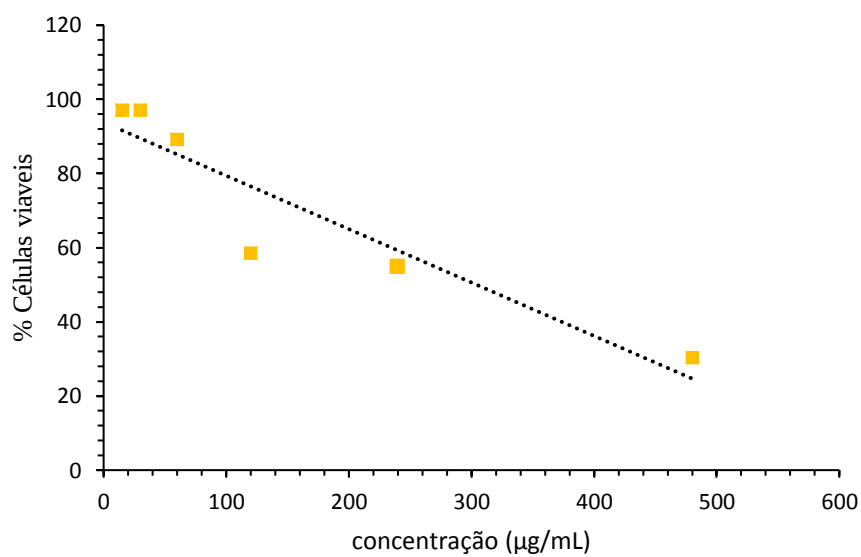
Os perfis concentração-resposta dos extratos estão representados nas Figuras 23 a 28. Foi possível verificar que as concentrações necessárias para atingir o IC_{50} foram muito maiores do que as concentrações necessárias para inibir 50% dos radicais $\text{DPPH}^{\bullet}$ e $\text{ABTS}^{+\bullet}$, uma vez que os valores de IC_{50} encontrados para atividade antioxidante foram menores que 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 23. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HDFa, após tratamento com extrato *B. pachyphylla* A. Juss



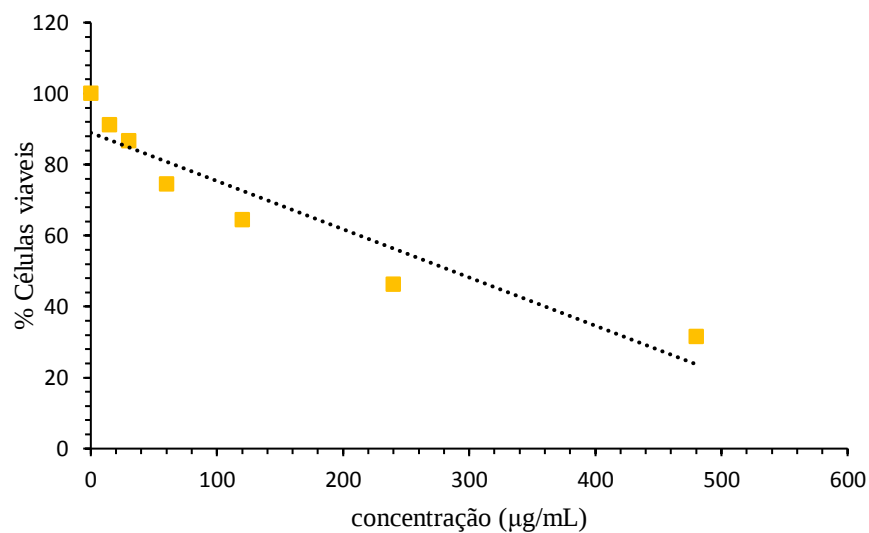
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 24. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HDFa, após tratamento com extrato *B. intermedia* A. Juss



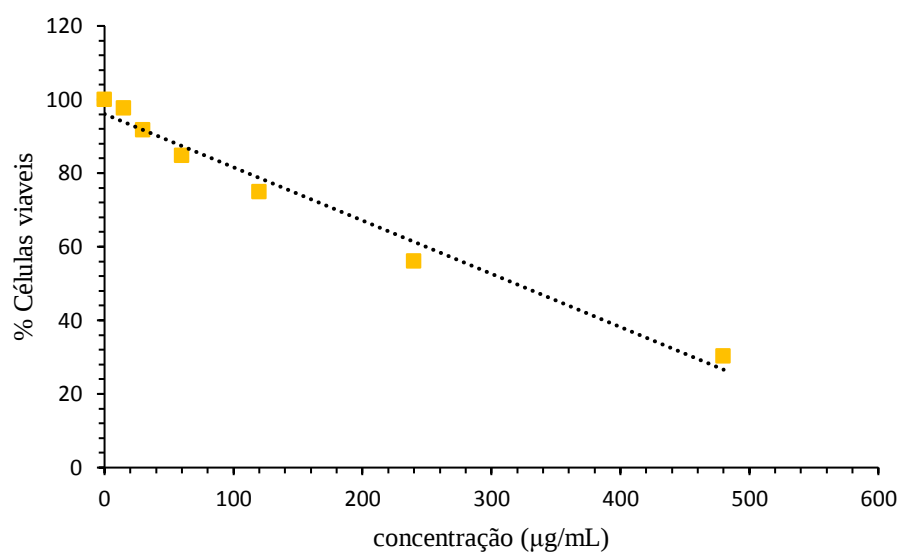
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 25. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HaCaT, após tratamento com extrato *B. pachyphylla* A. Juss



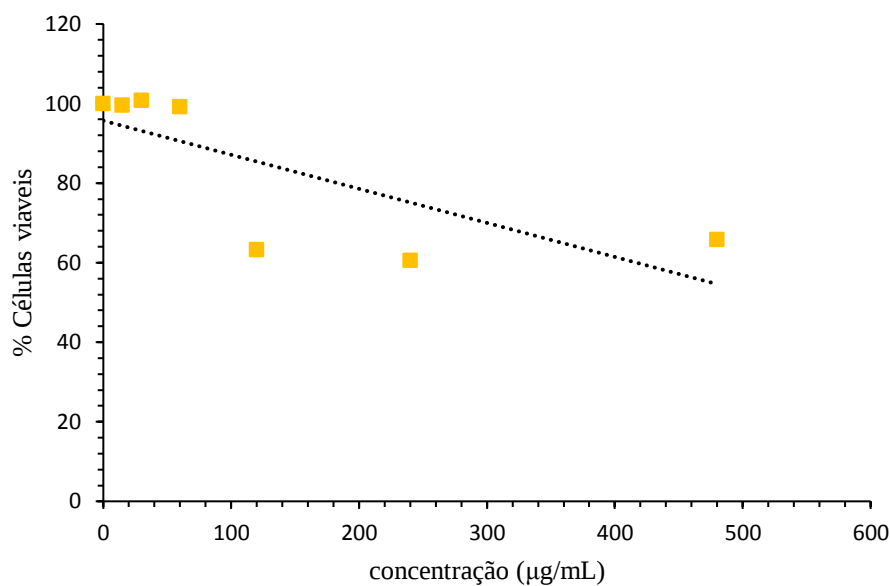
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 26. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HaCaT, após tratamento com extrato *B. intermedia* A. Juss



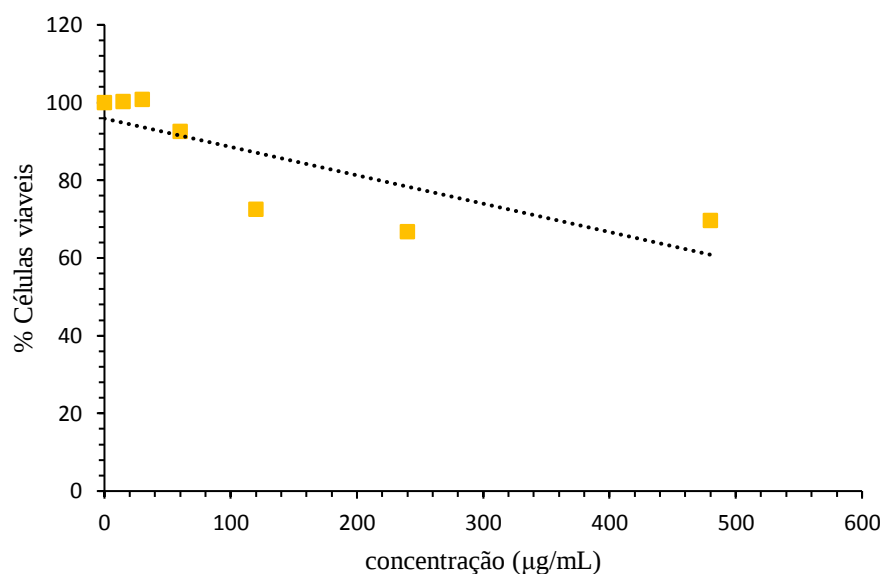
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 27. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HepG2, após tratamento com extrato *B. pachyphylla* A. Juss



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 28. Perfil concentração-resposta de citotoxicidade para células HepG2, após tratamento com extrato *B. intermedia* A. Juss.



Fonte: Elaborado pela autora

Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (*American National Cancer Institute, NCI*), um extrato vegetal é considerado citotóxico com valor de $IC_{50} < 30,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ROMÃO, 2016) e os extratos etanólicos 70° GL de *B. pachyphylla* A. Juss e *B.*

intermedia A. Juss apresentaram valor de IC₅₀ aproximadamente 5 e 6 vezes maior que este valor, respectivamente.

É importante ressaltar que a avaliação da citotoxicidade *in vitro* apresenta algumas limitações, uma vez que é realizada com células em monocamada, bidimensional e não fisiológica; ou seja, não reproduz a arquitetura tecidual *in vivo*, tridimensional, quando as células raramente agem separadas. Dessa forma, a presença de efeito citotóxico *in vitro* não garante que a amostra seja realmente tóxica quando aplicada *in vivo*. Assim, é necessário mais de um ensaio *in vitro* para determinar a viabilidade celular (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; DEMARCO et al., 1998; PIZZOFERRATO et al., 1994).

5.7. Desenvolvimento das emulsões

Antes de definir a formulação do fotoprotetor final, foram testadas algumas formulações, sem os extratos vegetais, com o intuito de escolher a que apresentasse sensação menos oleosa e rápida secagem. Para isso, foram utilizadas matérias primas convencionais de formulações fotoprotetoras. A Tabela 4 apresenta a função de cada componente presente nas emulsões desenvolvidas.

Tabela 5. Componentes das emulsões desenvolvidas e suas funções

INCI name	Nome comercial	Função
Cetareth – 20	Álcool Cetoestearílico etoxilado 20 OE	Emulsificante não-iônico
Cetearyl Alcohol	Álcool cetoestearílico	Agente de consistência
Glyceryl Stearate	Monoestearato de glicerila	Agente de consistência
Dibutyl adipate	Adipato de dibutila	Emoliente
Ethylhexyl stearate	Estearato de octila	Emoliente
Caprylic/Capric Triglyceride	Triglicerídeo de ácido cáprico caprílico	Emoliente
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	Tinosorb® S	Filtro orgânico (efeito químico)
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount	Tinosorb® S Lite Aqua	Filtro orgânico (efeito químico)
Ethylhexyl Methoxycinnamate	Metoxicinamato de Etilhexila	Filtro orgânico (efeito químico)
butylated hydroxytoluene	BHT	Antioxidante
Propylene Glycol	Propilenoglicol	Umectante
Propylparaben	Propilparabeno	Conservante antimicrobiano
Methylparaben	Metilparabeno	Conservante antimicrobiano
Disodium EDTA	EDTA Na ₂	Agente sequestrante
Aqua	Água	Veículo
<i>B. pachyphylla</i> A. Juss extract	Extrato de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss	Antioxidante
<i>B. intermedia</i> A. Juss extract	Extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss	Antioxidante

Fonte: Elaborado pela autora

A água foi o componente presente na formulação em maior quantidade, e sua função aqui é solvente de matérias primas como, por exemplo, o EDTA Na₂ e conservantes antimicrobianos. Foi utilizada água purificada, pois ela deve ser isenta de íons e microrganismos (CORRÊA, 2012).

O Cetareth-20 (Álcool Cetoestearílico etoxilado 20 OE), emulsificante não-iônico, foi escolhido por apresentar compatibilidade com o pH da pele e por possibilitar a incorporação de diversas substâncias ativas como, por exemplo, os extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss (CHIARI, 2011).

O Cetaryl Alcohol (Álcool cetoestearílico), é um agente de consistência capaz de aumentar a viscosidade da formulação, sendo que, nas emulsões propostas, ele foi associado com o Glyceryl Stearate (Monoestearato de glicerila), que possui a mesma finalidade, além de ser ótimo para uso em formulações cosméticas fotoprotetoras, pois apresenta um baixo índice de irritabilidade dérmica e ocular (CHIARI, 2011; CHEMAX, 2020).

Os emolientes Dibutyl adipate, Ethylhexyl stearate e Caprylic/Capric Triglyceride são matérias primas graxas, capazes de fornecer espalhabilidade para a emulsão, proporcionando suavidade à pele. O Propylene Glycol, um umectante e agente de permeação cutânea, auxilia na solubilização de ativos hidrossolúveis, como os extratos liofilizados de *Byrsonima*, e possui a função de reter água, equilibrando a troca aquosa entre a emulsão e o ar (BENSON, 2019; CORRÊA, 2012; MAPRIC, 2020).

O BHT tem a função de prevenir os processos oxidativo, e o EDTA Na₂ potencializa a ação do conservante, pois tem propriedades sequestrantes, formando quelatos estáveis, impedindo o crescimento de microrganismos. Já o Propylparaben e o Methylparaben, bastante efetivos em uma ampla faixa de pH, são conservantes antimicrobianos de amplo espectro (CORRÊA, 2012).

O filtro Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount (Tinosorb® S Lite Aqua) foi escolhido por ter elevada eficiência em baixa concentração e ser de amplo espectro, assim como seu equivalente, Bis-ethylhexymethoxyphenyl triazine (Tinosorb® S). O Metoxicinamato de Etilhexila é um filtro com alto poder de absorção da radiação UVB (BASF, 2020).

Para o preparo dessas emulsões, foram aquecidas as fases aquosa e oleosa, separadamente, em banho-Maria até atingir uma temperatura de aproximadamente 80° C e, então, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, com agitação constante.

Posteriormente, foram incorporados a essas formulações 0,5% dos extratos de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss, separadamente. E para isso, os extratos foram solubilizados previamente em propilenoglicol e, depois, adicionados na formulação recém preparada. Foram testadas outras concentrações de extratos de *Byrsonima*, mas a concentração de 0,5% se mostrou mais promissora, visto que, nessa concentração, já foi possível obter potencial fotoestabilizador e atividade antioxidante.

5.8. Avaliação do efeito fotoestabilizador do FPS das emulsões fotoprotetoras contendo extrato de *Byrsonima*

Sabendo que o valor do FPS *in silico*, calculado no software “BASF – Sunscreen Simulator”, foi 36,8, foram obtidos os valores de FPS *in vitro* das formulações, pelo equipamento Optometrics® SPF 290S, mostrados na Tabela 5.

Segundo Brown e Diffey (1986), a quantidade de 2 mg/cm² de aplicação de produto, foi determinada baseando-se na observação de que quantidades inferiores reduzem a homogeneidade do filme protetor formado na pele. Os autores concluem que essa quantidade de protetor solar é capaz de formar um filme de 1mm de espessura sobre a região facial.

Tabela 6. Fator de proteção solar das emulsões desenvolvidas

Formulações		Média dos FPS ± desvio padrão
1	Emulsão base	0,97 ± 0,09 ^a
2	Emulsão com filtros orgânicos de efeito químico	36,66 ± 1,09 ^b
3	Emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss 0,5%	37,93 ± 0,10 ^c
4	Emulsão sem filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de <i>B. pachyphylla</i> A. Juss 0,5%	1,00 ± 0,12 ^a
5	Emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5%	40,29 ± 0,71 ^d
6	Emulsão sem filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de <i>B. intermedia</i> A. Juss 0,5%	1,03 ± 0,10 ^a

^{a,b,c,d} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,01)

Fonte: Elaborado pela autora

Analisando os resultados, é possível observar que a adição dos extratos obtidos das folhas de *Byrsonima* resultaram em um aumento, estatisticamente significativo, no valor do FPS com os filtros orgânicos de efeito químico presentes na emulsão. Fazendo um comparativo entre os extratos, o extrato obtido das folhas de *B. intermedia* A. Juss, apresentou valor de FPS superior ao extrato obtido das folhas de *B. pachyphylla* A. Juss. O extrato obtido das folhas de *B. intermedia* A. Juss também apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais; dessa forma, pode-se inferir que o aumento do FPS pode ser explicado pela maior concentração de compostos fenólicos totais.

Infelizmente, quando incorporados isoladamente na formulação; ou seja, sem a adição dos filtros orgânicos, ambos os extratos não apresentaram atividade fotoprotetora. Leone (2018), integrante do nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Cosmetologia da FCF – UNESP, utilizou óleo de café verde, incorporado em emulsões. Quando associado com alguns filtros orgânicos, como a Benzophenone-3, o óleo de café verde proporcionou um aumento no valor do FPS, de 4,52 para 11,86, mas, quando incorporado, isoladamente, na emulsão, o óleo de café verde não apresentou valor de FPS.

A emulsão fotoprotetora com extrato de *Byrsonima* inicialmente proposta, não continha em sua fórmula alguns componentes da fórmula apresentada na Tabela 1, como por exemplo, o Glyceryl Stearate, Caprylic/Capric Triglyceride e Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine●, active amount. Os filtros utilizados nessa formulação inicial foram 8% de Ethylhexyl Methoxycinnamate, 1% de Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine e 4% de Aqua (and) Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (and) Polymethylmethacrylate (Tinosrb® S Aqua).

O valor de FPS encontrado para essa emulsão fotoprotetora, inicialmente proposta, sem o extrato de *Byrsonima*, foi de 32,34. E quando adicionado 0,5% de extrato de *B. intermedia* A. Juss, o valor de FPS encontrado foi 46,45, ou seja, teve-se um aumento de, aproximadamente, catorze pontos. Mas, após alguns dias, essa formulação se mostrou instável, exigindo alteração na fórmula, a qual está descrita na Tabela 1. No entanto, como foi possível observar, a alteração na formula não promoveu o mesmo aumento no FPS.

Além disso, frente a outros trabalhos, o extrato de *B. intermedia* A. Juss, quando incorporado na emulsão fotoprotetora, descrita na Tabela 1, não apresentou um efeito sinérgico significativo quando incorporado na formulação proposta; ao contrário, promoveu uma fotoestabilidade dos filtros solares, mantendo o FPS necessário à proteção

do consumidor. Com isso, pode-se inferir que a mistura dos filtros orgânicos de efeito químico, bem como a escolha dos componentes da formula estão diretamente ligados com seu efeito fotoprotetor.

5.9 Estudo de estabilidade das emulsões

Diante dos experimentos realizados, com os extratos de *Byrsonima*, o extrato de *B. intermedia* A. Juss apresentou resultados mais promissores e, em razão disso, ele foi o escolhido para dar continuidade no estudo de estabilidade. As fórmulas das emulsões avaliadas no teste de estabilidade estão descritas na Tabela 1.

5.9.1 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado para avaliar a estabilidade das formulações, quanto à separação de fases. Este ensaio simula um aumento na força de gravidade, conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004). As emulsões, em todas as condições de temperatura, não apresentaram separação de fase, indicando que não houve instabilidade; portanto, sem necessidade de reformulação.

5.9.2 Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica foi realizada para avaliar alterações no aspecto, coloração e odor das formulações, mas, também, para observar uma possível separação de fase. Todas as amostras foram avaliadas macroscopicamente durante os 90 dias do teste de estabilidade acelerada, tomando-se como referência as avaliações do dia 1, ou seja, 24 h após a manipulação, como mostra a Figura 29 (BRASIL, 2004).

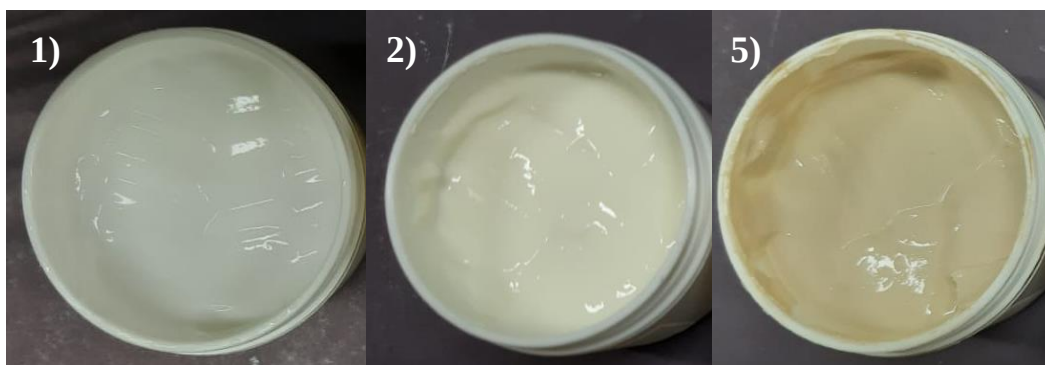
A emulsão base apresentou coloração branca brilhante. A emulsão fotoprotetora, contendo apenas os filtros orgânicos, apresentou coloração amarelada brilhante, devido à presença dos filtros e a emulsão contendo os filtros orgânicos e o extrato de *B. intermedia* A. Juss, esverdeada brilhante. Todas as formulações desenvolvidas apresentaram sensorial agradável ao toque, elevada espalhabilidade e secagem rápida.

Em relação às características organolépticas (aspecto, cor e odor), as formulações testadas se mantiveram inalteradas, nas diferentes condições de estresse, em diferentes temperaturas, ao longo dos dias de estudo da estabilidade, com exceção da coloração da emulsão fotoprotetora com extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5%, no qual foi observado

um escurecimento a partir do 15º dia, na emulsão submetida à temperatura de $40\pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 30).

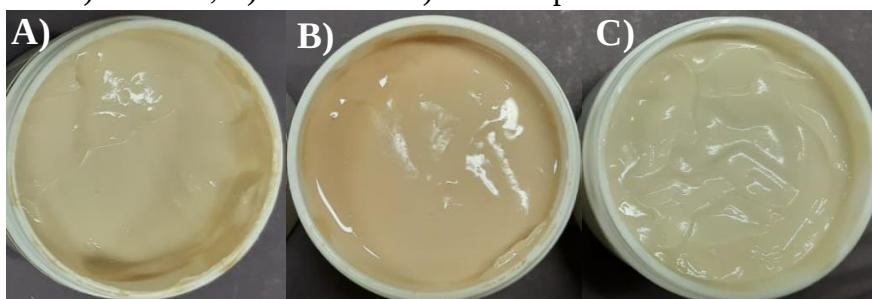
A partir do 30º dia, todas as emulsões fotoprotetoras contendo extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5%, sofreram alteração na coloração, indo de esverdeado para marrom, conforme pode ser visualizado nas Figuras 31 e 32. Mas, é possível notar que as emulsões submetidas à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e $5\pm 2^\circ\text{C}$ não sofreram tanta alteração na coloração quando a emulsão submetida à temperatura de $40\pm 2^\circ\text{C}$. Esta alteração de coloração pode significar degradação de componentes da formulação, bem como produtos de reação de oxidação (MALHEIROS, 2007).

Figura 29: Dia 1 das emulsões desenvolvidas, sendo 1) Creme base; 2) Fotoprotetor com filtros orgânicos de efeito químico; 5) Fotoprotetor com extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5%



Fonte: Fotografia obtida pela autora

Figura 30: Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5% em A) $25\pm 2^\circ\text{C}$, B) $40\pm 2^\circ\text{C}$ e C) $5\pm 2^\circ\text{C}$ após 15 dias de análise



Fonte: Fotografia obtida pela autora

Figura 31: Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5% em A) $25\pm 2^\circ\text{C}$, B) $40\pm 2^\circ\text{C}$ e C) $5\pm 2^\circ\text{C}$ após 30 dias de análise



Fonte: Fotografia obtida pela autora

Figura 32: Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5% em A) $25\pm 2^\circ\text{C}$, B) $40\pm 2^\circ\text{C}$ e C) $5\pm 2^\circ\text{C}$ após 70 dias de análise



Fonte: Fotografia obtida pela autora

Figura 33: Avaliação macroscópica do fotoprotetor contendo extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5% em A) $25\pm 2^\circ\text{C}$, B) $40\pm 2^\circ\text{C}$ e C) $5\pm 2^\circ\text{C}$ após 90 dias de análise



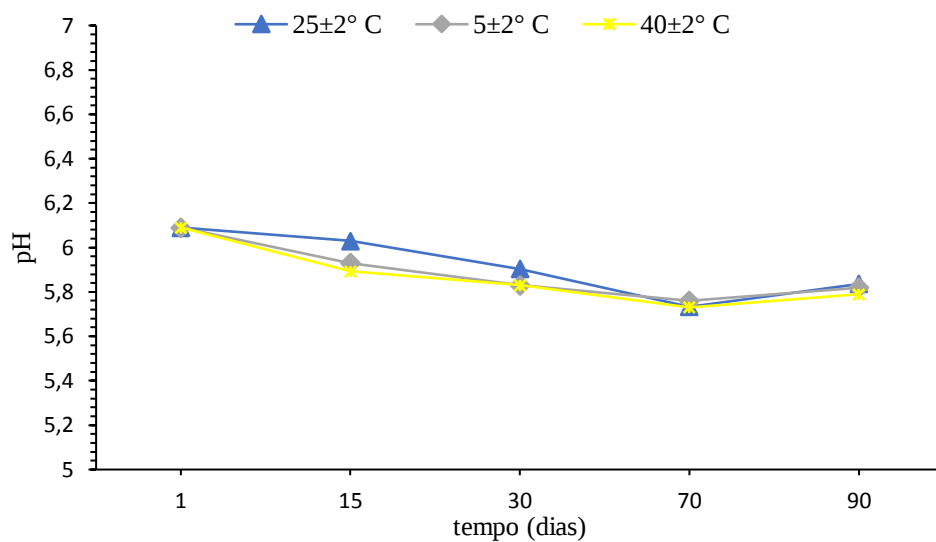
Fonte: Fotografia obtida pela autora

5.9.3 Determinação do pH

A avaliação do pH é um dos parâmetros utilizados para monitorar possíveis alterações na estrutura da formulação, as quais podem ser imperceptíveis visualmente. Esta análise pode indicar interação entre os componentes da formulação ou problemas de estabilidade. Mudanças no valor do pH, ao longo do tempo, podem indicar a ocorrência de reações de hidrólise, oxidação, ou contaminação bacteriana (BRASIL, 2004;

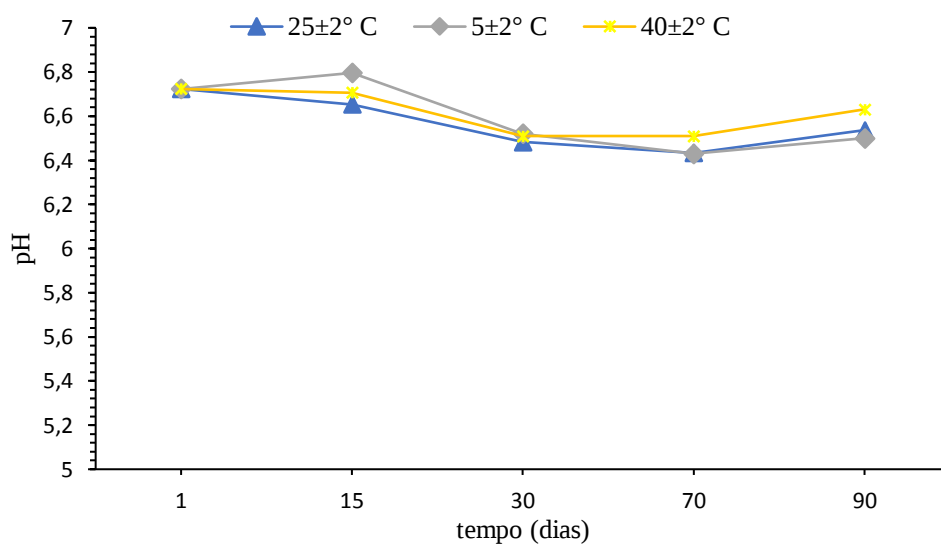
GONÇALVES et al, 2017). Ao longo desse período do ensaio de estabilidade, foram observadas pequenas variações entre os valores determinados do pH das três emulsões desenvolvidas, como pode ser observado nas Figuras 33 a 35.

Figura 34. Valores de pH da emulsão base



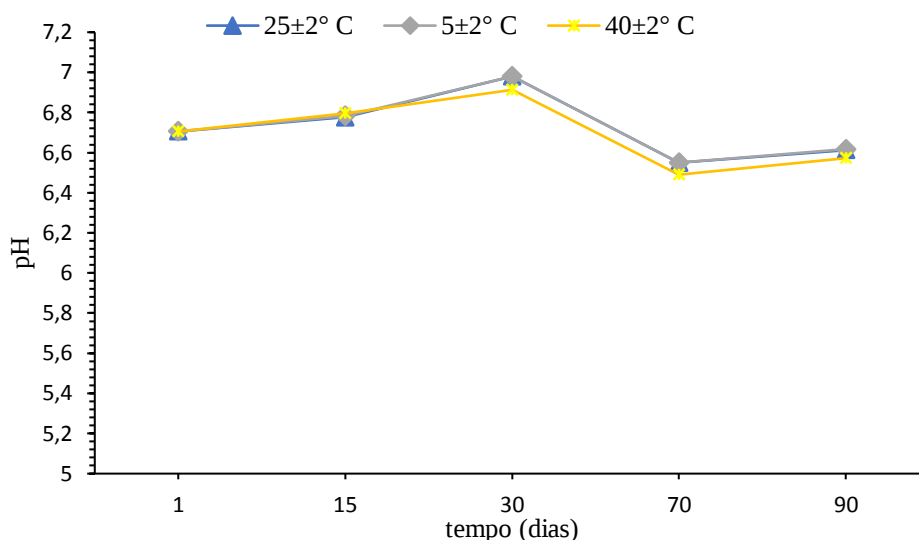
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 35. Valores de pH da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5%



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 36. Valores de pH da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico



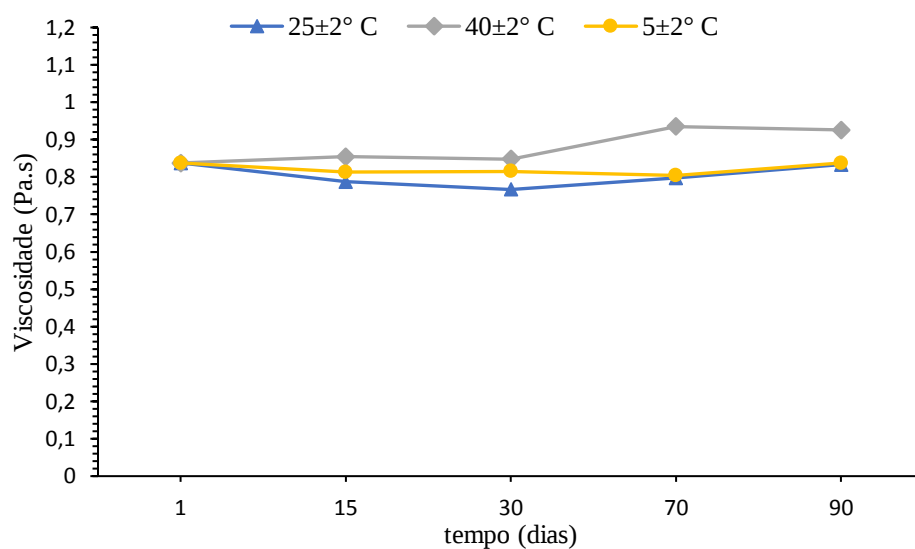
Fonte: Elaborado pela autora

Embora tenha ocorrido variações nos valores de pH, as alterações ocorridas foram menores que 1,00, em todas as formulações. Além disso, os valores ainda se encontram dentro da faixa aceitável de pH para produtos cosméticos (ISAAC, 2004). Foi possível observar, também, que a temperatura, em si, não foi a maior influenciadora na alteração dos valores de pH e, sim, o tempo pois, nas três emulsões desenvolvidas, os valores de pH sofreram mais alterações entre os dias analisados do que entre as temperaturas.

5.9.4 Determinação da viscosidade

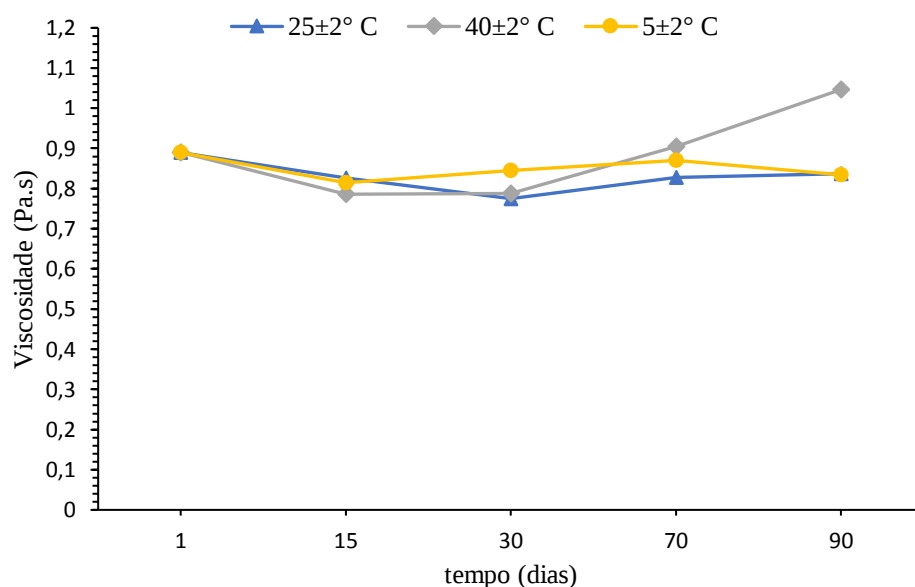
A viscosidade aparente mínima foi determinada para cada amostra, em triplicata. As Figuras 36 a 38 mostram o comportamento da viscosidade das amostras ao longo dos dias de estudo. A viscosidade aparente é denominada mínima, pois é determinada no ponto de maior cisalhamento deste ensaio, 100 s^{-1} (CHIARI, 2011).

Figura 37. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) da emulsão base submetida a condições de estresse durante o período de avaliação da estabilidade



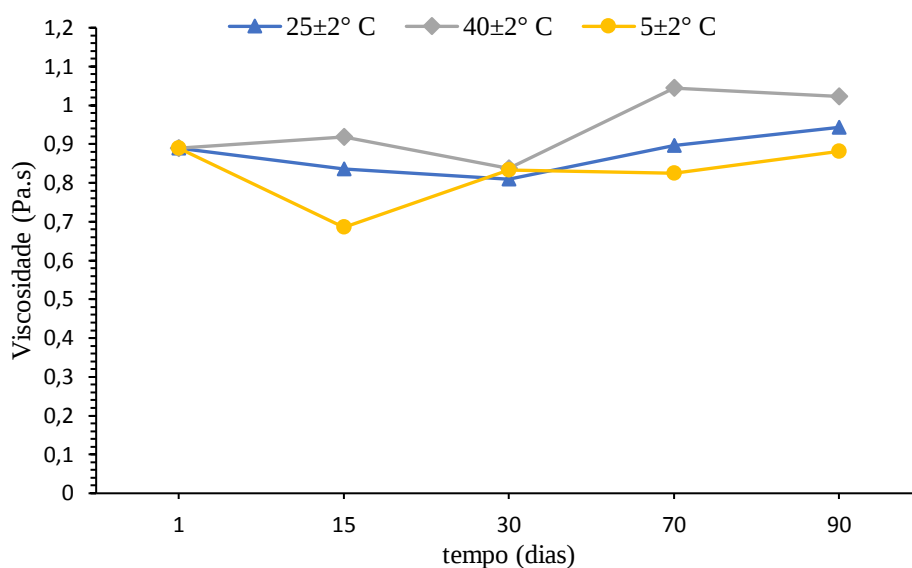
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 38. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5% submetida a condições de estresse durante o período de avaliação da estabilidade



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 39. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico submetida a condições de estresse durante o período de avaliação da estabilidade



Fonte: Elaborado pela autora

Não foi observada nenhuma alteração acentuada na viscosidade das emulsões analisadas nas diferentes condições térmicas. No caso da emulsão com filtros orgânicos de efeito químico foi possível observar que houve uma queda no valor de viscosidade no 15º dia, para a amostra submetida à temperatura de $5\pm 2^\circ\text{C}$, mas, a partir do 30º dia, os valores se mantiveram muito próximos do valor inicial, ou seja, o 1º dia de análise. Com isso, é possível inferir que, em relação à viscosidade, as emulsões avaliadas também se mantiveram estáveis.

5.9.5 Determinação do fator de proteção solar (FPS) e avaliação do efeito fotoestabilizador

Os valores de FPS obtidos para as formulações desenvolvidas e avaliadas ao longo do teste de estabilidade estão descritos na Tabela 6. As formulas das emulsões avaliadas nesse teste de estabilidade estão descritas na Tabela 1.

Tabela 7. Valores de FPS das emulsões desenvolvidas

Emulsão 1*					
1		15	30	70	90
25±2° C		0,883±0,01	1,016±0,01	0,97±0,02	1,00±0,00
40±2° C	0,90±0,01	0,91±0,01	1,026±0,01	1,02±0,01	0,98±0,01
5±2° C		0,92±0,01	1,00±0,02	1,02±0,00	1,05±0,01
Emulsão 2*					
1		15	30	70	90
25±2° C		40,75±0,38	41,59±1,07	39,81±0,92	34,56±1,09
40±2° C	36,66±1,09	38,86±0,60	42,39±0,32	41,01±0,99	34,43±1,04
5±2° C		39,85±0,95	42,69±0,84	43,37±0,63	39,36±0,69
Emulsão 5*					
1		15	30	70	90
25±2° C		43,02±0,65	42,42±0,48	46,12±0,73	47,45±0,39
40±2° C	40,29±0,71	43,57±0,52	43,7±0,67	46,96±0,60	43,80±0,61
5±2° C		42,04±0,87	43,13±0,74	44,23±0,77	43,14±0,87

* Emulsão 1: Emulsão base; Emulsão 2: Emulsão com filtros orgânicos de efeito químico; Emulsão 5: Emulsão com filtros orgânicos de efeito químico e com extrato de *B. intermedia* A. Juss 0,5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

É possível observar que, embora tenha sido pequena, houve, sim, uma variação nos valores de FPS, principalmente entre o 1° e 15° dia nas formulações 2 e 5. Os resultados mostram que, embora os valores de FPS tenham aumentado nas formulações desenvolvidas, a formulação 5 apresentou valor de FPS mais elevado em relação à formulação 2, nas três condições de temperatura avaliadas e em todos os dias analisados.

Nota-se, também, que os valores de FPS encontrados no 70° e 90° dia, para a formulação 5, foram mais elevados, nas três condições ensaiadas, em relação aos dias avaliados anteriormente; ou seja, extrato de *B. intermedia* A. Juss apresentou um efeito fotoestável na emulsão. Isso mostra que seu uso em formulações cosméticas é promissor pois, ao adicioná-lo à emulsão, promoverá estabilidade do efeito fotoprotetor, podendo, até mesmo, promover um pequeno aumento no valor do FPS.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os extratos etanólicos 70° GL obtidos com as folhas de *B. pachyphylla* A. Juss e *B. intermedia* A. Juss apresentaram potencial fotoprotetor contra os raios UVA, UVB e UVC, com folhas colhidas em todas as estações do ano, mas, principalmente, com os extratos obtidos com as folhas colhidas na estação verão. Estes extratos também apresentaram atividade antioxidante, em baixas concentrações, além da significativa presença de compostos fenólicos totais, mostrando, assim, seu poder multifuncional; ou seja, os extratos obtidos com as folhas de *Byrsonima* podem ser usados tanto em cosméticos fotoprotetores, como em cosméticos antienvelhecimento.

Os extratos obtidos com as folhas de *Byrsonima* não exibiram toxicidade significativa nas concentrações testadas, com as células HepG2. E, quando adicionados em uma emulsão fotoprotetora, os extratos apresentaram um pequeno aumento no FPS da emulsão, mesmo estando em uma concentração baixa. Também foi avaliada a estabilidade das emulsões fotoprotetoras, as quais se mantiveram estáveis ao longo do tempo de análise. Além disso, foi possível observar que o extrato de *B. intermedia* A. Juss apresentou um efeito fotoestável na emulsão, indicando o uso promissor dos extratos de *Byrsonima* em emulsões fotoprotetoras, uma vez que os valores de FPS encontrados não diminuíram ao longo do tempo; ou seja, não perderam sua capacidade fotoprotetora.

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de uma emulsão fotoprotetora com base em uma espécie vegetal de grande disponibilidade no território brasileiro, utilizando, como material vegetal, as folhas, que são renováveis e não têm tanta visibilidade quando os frutos, os quais são utilizados para produzir alimentos. Assim, foi possível obter uma emulsão fotoprotetora contendo ativo vegetal sem apresentar um elevado valor agregado.

REFERÊNCIAS

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim CEPPA Curitiba**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ALMEIDA, M. G. J. **Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum***. Departamento de Fármacos e Medicamentos Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Araraquara-SP, 2013.

ALMEIDA, M. G. J. D. et al. Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 1, p. 90-95, 2013.

ANDALLU, B.; SHANKARAN, M.; ULLAGADDI, R.; IYER, S. *In vitro* free radical scavenging and in vivo antioxidante potential of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Journal of Herbal Medicine**, v. 4, p. 10-17, 2014.

ANDRADE, B.S. et al. Fitoquímica, potencial antioxidante e antifúngico de *Byrsonima crassifolia* no controle fitopatogênico do solo. **Brazilian Journal of Biology** São Carlos, v. 78, n. 1, p. 140-146, fevereiro de 2018. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842018000100140&lng=en&nrm=iso>. acessado em 21 mar. 2019. Epub 10 de julho de 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.166532>.

ANGELO, P.M.; JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. São Paulo, 2017. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2017/>>. Acesso em: 21 de março de 2019.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, p.732-42, 2011.

BARBOSA, K.; BARRA FERREIRA et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição [online]**. v.23, n.4, p.629-643, 2010

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.

BERTOLDI, J. G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, 2012.

BRAGA, E. U. **Estudo Fitoquímico de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 30, DE 1 DE JUNHO DE 2012.** Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3134554/RDC_30_2012_.pdf/c600a91b-f20f-40f9-9c0c-28724725bb21> Acesso em: 23 de março de 2019

BROWN, S.; DIFFEY, BL. The effect of applied thickness on sunscreen protection: In vivo and in vitro studies. **Photochemistry Photobiology**, v.44, p.509-13, 1986.

BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, p. 445-448, 2002.

CARDIM, R. Dia da árvore – homenagem aos muricis-do-campo paulistanos. **Arvores de São Paulo**, 2011. Disponível em:

<https://arvoresdesaopaulo.wordpress.com/2011/09/19/dia-da-arvore-homenagem-aos-muricis-do-campo-paulistanos/>

CARDOSO, C. R. P.; **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae).** 129F. Dissertação (mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2006.

CARDOSO, C. R. P; BAUAB, T. M.; VARANDA, E. A. Controle de qualidade e avaliação da atividade farmacológica do extrato de *Byrsonima intermedia* e da amentoflavona. **SaBios: Revista Saúde e Biologia.**, v.10, n.3, p.35-42, 2015.

CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Rev. Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 4, n. 3, Pub 4, 2011.

CAXÊTA, E. V. **Avaliação do potencial fotoprotetor do extrato hidroalcoólico de *Lafoensia pacari* A. St-Hill (Lytraceae) e obtenção de uma formulação fitocosmética.** 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014

CHIARI, B. G.; SEVERI, J. A.; DE PAULI-CREDENDIO, P. A.; SYLOS, C. M.; VILEGAS, W.; CORREA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **JPPS: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, Suppl. 5, p. 331-336, 2012.

CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, Avaliação da Eficácia e Segurança de Fitocosmético Contendo Extrato de *Psidium guajava* L.** 151f. Dissertação (Mestrado

em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2011.

CHIARI, B. G. et al. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. **Industrial Crops and Products**, Elsevier. v. 52, p. 389-393, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.011>.

CHIARI, B. G. et al. Cosmetics? Quality Control. Latest Research into Quality Control 2. 1ed. Shangai: Shangai Representative Office, v. 2, p. 337-364, 2012.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CINCOTTO, M. G. J. A. **Extrato de folhas de *Morus nigra* L.: prospecção de novo ativo e sua aplicação em produto cosmetodermatológico**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2016.

COSTA, G.C. **Caracterização do potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb.** 2010. 26f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

DEMARCO, F. F. et al. Avaliação da citotoxicidade de dois sistemas adesivos. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 375–382, 1998.

DONATINI, R. S. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo/SP, v. 19, n. 1A, p. 89 - 94, 2009.

DURASAMY, A.; NARAYANASWAMY, N.; SEBASTIAN, A.; BALAKRISHNAN, K.P. Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v.1, n.1, p. 13-16, 2011.

FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.73-76, 2006.

FARMACOPÉIA Brasileira. 6.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 20019.

FERNÁNDEZ, M. et al. Determinação de compostos fenólicos totais em frutas amazônicas. Brasília, DF: EMBRAPA, 2016. Separata. Disponível em: http://www.abq.org.br/cbq/trabalhos_aceitos_detalhes,9870.html.

FIGUEIREDO, S. A. **Desenvolvimento e validação de ensaios in vitro usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregados como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; Protetores Solares. **Química Nova**, Araraquara/SP. v. 30, n. 11, p.153-8, 2007.

FLOR, J. Produtos com Proteção Solar: escolha Correta de Ingredientes. **Cosmetics Toiletries (Ed. Port.)**, v. 29, p. 46-51, 2017.

FONSECA, M. J. V. et al. Desenvolvimento de formulações tópicas antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 64-68, 2008.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

GÁLVAREZ, M. V. Antioxidants in Photoprotection: Do They Really Work?. **Actas Dermo-Sifilográficas**. Málaga/Espanha. 101 (3): 197 – 200, 2010.

GARCIA, R. D. **Modelagem molecular (TD-DFT) aplicada à simulação de espectros UV para cinamatos com perfil de filtros solares**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GODINHO, M. M. et al. Perfil dos filtros solares utilizados nos fotoprotetores no Brasil. **Surgical & Cosmetic Dermatology**. v. 9, n. 3, p. 243-246, 2017.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de ciências farmacêuticas - Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, São Paulo, 2008

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**. v.355, p. 1179 -1180, 2000.

HUANG, H. P. et al. Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9286-9293, 2008.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico químicos de estabilidade de cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

JIMÉNEZ, J. Proteção solar: Passado, Presente e Futuro. **Cosmetics & Toiletries**. Bogotá, Colômbia. v. 28, pp. 40-50, 2016.

JUNG, C. H. et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. **LWT - Food Science and Technology, London**, v. 36, n. 3, p. 266-274, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KHURY E; BORGES E. Protetores Solares. **Cosmetics e Toiletries**, v. 48, n.4, p. 4-18, 2011.

LENARDÃO, E. J. et al. “green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LEONE, B. A. **Determinação do mecanismo de interação entre filtros solares químicos e óleo de café verde**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp. Araraquara/SP, 2018.

LIMA, F. J. C. **Secagem da polpa de murici (*Byrsonima crassifolia*) e efeitos sobre compostos bioativos**. 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, 2017.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003.

MALHEIROS, G. C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007

MAMEDE, M.C.H.; SEBASTIANI, R.; ALMEIDA, R.F.; FRANCENER, A.; AMORIM, A.M.A. *Malpighiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB155>>.

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

MANSUR, M. C. P. P. R. **Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MAPRIC. Banco de Dados. Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. São Paulo. Disponível em: < <http://www.mapric.com.br/produtos.php?lang=br>

MARQUELE, F.D.; OLIVEIRA, A.R.M.; BONATO, P.S.; LARA, M.G.; FONSECA, M.J.V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.461–468, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil [online]. Acessado em 21 mar. 2019. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/conteudo_view.asp?ID=2>

MEDINA, C. O.; LOUCHARD, B. O.; GONÇALVES, T. Análise espectrofotométrica da atividade fotoprotetora in vitro de extratos das folhas de *Byrsonima sericea*, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**. Fortaleza/CE. v. 36, n. 3, p.391-98, 2015.

MELO, M. S.; OLIVEIRA, D. E.; FRANCESCHINELLI, E. V. Density and fertility of *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. (Malpighiaceae) in small fragments of the Brazilian Cerrado. **Acta Botanica Brasilica**. V. 28, n.2, p.259-265, 2014.

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

MIGOTO, J. N. **Produção de creme hidratante a partir de óleo essencial extraído do amendoim *Arachis hypogaea* L.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, EO, Filtros Solares e Fotoproteção. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 6, p. 67, 2010.

MOREIRA, L. Q. **Avaliação química e biológica da espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss.** 120F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MUNHOZ, V. M. et al. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.2, p.225-232, 2012.

NAGMOTI, D. M.; KHATRI, D. K.; JUVEKAR, P. R.; JUVEKAR, A. R. Antioxidant activity and free radical-scavenging potential of *Pithecellobium dulce* Benth. Seed extracts. **Free radicals and antioxidants**, v.2, n.2, p. 47-57, 2012.

NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica. **Revista Virtual de Química**. Rio de Janeiro/RJ. v. 6, n. 2, p. 190-223, 2014.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, junho, 2009.

NIKOLIC, K. M. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 774, n. 1-3, p. 95-105, 2006.

OLIVEIRA J. R. S. **Caracterização de extratos de cajá-manga (*Spondias dulcis* Parkinson) potencialmente ativos e seguros para obtenção de fitocosmético antioxidante.** 212F. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2011.

ORLANDA, J.F.F.; VALE, V.V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.4, supl. I, p.730-736, 2015.

PEREIRA, V. V. **estudo fitoquímico de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (Malpighiaceae) e de atividade biológica de espécies do gênero *Byrsonima*.** 127F. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais. Diamantina, Minas Gerais, 2011.

PERES, M. T. L. P. et al. Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 836-846, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.185-191, 2008.

PIMENTEL, F. O. **Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica.** 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas-SP. Campinas, São Paulo, 2006.

POLONINI, H. C.; BRANDAO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter. **RSC Advances**. v. 4, p. 62566–62575, 2014

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

PINTO, G.F.d.S.; Kolb, R.M. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of Neotropical savana. **Botany**, vol. 94, p. 81–89, 2016.

PIZZOFERRATO, A. et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clinical Materials**, v. 15, n. 3, p. 173–190, 1994.

QUIMIDROL Comércio Indústria Importação Ltda. Acetato de etila. **HC FMRP-USP**. FISPG n. 082, n. 1, Ribeirão Preto, Nov./2007.

Disponível em: <http://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/fispq/Acetato%20de%20Etila.pdf>.

RODRIGUES, L. A. N. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos de casca, folha e fruto do muricizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 12, n. 5, p. 55-60, 2018.

ROLIM, Thaísa Leite et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 524 - 527, 2013.

ROMÃO, G. B. **Estudo *in vitro* da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.

ROSA, M.P. La domanda di olio d'oliva. **Olivae**, v. 63, p.24, 1996.

RUFINO, M.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^{•+}. **Comunicado Técnico on line (EMBRAPA)** n.128, 2007.

SALDANHA, A. A.; SORARES, A. C. Compostos químicos e aspectos botânicos, etnobotânicos e farmacológicos da *Byrsonima verbascifolia* Rich ex. A. Juss. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas/SP. v. 17, n. 4, p. 1000-1006, 2015.

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, n. 8, p. 1483 - 1492, 2009.

SCHALKA, S. **Influência de quantidade aplicada de protetores solares no Fator de Proteção Solar (FPS): Avaliação de dois protetores solares com os mesmos ingredientes em diferentes concentrações.** 176f. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n.3, p. 507-15, 2011.

SHOUQIN, Z.; JUN, X.; CHANGZHENG, W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from própolis. **Journal of Chemical Technological & Biotechnology**, v.80, p.50-54, 2005.

SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açaí (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Química Nova**, v.36, n.3, p. 400-406, 2013.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMPLICIO, F. G.; PEREIRA, M. M. Aspectos Químicos e Farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**. Manaus/AM. v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

SOFIDIYA, M. O; FAMILONI, O. Antioxidant activities of different solvent extracts of leaves and root of *Flabellaria paniculata* Cav. (Malpighiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 31, p. 4682 - 4690, 2012.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 351 - 355, 2007.

SOUSA, M. S. B. Mecanismo de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth). Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.4, p.697-712, 2005.

SPERA, K. D. **Avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e antiglicação dos extratos de folhas e frutos de espécies da família Annonaceae**. 55f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Assis, São Paulo, 2014

SOUZA, F. P.; CAMPOS, G. R.; PACKER, J. F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola **Revista Virtual de Química**. São Paulo/SP. v. 34, n. 1, p. 69 - 77, 2013.

SOUZA, P. A.; et al. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolates compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 922-928, 2010

STAKEK, J; GUPTA, S. Proteção Solar mais Segura- Parte 1. **Cosmetic Toiletries (Ed. Port.)**, v. 30, p. 36-44, 2018.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**. v. 2, p. 1231-1246, 2010.

VELASCO, M.V.R. et al. 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, n.1, p.23-7, 2008.

VELASCO, M.V.R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

WIDEL, Maria et al. Induction of bystander effects by UVA, UVB and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. **Free Radical Biology And Medicine**, Gliwice, Poland, v. 1, n. 68, p.278-287, 2013

ZHANG, Y. et al. Evodiamine induces tumor cell death through diferente pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p.83-89, 2004.

ANEXO – Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos



Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

Data da emissão:
Edição substituta de04.04.2006
24.08.2005**1. Identificação do produto e da empresa***Identificação da substância/preparação*

No. de catálogo: 106009
 Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Uso da substância/preparação

Reagente para análise
 Solvente
 Produção química

Empresa/identificação da empresa

Empresa: Merck S/A * Brasil * Rua Torre Eiffel, 100 - Parque Rincão - Gleba A Cotia - CEP: 06705-481 - São Paulo - SP * tel/fax: +5511 4616-5431 / +5511 4614-0109
 No. Telefone de Emergência: Cotia/SP * tel.: ++5511 46165431 * fax: ++5511 46140109
 Rio de Janeiro * tel.: ++552124442211 * fax: ++552124442001

2. Composição e informações sobre os ingredientes

No.-CAS:	67-56-1	No.-Index-CE:	603-001-00-X
M:	32.04 g/mol	No-CE:	200-659-6
Fórmula Hill:	CH ₄ O		
Fórmula química:	CH ₃ OH		

3. Identificação dos perigos

Facilmente inflamável. Tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão. Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

4. Primeiros socorros

Socorrista: cuidar da própria segurança!
 Após inalação: Exposição ao ar fresco.
 Em caso de paragem respiratória: proceder imediatamente à ventilação mecânica, eventualmente máscara de oxigénio. Chamar imediatamente um médico.
 Após contacto com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada.
 Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água, mantendo a pálpebra aberta. Consultar um oftalmologista.
 Depois de engolir: Fazer beber muita água. Provocar o vômito. Fazer beber etanol (por ex., 1 copo com uma bebida alcoólica a 40 %). Consultar um médico (Mensagem: presença de metanol).

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

No. de catálogo: 106009
 Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

5. Medidas de combate a incêndios:

Meios adequados de extinção:
 CO₂, espuma, pó.

Riscos especiais:

Combustível. Vapores mais pesados do que o ar.

A formação de misturas explosivas com o ar é possível já a temperaturas normais. Há que ter precaução com a ignição de retrocesso.

Em caso de incêndio formam-se gases inflamáveis e vapores perigosos.

Equipamento especial de protecção para o combate ao incêndio:

Não ficar na zona de perigo sem aparelhos respiratórios autónomos apropriados para respiração independente do ambiente. De forma a evitar o contacto com a pele, mantenha uma distância de segurança e utilize vestuário protector adequado.

Outras informações:

Arrefecer o recipiente com água de pulverização a uma distância segura. Evitar a infiltração da água de extinção nas águas superficiais ou nas águas subterrâneas.

6. Medidas de controle para derramamento ou vazamento

Medidas de protecção para as pessoas:

Não inalar os vapores/aerossóis. Evitar o contacto com a substância. Garantir a ventilação com ar fresco em recintos fechados.

Medidas de protecção do meio ambiente:

Não permita que entre no sistema de esgotos; perigo de explosão

Procedimentos de limpeza / absorção:

Absorver com absorvente de líquidos, p.ex., Chemisorb®. Proceder à eliminação de resíduos. Limpar a área afectada.

7. Manuseio e armazenamento

Manuseio

Indicações sobre protecção contra incêndios ou explosões:

Mantê-lo afastado de fontes de ignição. Tomar medidas contra cargas electrostáticas.

Indicações para o manuseamento seguro:

Trabalhar com chaminé. Não inalar a substância. Evitar a formação de vapores/aerossóis.

Armazenagem:

Conservar hermeticamente fechado, em local bem ventilado e afastado de fontes de ignição e de calor. A +15°C a +25°C.

Acesso permitido só aos técnicos competentes.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

No. de catálogo: 106009
 Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

8. Controlo de exposição e proteção individual

Parâmetros específicos de controlo

EC	
Nome	metanol
Valor	200 ml/m^3 260 mg/m^3
Resorção da pele	Perigo de absorção pela pele

Equipamento de proteção individual:

As características dos meios de proteção para o corpo devem ser seleccionadas em função da concentração e da quantidade das substâncias tóxicas de acordo com as condições específicas do local de trabalho. A resistência dos meios de proteção aos agentes químicos deve ser esclarecida junto dos fornecedores.

Proteção respiratória: necessário em caso de formação de vapores/aerossóis. Filtro AX (EN 371).

Proteção dos olhos: necessário

Proteção das mãos:

Em contacto total:	
Material da luva:	butilo
Espessura da camada:	0.7 mm
Tempo de ruptura:	> 480 Min.
Em contacto com líquido derramado:	
Material da luva:	viton
Espessura da camada:	0.70 mm
Tempo de ruptura:	> 120 Min.

As luvas de proteção a usar têm que obedecer às especificações da directiva EC 89/686/EEC e do padrão resultante EN374, por exemplo KCL 898 Butoject® (contacto total), 890 Vitoject® (contacto com salpicos). As ruturas acima descritas foram determinadas pelo KCL em testes de laboratório seg. a EN374 com amostras dos tipos de luvas recomendados.

Esta recomendação aplica-se apenas ao produto descrito na ficha de dados de segurança por nós fornecida bem como para a aplicação especificada. Quando houver dissolução ou mistura com outras substâncias e sob as devidas condições houver desvios aos descritos na EN374 por favor contactar o fornecedor de luvas com marcação CE (ex: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Internet: www.kcl.de).

Outro equipamento de proteção: Roupa protectora contra chamas.
Roupa protectora anti-estática.

Higiene industrial:

Mudar imediatamente a roupa contaminada. Profilaxia cutânea. Depois de terminar o trabalho, lavar as mãos e a cara. Nunca comer ou beber no local de trabalho. Trabalhar com chaminé. Não inalar a substância.

9. Propriedades físico-químicas

Forma:	líquido
Côr:	incolor
Odor:	característico
Valor de pH	não disponível
Viscosidade dinâmica (20 °C)	0.597 mPa*s

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

No. de catálogo: 106009
Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Ponto de fusão		-98	°C	
Ponto de ebulição	(1013 hPa)	64.5	°C	
Temperatura de ignição		455	°C	(DEN 51794)
Ponto de inflamação		11	°C	c.e.
Límites de explosão	inferior	5.5	Vol%	
	superior	36.5	Vol%	
Pressão de vapor	(20 °C)	128	hPa	
Densidade relativa de vapor		1.11		
Densidade	(20 °C)	0.79	g/cm ³	
Solubilidade em água	(20 °C)	solúvel		
log Pow		-0.77		(experimental) (Literatura)

10. Estabilidade e reactividade

Condições a serem evitadas

Aquecimento.

Substâncias a serem evitadas

Perigo de explosão em presença de: oxidante (entre outros ácido perclórico, percloratos, sais de oxo-ácidos halogénicos, CrO₃, óxidos de halogénios, ácido nítrico, óxido nítrico, óxidos não metálicos, ácido cromossulfúrico, cloratos), hidretos, dietilo de zinco, halogénios, magnésio em forma de pó, peróxido de hidrogénio.

Reacção exotérmica com: halogenetos ácidos, anidridos de ácidos, ácidos, redutor.

Desenvolvimento de gases e vapores perigosos com: metais alcalino-terrosos e metais alcalinos (Em caso de libertação de: hidrogénio).

Produtos de decomposição perigosa
não existem indicações

Outras informações

higroscópico;
materiais inapropriados: diversos materiais plásticos, magnésio e ligas de zinco.
Susceptível de formar misturas explosivas com o ar no estado de vapor/gás.

11. Informação toxicológica

Toxicidade aguda

LC₅₀ (inalação, rato): 64000 ppm(V) /4 h (TCLID).

LD₅₀ (oral, rato): 5628 mg/kg (TCLID).

LDLo (oral, humano): 143 mg/kg (RTECS).

A literatura disponível para nós não se ajusta à rotulagem prescrita pela CE. A CE tem dossiers que não foram publicados.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

No. de catálogo: 106009
 Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Toxicidade subaguda a crônica

Sensibilização:
 Teste de sensibilização (cobaia): negativo (IUCLID)

Não carcinogénico em experiências com animais. (IUCLID)
 Mutagenicidade (teste em células de mamífero): micronucleos negativo (in vivo) (IUCLID)
 Mutagenicidade bacteriana: Ames test: negativo. (in vitro) (IUCLID)

Outras informações toxicológicas

Após a inalação de vapores: Irritação nas vias respiratórias, sonolência, vertigens, cefaleias.
 Após o contacto com a pele: absorção. Efeito desengordurante com formação de pele áspera e gretada.
 Depois do contacto com os olhos: Ligeira irritação, irritação das mucosas.
 Após ingestão: absorção.
 Após absorção: náuseas, vômitos, cefaleias, vertigens, embriagado, diminuição da visão, cegueira (Lesão irreversível do nervo óptico.). Efeitos sistémicos: acidose, queda da pressão arterial, agitação, espasmos, narcose, coma. Os sintomas podem manifestar-se após ter decorrido o período de latência.
 Danos em: fígado, rins, coração.

Informação adicional

O produto deve ser manipulado com as precauções habituais dos produtos químicos.

12. Informação ecológica

Degradação abiótica:
 Degradação lenta. (ar)

Degradação biológica:
 BOD 76 % de TOD /5 d (teste em frasco fechado) (IUCLID).
 Facilmente biodegradável (diminuição: DOC = carbono orgânico dissolvido >70 %, DBO >60 %, DBO₅ respeito DQO >50 %).

Comportamento no meio ambiente:
 Distribuição: log Pow: -0.77 (experimental) (Literatura).
 Não se prevê qualquer bio-acumulação (log Pow <1).

Efeitos ecotóxicos:
 Efeitos biológicos:
 Quando usado adequadamente, não são esperadas alterações nas estações de tratamento de águas residuais.
 Toxicidade nos peixes: *L.macrochirus* LC₅₀: 15400 mg/l /96 h (em água doce) (ECOTOX Database).
 Toxicidade em *Daphnia*: *Daphnia magna* CE₅₀: >10000 mg/l /48 h (IUCLID).
 Concentração limite tóxica:
 Toxicidade em algas: *Sc.quadricauda* IC₅: 8000 mg/l /8 d (IUCLID).
 Toxicidade em bactérias: *Ps.pudita* CE₅: 6600 mg/l /16 h (Literatura).
 Protozoários: *E.salicatum* CE₅: >10000 mg/l /72 h (Literatura).

Dados ecológicos adicionais:
 Degradabilidade:
 BOD₅: 0.60-1.12 g/g (IUCLID).
 COD: 1.42 g/g (IUCLID).
 TOD: 1.5 g/g (Literatura).

Não permita a entrada em águas, águas residuais ou solos!

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

No. de catálogo: 106009
 Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

13. Considerações sobre tratamento e disposição

Métodos de tratamento e disposição:

No tratamento e disposição do produto, de seus restos e de embalagens usadas, deve-se atentar para a legislação nos âmbitos municipal, estadual e federal.

14. Informações sobre transporte

Transporte terrestre: ADR, RID
 UN 1230 METHANOL, 3 (6.1), II
 Transporte fluvial: ADN, ADNR não testado
 Transporte por via marítima: IMDG-Code
 UN 1230 METHANOL, 3 (6.1), II
 Ems: F-E S-D
 Transporte por via aérea: CAO, PAX
 UN 1230 METHANOL, 3 (6.1), II

As informações relativas ao transporte mencionam-se de acordo com a regulamentação internacional e no formato aplicável na Alemanha. Não estão consideradas possíveis diferenças a nível nacional.

15. Regulamentações

Etiquetas de acordo com as Directivas da CE

Símbolo:	F	Facilmente inflamável
	T	Tóxico
Frases R:	11-23/24/25-39/23/24/25	Facilmente inflamável. Tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão. Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.
Frases S:	7-16-36/37-45	Mantém o recipiente bem fechado. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Usar vestuário de protecção e luvas adequadas. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).
No.-CE:	200-659-6	Rótulo CE
<i>Rótulagem reduzida (1999/45/EC, Art. 10, 4)</i>		
Símbolo:	F	Facilmente inflamável
	T	Tóxico
Frases R:	23/24/25-39/23/24/25	Tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão. Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.
Frases S:	36/37-45	Usar vestuário de protecção e luvas adequadas. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

16. Outras informações

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725:2001

No. de catálogo: 106009
Nome do produto: Metanol p.a. ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Motivo para alteração

Valores de tolerância para a segurança no trabalho.

Capítulo 10: estabilidade e reactividade.

Capítulo 11: informação toxicologia.

Capítulo 12: informação ecológica.

Revisão geral.

O não cumprimento das informações acima, isenta a Merck de responsabilidade pelo uso indevido do produto.

As indicações baseiam-se no nível actual dos nossos conhecimentos e servem para a caracterização do produto no que se refere às medidas de segurança a tomar. Estas indicações não implicam qualquer garantia de propriedades do produto descrito.