



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020023090-5 A2



(22) Data do Depósito: 12/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 24/05/2022

(54) **Título:** MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR E FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA CONTENDO EXTRATO DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. - PEQUI

(51) **Int. Cl.:** A61K 8/9789; A61Q 17/04.

(52) **CPC:** A61K 8/9789; A61Q 17/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** LUCINÉIA DOS SANTOS; GIOVANA SANT'ANA PEGORIN; AMANDA DE ANDRADE MACHADO; ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS; CRISTIANO SOLEO DE FUNARI; JOÃO TADEU RIBEIRO PAES.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR E FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA CONTENDO EXTRATO DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. - PEQUI. Mais precisamente trata-se de um método de obtenção de fitocosmético em creme gel e formulação de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetora com extrato de Caryocar brasiliense Camb. - Pequi - obtido do resíduo da polpa, torta, resultante da extração do óleo da polpa; preparo do extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi; preparo da formulação cosmética base; desenvolvimento da formulação cosmética contendo este extrato; caracterização fitoquímica do fitocosmético por dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas; avaliação farmacológica in vitro do fitocosmético através da determinação das atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora; análise toxicológica do extrato e do fitocosmético; g) controle de qualidade do fitocosmético.



“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR E FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA CONTENDO EXTRATO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. - PEQUI”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata-se de um método de obtenção de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetor e formulação de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetora contendo extrato de *Caryocar Brasiliense* Camb. - Pequi - a partir do resíduo da polpa, torta, obtido no processo de extração a frio de seu óleo, viabilizando o desenvolvimento de uma formulação cosmética com propriedades antioxidante, antienvelhecimento e fotoprotetora, usada no combate aos radicais livres, no envelhecimento precoce da pele e na proteção contra raios solares UVA/UVB, bem como, o uso do extrato do resíduo de *Caryocar Brasiliense* Camb. - Pequi - como ingrediente principal pode agregar valor comercial ao fruto, aumentando a sua visibilidade e contribuindo para a manutenção do mesmo na natureza, juntamente com todo o seu Bioma.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Em especial, os fotoprotetores atuais são compostos preferencialmente por ativos sintéticos. Assim, há uma necessidade de introduzir no mercado cosméticos, os quais contenham em sua formulação ativos vegetais que apresentam efetivas atividades terapêuticas e que não promovam efeitos irritantes a pele, como os promovidos pelos ativos sintéticos.

[003] O pequi é fruto do pequizeiro nativo em cerradão distrófico e mesotrófico, cerrado denso, cerrado sentido restrito e cerrado ralo. Ocorre em regiões de boa luminosidade e de menor fertilidade natural do solo, clima subtropical ou tipicamente tropical, com estação seca bem definida.

[004] Atualmente, a preservação do pequizeiro está ameaçada. Isto porque a sua exploração está à deriva, em geral, de pessoas leigas que muitas vezes utilizam essa planta de maneira predatória.

[005] Da mesma forma, com o avanço das atividades agropecuárias e expansão das

idades no Centro-Oeste brasileiro, tem havido uma intensa redução da população de pequizeiros. A espécie predomina nos solos mais planos do Bioma Cerrado, que são os mais adequados para a mecanização agrícola e para as atividades econômicas, como a implantação de pastagens, lavouras de grãos e reflorestamento. Portanto, as populações de pequizeiros estão ficando restritas as poucas áreas de reservas ambientais ou de preservação permanente. Essas áreas são restritas em extensão e nem sempre preservadas. Como os frutos dos pequizeiros são coletados intensamente para consumo das populações regionais ou para venda nos centros urbanos da região Centro-Oeste, a quantidade de sementes remanescentes que germinariam para repovoamento dos pequizais nativos se apresenta muito reduzida.

[006] A necessidade de agregar valor aos resíduos do fruto do pequizeiro por meio do comércio de produtos desenvolvidos a partir dos mesmos impede a extinção do pequizeiro e promove uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região do Cerrado e que dependem desse fruto para a sua subsistência.

[007] Dessarte, após a realização de pesquisa em bases de dados científicos e patentearias, foram constatados vários artigos e patentes, provenientes de empresas e de universidades, que também apresentam formulações enriquecidas com outros extratos vegetais com reconhecidas propriedades farmacológicas e terapêuticas. Em adição, alguns trabalhos apresentam importantes propriedades dos extratos e do óleo obtidos a partir do fruto do pequizeiro.

[008] No artigo científico 'Composição Química e Compostos Bioativos Presentes na Polpa e na Amêndoa do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) - Lima A. et al., 2007.' é revelado que o pequi, *Caryocar brasiliense* Camb., foi caracterizado pela composição centesimal e pela presença de compostos bioativos na polpa e na amêndoa. Os dados do perfil lipídico mostram alto teor de lipídeos tanto na polpa quanto na amêndoa, destacando-se nos mesmos a presença dos ácidos graxos insaturados, predominando o ácido oleico como principal componente entre os ácidos graxos. Foi observada também a relação entre os elevados teores de ácidos graxos insaturados com os compostos fenólicos e carotenoides presentes, tendo a polpa quantidades mais expressivas dessas substâncias quando comparada à amêndoa, além de conter uma quantidade superior

de fibra alimentar. Os resultados obtidos abrem a perspectiva de se utilizar o pequi como fruto que apresenta na sua composição, compostos importantes para a formulação de uma dieta saudável.

[009] Outro artigo denominado como 'Fracionamento e avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) - Rocha L.B., 2011', prevê que extratos hidroetanólicos da casca do fruto do pequi foram fracionados a fim de identificar e quantificar o principal antioxidante presente. Frações do extrato foram submetidas à partição líquido-líquido e fracionamento em coluna de sílica gel. As atividades antioxidantes das frações foram monitoradas usando ensaio de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila e a pureza das frações foi avaliada em cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A substância com propriedade antioxidante foi identificada através da análise em sistema de cromatografia líquida associada à espectrometria de massas e foi quantificada em CLAE. Após o fracionamento, identificou-se uma fração com alta atividade antioxidante e pureza, contendo ácido gálico como composto principal. Ácido gálico foi encontrado em concentrações de $26,54 \pm 1,13$ mg/g de massa seca. Devido às quantificações terem sido realizadas no extrato hidroetanólico bruto, acredita-se que o ácido gálico esteja presente na forma livre. Assim, a casca do fruto pequi pode servir como interessante alternativa de matéria prima para a produção desse antioxidante natural. Além disso, esse resultado enfatiza o valor do fruto do pequi e sugere oportunidades para as famílias que utilizam produtos oriundos deste fruto.

[010] Já no documento de nº. PI 0702676-5 de titularidade da Universidade Federal de Minas Gerais (BR/MG) é revelado um método para extração de óleo, produto e usos para extração de óleo da polpa do pequi por meio de prensagem, para uso em unidades de extração de óleos, em escala industrial, que proporciona maior possibilidade de subprodutos. A presente invenção descreve também a obtenção de um óleo de alto teor de pureza, beneficiado com aditivos para enriquecimento e baixo coeficiente de decantação, bem como, estabilidade do produto. Por fim, a presente invenção descreve aplicações deste óleo em formulações cosméticas, antioxidante de metais, uso terapêutico, entre outros.

[011] Contudo, todas as formulações constatadas por meio da pesquisa realizada em bases de dados científicas e patentárias, não utilizam extratos vegetais oriundos de um resíduo vegetal, mais propriamente do resíduo da polpa do pequi. Ou seja, o método e composição aqui propostos, além de apresentarem efetivas atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora, podem contribuir de forma efetiva para o bem estar ambiental, econômico e social.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[012] É objetivo da invenção apresentar um método de obtenção de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetor e formulação de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetora contendo extrato de *Caryocar brasiliense* Camb. - Pequi - que apresenta propriedades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora e que não agrida a pele do usuário, diferenciando da maioria dos cosméticos presentes no mercado.

[013] É objetivo da invenção apresentar um método de obtenção de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetor cujo extrato do resíduo do pequi é obtido durante o processo de extração de seu óleo, agregando valor comercial ao fruto do pequi, aumentando a sua visibilidade e, provavelmente, contribuindo para a manutenção do mesmo na natureza, juntamente com todo o seu Bioma.

[014] Assim, a proposta de inserção do extrato do resíduo do pequi, obtido durante o processo de extração de seu óleo, em um fitocosmético pode resultar na melhoria da qualidade de vida das pessoas que dependem da comercialização do pequi para a sua subsistência.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[015] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de desenhos onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[016] as figuras 1 e 2 consistem em imagens fotográficas da avaliação da irritabilidade ocular da formulação, sendo que a figura 1 mostra uma imagem fotográfica do ovo após a retirada da casca, expondo a membrana cório-alantoide; e

[017] a figura 2 revela uma imagem fotográfica do creme gel aplicado sobre a membrana cório-alantoide exposta à esquerda e a membrana cório-alantoide reagindo após a lavagem do creme gel à direita.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[018] Com referência aos desenhos ilustrados, a presente patente de invenção refere-se à “MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR E FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA CONTENDO EXTRATO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. - PEQUI”, mais precisamente trata-se de método de obtenção de fitocosmético em creme gel e formulação de fitocosmético em creme gel.

[019] Segundo a presente invenção, o método de obtenção de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetor contendo extrato de *Caryocar brasiliense* Camb. - Pequi - obtido do resíduo da polpa, sendo que o referido método compreende as seguintes etapas: a) obtenção da torta resultante do processo de extração do óleo da polpa do pequi; b) preparo do extrato hidroetanólico a partir da torta, resíduo da polpa do pequi; c) preparo da formulação cosmética base; d) desenvolvimento da formulação cosmética contendo este extrato; e) caracterização fitoquímica do extrato e do fitocosmético por dosagem de fenóis e flavonoides e análise por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas; f) avaliação farmacológica *in vitro* do extrato e do fitocosmético através da determinação das atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora; g) análise toxicológica do extrato e do fitocosmético; h) controle de qualidade do fitocosmético.

[020] Ditas etapas que compõe o inovado método compreendem:

a) Obtenção da torta resultante da extração do óleo da polpa.

[021] Nesta etapa os frutos do pequi são lavados, descascados, embalados em sacos plásticos e estocados sob refrigeração -18°C e cortados manualmente, utilizando faca comum, em pequenos pedaços. O processo de extração do óleo é por prensagem da polpa a frio, utilizando uma miniprensa hidráulica, sendo aplicada uma força de 0,5 ton/cm² durante 1 hora. A torta resultante da prensagem da polpa, que seria descartada, é seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 36°C até obtenção

do peso seco.

b) Preparo do extrato hidroetanólico da torta polpa do pequi.

[022] O extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi é preparado na proporção de 1 g da torta da polpa do pequi seca por 10 mL de solução de etanol a 70% em água destilada. Em seguida, é submetido à agitação vigorosa por 30 minutos e depois permanece em maceração estática (repouso) ao abrigo da luz por 3 dias. Após, o extrato resultante é filtrado para a obtenção de uma fração líquida. Esta fração é levada ao rotaevaporador para eliminação do álcool e, posteriormente, colocado na estufa durante a 36°C para secagem e obtenção de um peso constante.

c) Preparo da formulação cosmética base.

[023] - Fase A (Oleosa):

[024] Óleo mineral (agente emoliente) - 2%;

[025] Tween 80 (agente emulsificante) - 2,5%;

[026] Polawax 400 (agente emulsificante) - 10%;

[027] Parabenos (conservante) - 0,5%.

[028] - Fase B (Aquosa):

[029] Carbopol (agente viscoso) - 0,5%;

[030] Glicerina (umectante) - 4%;

[031] Água destilada (veículo) - 80,5% (quantidade para 100 g).

[032] Para o preparo da formulação, as fases A e B são aquecidas até 80°C. Em seguida, a fase 'B' é vertida sobre a 'A' e a mistura emulsionada sob agitação na mesma temperatura por aproximadamente 10 minutos. O extrato é inserido à formulação na concentração de 5%.

d) Preparo de soluções com o creme gel do pequi.

[033] É preparada uma solução com a concentração de 50 mg/mL do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi. A partir desta, são realizadas outras diluições empregadas na dosagem de flavonoides, de fenóis totais e nos testes de atividade antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora.

e) Caracterização fitoquímica do fitocosmético por espectrofotômetro UV-Vis para a dosagem de fenóis e flavonoides e análise do extrato e do fitocosmético por

cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas.

e1) Dosagem de fenóis totais.

[034] O método utilizado é o de *Folin-Ciocalteu* para a determinação dos compostos de fenóis totais, utilizando-se ácido gálico como padrão de comparação (*Singleton et al.*, 1965). A cada 0,5 mL de amostra de creme gel, em diversas concentrações descritas no item (d), são adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 minutos é adicionado 1 mL de solução de Na_2CO_3 saturada a 10% (p/v) e a mistura armazenada por 1 hora. A absorbância é medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. Os testes são realizados em triplicata.

e2) Dosagem de flavonoides.

[035] A dosagem dos flavonoides do creme gel é feita por espectrofotômetro UV-Vis, segundo a metodologia de (*Serdar et al.*, 2015), baseada na complexação de flavonoides com AlCl_3 , deslocando as bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Para isso, 0,5 mL de amostra de creme gel, nas concentrações descritas no item (d), são acrescidas de 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de AlCl_3 10% (p/v) e 0,1 mL de CH_3COONa e os tubos são completados para 5 mL com água destilada. Os tubos são homogeneizados e mantidos por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, a leitura é realizada a 425 nm. Os testes são realizados em triplicata.

e3) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM).

[036] A partir das frações preparadas, um método CLAE-DAD/UV é desenvolvido através de várias análises empiricamente. Solventes para as fases móveis são selecionados em guias para a seleção de solventes verdes (*Prat et al.*, 2016).

[037] É utilizada a abordagem recomendada para o desenvolvimento do método de fase reversa descrita por Snyder, Kirkland e Dolan (2010), seguindo as seguintes modificações: 1) ajustar na % de solvente orgânico; 2) ajustar a seletividade (mudar o solvente orgânico, alterar o tipo de coluna e/ou variar a temperatura); e 3) otimizar as condições da coluna (comprimento, tamanho de partícula e fluxo).

f) Avaliação farmacológica *in vitro* do fitocosmético através da determinação das atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora.

f1) Sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

[038] O método utilizado consiste no monitoramento do decaimento da absorbância no comprimento de onda observado entre 515 a 530 nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical livre DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazila) (Serdar *et al.*, 2015).

[039] Os experimentos são realizados com a formulação proposta e em triplicata, para fins estatísticos, utilizando 500 µL da solução da formulação com concentrações de 0,5 a 7 mg/mL, em intervalos de 0,5 mg/mL, e 500 µL de solução de DPPH, cuja concentração é definida com a obtenção de uma absorbância entre 0,9 a 1,0. A solução reage com o radical DPPH por 30 minutos em ambiente escuro e é submetida ao espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 517 nm. O controle negativo (CN) é formado por 500 µL da solução da formulação sem extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi, dissolvida em etanol, acrescida do mesmo volume de DPPH. Como controle positivo (CP) é preparada uma solução a partir de 1 g de creme gel, contendo 0,2 mg de quercetina, em 1 mL de etanol. Para análise do controle positivo, 500 µL desta solução são dissolvidos no mesmo volume de DPPH. O branco (B) consiste em 1 mL de metanol.

[040] O cálculo da atividade antioxidante da formulação, ou seja, a capacidade de sequestrar radicais livres DPPH é expressa de duas formas: (1) determinação da concentração eficiente EC₅₀, que representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995). E (2) definição do percentual de inibição de oxidação do radical, de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{CN} - A_B) - (A_A - A_B) / (A_{CN} - A_B)] \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_B é a absorbância do branco após 30 minutos, todos a 517 nm.

f2) Avaliação da lipoperoxidação *in vitro* (LPO) do creme gel do pequi.

[041] Para avaliar a capacidade da formulação em inibir o processo de LPO é realizado um ensaio de acordo com o modelo proposto por Daker *et al.* (2008), com modificações. Como fonte de lipídios foi usada gema de ovo. Assim, 10 g de gema são homogeneizados

em 100 mL tampão fosfato 0.1 M. Em tubos de vidro com tampa de rosca são colocados 0,5 mL da solução, 0,4 mL de água destilada e 0,1 mL da solução da formulação com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi em etanol nas concentrações de 50; 37,5; 25 e 12,5 mg/mL. É adicionado 0,1 mL de solução AAPH (2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido) a 0,12 M e incubado a 37°C por 30 minutos. Por fim, são adicionados 1,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) a 20% (p/v) e 1,5 mL de TBA (Ácido Tiobarbitúrico) a 1% (p/v).

[042] A mistura resultante é incubada a 95°C por 60 minutos, acrescida de 5,0 mL de butanol e centrifugada a 3500 G por 10 minutos, do sobrenadante é retirado 1 mL e medido em espectrofotômetro a 532 nm. É utilizado como controle negativo (CN) o álcool metílico absoluto no volume de 0,1 mL, em substituição ao da formulação com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi. Como controle positivo (CP) é utilizado 0,1 mL de uma solução contendo formulação enriquecida com quercetina, na concentração de 0,1 mg/mL, e dissolvida em álcool metílico. O branco (B) é feito com apenas álcool metílico. A atividade antioxidante foi calculada segundo a equação:

Inibição da peroxidação lipídica (%) = $[(A_{CN} - A_B) - (A_A - A_B) / (A_{CN} - A_B)] \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_B é a absorbância do branco (Li et al., 2013). A concentração do extrato (mg/mL) necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica (EC_{50}) também foi calculada.

f3) Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar do creme gel do pequi.

[043] A análise do Fator de Proteção Solar (FPS) é feita por meio de um teste *in vitro*, utilizando o Labsphere UV-1000. Esta análise é utilizada usualmente como teste prévio ao teste *in vivo* pelos fabricantes de protetor solar. O aparelho Labsphere UV- 1000 calcula o FPS, automaticamente, de acordo com a Equação 1.

$$SPF = \frac{\int_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} d\lambda}{\int_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} d\lambda}$$

[044] O E_{λ} corresponde ao espectro de ação eritematosa, S_{λ} é a irradiância solar espectral, T_{λ} é a transmitância espectral da amostra com a integral calculada entre os limites de comprimento de onda de 290-400 nm.

[045] Desta forma, este equipamento mede a transmissão difusa nas amostras da formulação fitocosmética na região de comprimento de onda ultravioleta entre os limites de comprimento de onda de 290 nm a 400 nm. Uma fonte de luz xenônio, através de uma esfera integradora, emite um feixe de luz difusa intensa e uniforme que ilumina a amostra, minimizando o tempo de integração dos dados. Um conjunto de dois espectrômetros é acoplado à fonte de luz, por meio de um sistema de fibra óptica projetado para sistemas de luz difusa de baixa intensidade. As amostras de creme gel são posicionadas em uma plataforma mecânica que permite que a medição se repita exatamente no mesmo ponto do substrato. Como substrato é utilizada a placa de quartzo com a fita Transpore 3M®, e em cada placa é utilizado 2 mg/cm² de cada amostra e após 20 minutos é realizada a leitura de 9 pontos diferentes da placa.

[046] Como os raios UVA (320-400 nm) penetram profundamente na pele, sendo os principais responsáveis pelo fotoenvelhecimento (Palm; O'Donoghue, 2007), além da determinação do FPS da formulação fitocosmética, é importante determinar a proteção UVA, que é estabelecida por meio da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico (λ_c).

[047] Para avaliação *in vitro* do FPS e da proteção UVA é utilizada a formulação do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi a 5%. Como controle positivo o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi é substituído pelo filtro solar UVB/UVA hidrossolúvel (Merck®), que possui em sua composição o ácido 2- fenilbenzimidazol-5-sulfônico e ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5- sulfônico, incorporado à formulação na concentração de 15%. A fim de constatar uma possível potencialização dos efeitos fotoprotetores do filtro solar sintético na presença do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi, eles são associados em uma mesma formulação.

[048] O aparelho utilizado, analisador de transmitância UV-1000S, da Labsphere, apresenta a mais recente tecnologia em um sistema destinado para uso em análises de FPS *in vitro* e proteção UVA proporcionados por preparações cosméticas. O aparelho atende às exigências da regulação da Colipa *The European Cosmetics Association* e da FDA *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos.

f4) Atividade antienvhecimento do creme gel do pequi por meio da avaliação do

potencial de anti-glicação.

Sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose.

[049] A glicação de proteínas por glicose é avaliada utilizando o BSA/Glicose (Morrone, 2013; Sadowska-Bartosz; Bartosz, 2015). Em 2,5 mL do volume total da reação de glicação são incluídas 0,5 mL das diferentes diluições da solução da formulação com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi em álcool metílico nas concentrações já definidas, de 50, 25 e 12,5 mg/mL. Além disso, 20 mg/mL de BSA, 500 mM de glicose, 0,02% (p/v) de azida de sódio e tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) são adicionados. Após incubação a 37°C durante 3 semanas, a quantidade formada de moléculas heterogêneas '*Advanced Glycation End-products*' - AGEs - fluorescentes é determinada utilizando um espectrômetro de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 330 nm e comprimento de onda de emissão de 410 nm. A porcentagem de inibição de formação de AGEs é calculada utilizando a seguinte equação: $\text{Inibição (\%)} = [1 - (\text{FIA} - \text{FIB}) / (\text{FIC} - \text{FICB})] \times 100$, sendo que FIA - FIB é a diferença entre a intensidade de fluorescência de uma amostra incubada com glicose e outra sem a adição de glicose, e FIC - FICB é a diferença entre a intensidade de fluorescência do controle de água destilada com a glicose e o controle sem glicose.

Sistema BSA/MGO.

[050] Na glicação de proteínas mediada por MGO (Metilglioxal, agente glicante intracelular), diluições da solução da formulação com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi em álcool metílico são incubadas com 20 mg/mL de BSA, 1 mM MGO e 0,02% (p/v) de azida de sódio em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a 37°C durante 1 semana (Harsha et al., 2013). A formação de AGEs fluorescentes total é determinada pela porcentagem de inibição da formação de AGEs para cada diluição do extrato e é calculada conforme descrito acima.

g) Avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi e do creme gel com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi.

g1) Teste da Atividade Hemolítica do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi.

[051] A atividade hemolítica é investigada de acordo com *Onuma et al.* (1999) e em conformidade com a norma da *International Standard Organization* 10993 parte 4 (ISO,

2017), através do contato direto utilizando-se 4 mL de sangue de carneiro comercial com Ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA como anticoagulante (tubo de EDTA VACUETTE® 4 mL EDTA Aprotinina 13x75 tampa rosa-anel preto PREMIUM, *Greiner Bio-One International*®).

[052] Em seguida, esse sangue é lavado 3 vezes com solução salina 0,9% (p/v), a 2500 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. A solução de eritrócitos é ajustada para uma concentração de 4% (v/v).

[053] Os microtubos contendo apenas solução salina 0,9% (p/v) são usados como controle negativo, representando zero de hemólise (0%). Para atingir 100% de hemólise (controle positivo), é utilizada uma solução de Tween 80 a 2% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v). Além disso, são testadas diferentes concentrações do extrato (15,6 a 250 µg/mL), do creme gel base (62,5 a 250 µg /mL) e do creme gel com extrato (62,5 a 250 µg /mL) diluídas em solução salina 0,9% (p/v).

[054] O teste consiste no contato direto de 500 µL das amostras (extrato, creme gel base e creme gel com extrato) com 500 µL da solução de eritrócitos a 4% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v). Após a incubação dos microtubos a 37°C durante 1 h, estes são centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra são pipetadas para microplacas de 96 poços e a absorbância a 540 nm é determinada usando um leitor de microplacas (*PowerWave Epoch2, BioTek Instruments*®, EUA).

[055] A taxa de hemólise é calculada a partir da equação abaixo, sendo que até 5% de hemólise é considerado como não hemolítico.

[056] Taxa de hemólise (%) = $[(A_A - A_{CN}) / (A_{CP} - A_{CN})] \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_{CP} é a absorbância do controle positivo, todos a 540 nm.

g2) Teste de Citotoxicidade pelo método MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi e do creme gel com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi.

[057] Esse teste é realizado de acordo com o protocolo descrito por *Mosmann* (1983) com algumas modificações (*Tsuboy et al.*, 2010).

[058] Este ensaio consiste no plaqueamento de células de fibroblastos normais murinos (linhagem NIH/3T3) numa densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. As placas de cultura são então incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C com 85% de umidade. Após uma confluência de aproximadamente 75% (durante a noite), estas células são expostas a concentrações diferentes do extrato, do creme gel base e do creme gel com extrato por 24, 48 e 72 h, sendo 100 µL o volume final de cada poço.

[059] São testadas concentrações diferentes do extrato e do creme gel com extrato (15,6 a 250 µg/mL) diluído em meio de cultura completo, além do controle negativo (apenas meio de cultura), do positivo (Tween 80 2% (v/v)) e do controle da formulação com o creme gel base (creme gel sem adição do extrato). Os tempos de tratamento escolhidos são de 24, 48 e 72 h.

[060] Decorrido os tempos de tratamento, o meio é retirado e são adicionados 100 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL (CAS 298-93-1, *Sigma-Aldrich*®; 5 mg de MTT e 10 mL de meio de cultura sem soro) em cada um dos poços, sendo a placa incubada por 4 h a 37°C, 5% CO₂. Após este período, o sobrenadante é descartado e são adicionados 100 µL de DEMO (dimetilsulfóxido) em cada um dos poços para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a leitura da absorbância é realizada em leitor de microplacas (*PowerWave Epoch2, BioTek Instruments*®, EUA) a 570 nm.

A viabilidade celular é calculada de acordo com a seguinte fórmula (Huang; Shang; Zhen, 2005): Viabilidade celular (%) = $(A_A - A_{CN}) / (A_{CP} - A_{CN}) \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_{CP} é a absorbância do controle positivo, todos a 570 nm.

g3) Avaliação do potencial de irritação cutânea do creme gel com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi - *in vitro*.

[061] Este é baseado na desnaturação da albumina do ovo, cuja solubilidade é semelhante à das proteínas encontradas na epiderme (Blohm, 1957; Chiari et al., 2012). São homogeneizados 10 g de claras de ovos durante 5 minutos e adicionados 2,5 g do creme gel com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi a ser analisado. A mistura formada permanece em agitação por 2 minutos e, em seguida, é realizada leitura da transmitância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis. O controle negativo é

constituído de clara de ovo e creme gel base sem o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi, nas mesmas proporções da amostra teste (Chiari et al., 2012). O branco utilizado é água destilada. O teste *in vitro* permite avaliar se o extrato é capaz de desnaturar proteínas. Desta forma, como este apresentou valor maior de transmitância foi considerado como um extrato menos irritante.

g4) Testes de irritabilidade ocular do creme gel com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi - Teste em membrana cório-alantoide de ovos de galinha.

[062] A metodologia utilizada é baseada no método oficial de avaliação do potencial irritante descrito no *Journal Officiel de La Republique Française - Arrêté* du 29 Novembre (1996). A formulação é aplicada sobre a membrana cório-alantoide (MCA) do ovo de galinha no 10º dia de incubação, e observada presença ou não de efeitos irritantes como hiperemia, hemorragia e coagulação ou opacidade.

[063] Para análise da formulação são utilizados 4 ovos fertilizados de galinha, com peso entre 50 e 60 g. 4 ovos são utilizados como controle, sobre os quais nenhuma substância é adicionada. Os ovos são adquiridos, pesados, identificados e incubados por 10 dias a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com umidade relativa de aproximadamente 70%.

Após esse procedimento, os ovos são colocados em posição vertical, sobre um suporte, com a câmara de ar voltada para cima, tendo a casca retirada com o auxílio de um disco de lixa num motor de baixa rotação odontológico, expondo a membrana da casca, a qual foi umidificada com solução salina a 0,9% (p/v) a 37°C (Figura 1).

[064] Com o auxílio de uma pinça, a membrana da casca é removida. Ao realizar esse procedimento, é exposta a membrana cório-alantoide (MCA) que é observada quanto a quaisquer alterações, que implicariam o descarte do ovo. É aplicada sobre a membrana cório-alantoide 300 µL da formulação, não diluída e mantida a 37°C , e após 20 segundos de contato é lavado com 5 mL de solução salina a 37°C , para a retirada da formulação. A análise visual da membrana cório-alantoide é realizada com o auxílio de uma lupa (Figura 2).

[065] Após análise visual, é injetada uma solução de tiopental nos ovos fertilizados. A graduação de cada fenômeno é determinada no período de 5 minutos, conforme o

modelo da escala descrita na Tabela 1. Os fenômenos irritantes observados serão graduados em valores numéricos (1, 3, 5, 7 e 9) dependentes do tempo.

[066] Tabela 1 - Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência.

Fenômeno	Menos de 30 segundos	Entre 30 e 60 segundos	Entre 60 e 300 segundos
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

[067] A classificação da formulação é obtida com a média dos valores de graduação dos 4 ovos, o grau de irritação é dividido em quatro categorias, descritas na Tabela 2. Os ensaios são realizados em triplicata.

[068] Tabela 2 - Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação da formulação avaliada.

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

h) Controle de qualidade do creme gel com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi.

h1) Teste de estabilidade acelerada ou Teste da Centrifugação.

[069] Após 24 horas de sua produção, são pesados cerca de 5 g da formulação em tubos de centrífuga. O Teste da Centrifugação é realizado a temperatura ambiente 25°C, com velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G), durante 30 minutos e em triplicata. Após este tempo, a formulação é analisada macroscopicamente quanto ao seu aspecto (Velasco et al., 2012; Ferreira; Zatti, 2015).

h2) Teste do estresse térmico.

[070] São pesados 5 g da formulação e transferidos para tubos de ensaio. As amostras são submetidas ao estresse térmico em triplicata, em banho-maria termostatzado, no intervalo de temperatura entre 40 a 80°C, com elevação de 10°C a cada 30 minutos até 80°C. A formulação é analisada macroscopicamente quanto ao aspecto após atingirem a temperatura ambiente de 25°C (Ferreira; Zatti, 2015).

h3) Determinação dos aspectos organolépticos.

[071] As características organolépticas avaliadas são: aspecto e cor (visualmente) e odor (através do olfato). As amostras são armazenadas a temperatura ambiente de 25°C, a 45°C na estufa e a 4°C na geladeira. Semanalmente, por um período de 30 dias, uma alíquota de cada diluição é colocada em vidro relógio para comparação com o grupo controle, que é preparado da formulação base não-iônica, armazenado a temperatura de 19°C e ao abrigo da luz (Velasco et al., 2012; Ferreira; Zatti, 2015).

h4) Avaliação do pH do creme gel.

[072] Esta avaliação é realizada semanalmente, por um período de 30 dias, por meio de um acompanhamento do valor do pH da formulação, sendo o valor determinado com pHmetro calibrado. As medições são realizadas em solução diluída a 1:10 com água destilada e em triplicata.

h5) Determinação da espalhabilidade do creme gel.

[073] Uma placa molde circular de vidro com um orifício central é colocada sobre uma placa suporte de vidro. Sob essa placa, é posicionada uma folha de papel milimetrado e uma fonte luminosa. A amostra é introduzida no orifício da placa e nivelada com uma espátula. Em seguida, a placa-molde é retirada. Após 1 minuto, é calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas. Este procedimento é repetido, acrescentando-se novas placas, registrando a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 19 placas (Velasco et al., 2012). A espalhabilidade (E_i), determinada a 25°C, é calculada através da equação: $E_i = (d^2 \times \pi) / 4$, onde E_i é a espalhabilidade da amostra para peso i (mm²) e d o diâmetro médio (mm).

[074] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique

afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR E FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA CONTENDO EXTRATO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. - PEQUI”**, mais precisamente trata-se de um método de obtenção de

fitocosmético em creme gel e formulação de fitocosmético em creme gel, caracterizado por método de obtenção de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetor usando extrato de *Caryocar brasiliense* Camb. - Pequi - aproveitado do resíduo da polpa com as etapas:

- obtenção da torta, resíduo, resultante da extração do óleo da polpa do pequi;
- preparo do extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi;
- preparo da formulação cosmética base;
- desenvolvimento da formulação cosmética contendo este extrato;
- caracterização fitoquímica do fitocosmético por espectrofotometria para dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e do fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas;
- avaliação farmacológica *in vitro* do fitocosmético através da determinação das atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora;
- análise toxicológica do extrato e do fitocosmético;
- controle de qualidade do fitocosmético.

2) **“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR CONTENDO EXTRATO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. - PEQUI”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapas que compõe o método compreenderem:

- obtenção da torta, resíduo, resultante da extração do óleo da polpa - nesta etapa os frutos do pequi são lavados, descascados, embalados em sacos plásticos e estocados sob refrigeração -18°C e cortados manualmente, utilizando faca comum, em pequenos pedaços. O processo de extração do óleo é por prensagem da polpa a frio, utilizando uma miniprensa hidráulica, sendo aplicada uma força de 0,5 ton/cm² durante 1 hora; a

torta resultante da prensagem da polpa, que seria descartada, é seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 36°C até obtenção do peso seco;

- preparo do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi - o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi é preparado na proporção de 1 g da torta da polpa do pequi seca por 10 mL de solução de etanol a 70% em água destilada; em seguida, é submetido à agitação vigorosa por 30 minutos e depois permanece em maceração estática (repouso) ao abrigo da luz por 3 dias; após, o extrato resultante é filtrado para a obtenção de uma fração líquida; esta fração é levada ao rotaevaporador para eliminação do álcool e, posteriormente, colocado na estufa durante a 36°C para secagem e obtenção de um peso constante;

- preparo da formulação cosmética base - fase A - (Oleosa) - óleo mineral (agente emoliente) - 2%; Tween 80 (agente emulsificante) - 2,5%; Polawax 400 (agente emulsificante) - 10%; Parabenos (conservante) - 0,5%; fase B (Aquosa): Carbopol (agente viscoso) - 0,5%; Glicerina (umectante) - 4%; Água destilada (veículo) - 80,5% (quantidade para 100 g); para o preparo da formulação, as fases A e B são aquecidas até 80°C. Em seguida, a fase 'B' é vertida sobre a 'A' e a mistura emulsionada sob agitação na mesma temperatura por aproximadamente 10 minutos; o extrato é inserido à formulação na concentração de 5%;

- preparo de soluções com o creme gel do pequi - é preparada uma solução com a concentração de 50 mg/mL do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi; a partir desta, são realizadas outras diluições empregadas na dosagem de flavonoides, de fenóis totais e nos testes de atividade antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora;

- caracterização fitoquímica do fitocosmético por dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e do fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas - dosagem de fenóis totais - o método utilizado é o de *Folin-Ciocalteu* para a determinação dos compostos de fenóis totais, utilizando-se ácido gálico como padrão de comparação; a cada 0,5 mL de amostra de creme gel em diversas concentrações são adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico); após 3 minutos é adicionado 1 mL de solução

de Na_2CO_3 saturada a 10% (p/v) e a mistura armazenada por 1 hora; a absorbância é medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis; todos os testes são realizados em triplicata;

- dosagem de flavonoides - dosagem dos flavonoides do creme gel é feita por espectrofotômetro UV-Vis; para isso, 0,5 mL da solução do creme gel são acrescidas de 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de AlCl_3 10% (p/v) e 0,1 mL de CH_3COONa e os tubos são completados para 5 mL com água destilada; os tubos são homogeneizados e mantidos por 30 minutos ao abrigo da luz; por fim, a leitura é realizada a 425 nm. Os testes são realizados em triplicata;

- análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM) - a partir das frações preparadas, um método CLAE-DAD/UV é desenvolvido através de várias análises empiricamente; solventes para as fases móveis são selecionados em guias para a seleção de solventes verdes; é utilizada a abordagem recomendada para o desenvolvimento do método de fase reversa descrita por Snyder, Kirkland e Dolan, seguindo as seguintes modificações de ajuste na % de solvente orgânico, ajuste a seletividade (mudar o solvente orgânico, alterar o tipo de coluna e/ou variar a temperatura) e otimização das condições da coluna (comprimento, tamanho de partícula e fluxo);

- avaliação farmacológica *in vitro* do fitocosmético através da determinação das atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora - sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) - método utilizado consiste no monitoramento do decaimento da absorbância no comprimento de onda observado entre 515 a 530 nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical livre DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazila); os experimentos são realizados com a formulação proposta e em triplicata, para fins estatísticos, utilizando 500 μL da solução da formulação com concentrações de 0,5 a 7 mg/mL, em intervalos de 0,5 mg/mL, e 500 μL de solução de DPPH, cuja concentração foi definida com a obtenção de uma absorbância entre 0,9 a 1,0; a solução reage com o radical DPPH por 30 minutos em ambiente escuro e é submetida ao espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 517nm; o controle negativo (CN) é formado por 500 μL da solução da formulação sem extrato

hidroetanólico da torta da polpa do pequi, dissolvida em etanol, acrescida do mesmo volume de DPPH; como controle positivo (CP) é preparada uma solução a partir de 1 g de creme gel, contendo 0,2 mg de quercetina, em 1 mL de etanol; para análise do controle positivo, 500 µL desta solução são dissolvidos no mesmo volume de DPPH; o branco (B) consiste em 1 mL de metanol; o cálculo da atividade antioxidante da formulação, ou seja, a capacidade de sequestrar radicais livres DPPH é expressa de duas formas, (1) determinação da concentração eficiente EC₅₀, que representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH; e (2) definição do percentual de inibição de oxidação do radical, de acordo com a fórmula: atividade antioxidante (%) = $[(A_{CN} - A_B) - (A_A - A_B) / (A_{CN} - A_B)] \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_B é a absorbância do branco após 30 minutos, todos a 517 nm;

- avaliação da lipoperoxidação *in vitro* (LPO) do creme gel do pequi - como fonte de lipídios foi usada gema de ovo; assim, 10 g de gema são homogeneizados em 100 mL tampão fosfato 0.1 M; em tubos de vidro com tampa de rosca são colocados 0,5 mL da solução, 0,4 mL de água destilada e 0,1 mL da solução da formulação com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi em etanol nas concentrações de 50; 37,5; 25 e 12,5 mg/mL; é adicionado 0,1 mL de solução AAPH (2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido) a 0,12 M e incubado a 37°C por 30 minutos; por fim, são adicionados 1,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) a 20% (p/v) e 1,5 mL de TBA (Ácido Tiobarbitúrico) a 1 % (p/v); a mistura resultante é incubada a 95°C por 60 minutos, acrescida de 5,0 mL de butanol e centrifugada a 3500 G por 10 minutos, do sobrenadante é retirado 1 mL e medido em espectrofotômetro a 532 nm; é utilizado como controle negativo (CN) o álcool metílico absoluto no volume de 0,1 mL, em substituição ao da formulação com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi; como controle positivo (CP) é utilizado 0,1 mL de uma solução contendo formulação enriquecida com quercetina, na concentração de 0,1 mg/mL, e dissolvida em álcool metílico; o branco (B) é feito com apenas álcool metílico; a atividade antioxidante foi calculada segundo a equação: Inibição da peroxidação lipídica (%) = $[(A_{CN} - A_B) - (A_A - A_B) / (A_{CN} - A_B)] \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_B é a absorbância

do branco; a concentração do extrato (mg/mL) necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica (EC_{50}) também é calculada;

- determinação *in vitro* do fator de proteção solar do creme gel do pequi – a análise do FPS é feita por meio de um teste *in vitro*; o aparelho calcula o FPS, automaticamente, de acordo com a Equação 1, sendo o $E\lambda$ corresponde ao espectro de ação eritematosa, $S\lambda$ é a irradiância solar espectral, $T\lambda$ é a transmitância espectral da amostra com a integral calculada entre os limites de comprimento de onda de 290-400 nm; o equipamento mede a transmissão difusa nas amostras da formulação fitocosmética na região de comprimento de onda ultravioleta entre os limites de comprimento de onda de 290 nm a 400 nm; uma fonte de luz xenônio, através de uma esfera integradora, emite um feixe de luz difusa intensa e uniforme que ilumina a amostra, minimizando o tempo de integração dos dados; um conjunto de dois espectrômetros é acoplado à fonte de luz, por meio de um sistema de fibra óptica projetado para sistemas de luz difusa de baixa intensidade; as amostras de creme gel são posicionadas em uma plataforma mecânica que permite que a medição se repita exatamente no mesmo ponto do substrato. Como substrato é utilizada a placa de quartzo com a fita Transpore 3M® e em cada placa é utilizado 2 mg/cm² de cada amostra e após 20 minutos é realizada a leitura de 9 pontos diferentes da placa; para avaliação *in vitro* do FPS e da proteção UVA é utilizada a formulação do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi a 5%; como controle positivo, o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi é substituído pelo filtro solar UVB/UVA hidrossolúvel, que possui em sua composição o ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico e ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico, incorporado à formulação na concentração de 15%; a fim de constatar uma possível potencialização dos efeitos fotoprotetores do filtro solar sintético na presença do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi, eles são associados em uma mesma formulação;

- atividade antienvelhecimento do creme gel do pequi por meio da avaliação do potencial de anti-glicação - sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose - a glicação de proteínas por glicose é avaliada utilizando o BSA/Glicose; em 2,5 mL do volume total da reação de glicação são incluídas 0,5 mL das diferentes diluições da solução da

formulação com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi em álcool metílico nas concentrações já definidas, de 50, 25 e 12,5 mg/mL; além disso, 20 mg/mL de BSA, 500 mM de glicose, 0,02% (p/v) de azida de sódio e tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) são adicionados; após incubação a 37°C durante 3 semanas, a quantidade formada de AGEs fluorescentes é determinada utilizando um espectrômetro de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 330 nm e comprimento de onda de emissão de 410 nm; a porcentagem de inibição de formação de AGEs é calculada utilizando a seguinte equação: $\text{Inibição (\%)} = [1 - (\text{FIA} - \text{FIB}) / (\text{FIC} - \text{FICB})] \times 100$, sendo que FIA - FIB é a diferença entre a intensidade de fluorescência de uma amostra incubada com glicose e outra sem a adição de glicose, e FIC - FICB é a diferença entre a intensidade de fluorescência do controle de água destilada com a glicose e o controle sem glicose;

- sistema BSA/MGO - na glicação de proteínas mediada por MGO (Metilglioxal, agente glicante intracelular), diluições da solução da formulação com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi em álcool metílico são incubadas com 20 mg/mL de BSA, 1 mM MGO e 0,02% (p/v) de azida de sódio em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a 37°C durante 1 semana; a formação de AGEs fluorescentes total é determinada pela porcentagem de inibição da formação de AGEs para cada diluição do extrato e é calculada conforme descrito acima;

- avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi e do creme gel com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi - teste da Atividade Hemolítica do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi - a atividade é investigada através do contato direto utilizando-se 4 mL de sangue de carneiro comercial com ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA como anticoagulante; em seguida, esse sangue é lavado 3 vezes com solução salina 0,9% (p/v), a 2500 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante; a solução de eritrócitos é ajustada para uma concentração de 4% (v/v); os microtubos contendo apenas solução salina 0,9% (p/v) são usados como controle negativo, representando zero de hemólise (0%); para atingir 100% de hemólise (controle positivo), é utilizada uma solução de Tween 80 a 2% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v); além disso, são testadas diferentes concentrações do extrato (15,6 a 250 µg/mL), do creme gel base (62,5 a 250 µg/mL) e do creme gel com

extrato (62,5 a 250 µg/mL) diluídas em solução salina 0,9% (p/v); o teste consiste no contato direto de 500 µL das amostras (extrato, creme gel base e creme gel com extrato) com 500 µL da solução de eritrócitos a 4% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v); após a incubação dos microtubos a 37°C durante 1 h, estes são centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos; alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra são pipetadas para microplacas de 96 poços e a absorbância a 540 nm é determinada usando um leitor de microplacas; a taxa de hemólise é calculada a partir da equação, sendo que até 5% de hemólise foi considerado como não hemolítico; taxa de hemólise (%) = $[(A_A - A_{CN}) / (A_{CP} - A_{CN})] \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_{CP} é a absorbância do controle positivo, todos a 540 nm;

- teste de Citotoxicidade pelo método MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] do extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi e do creme gel com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi - este ensaio consiste no plaqueamento de células de fibroblastos normais murinos (linhagem NIH/3T3) numa densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços; as placas de cultura são incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C com 85% de umidade; após uma confluência de aproximadamente 75% (durante a noite), estas células são expostas a concentrações diferentes do extrato, do creme gel base e do creme gel com extrato por 24, 48 e 72 h, sendo 100 µL o volume final de cada poço; são testadas concentrações diferentes do extrato e do creme gel com extrato (15,6 a 250 µg/mL) diluído em meio de cultura completo, além do controle negativo (apenas meio de cultura), do positivo (Tween 80 2% (v/v)) e do controle da formulação com o creme gel base (creme gel sem adição do extrato); os tempos de tratamento escolhidos são de 24, 48 e 72 h; decorrido os tempos de tratamento, o meio é retirado e são adicionados 100 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL (CAS 298-93-1, Sigma-Aldrich®; 5 mg de MTT e 10 mL de meio de cultura sem soro) em cada um dos poços, sendo a placa incubada por 4 h a 37°C, 5% CO₂; após este período, o sobrenadante é descartado e são adicionados 100 µL de DEMO (dimetilsulfóxido) em cada um dos poços para solubilização dos cristais de formazan; em seguida, a leitura da absorbância é realizada em leitor de microplacas a 570 nm; a viabilidade celular é calculada de acordo com a seguinte fórmula: viabilidade celular (%) = $(A_A - A_{CN}) / (A_{CP} - A_{CN}) \times 100$

$A_{CN}) \times 100$, onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_{CP} é a absorbância do controle positivo, todos a 570 nm;

- avaliação do potencial de irritação cutânea do creme gel com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi *in vitro* - é baseado na desnaturação da albumina do ovo, cuja solubilidade é semelhante à das proteínas encontradas na epiderme; são homogeneizados 10 g de claras de ovos durante 5 minutos e adicionados 2,5 g do creme gel com o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi a ser analisado; a mistura formada permanece em agitação por 2 minutos e, em seguida, é realizada leitura da transmitância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis; o controle negativo é constituído de clara de ovo e o creme gel base sem o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi, nas mesmas proporções da amostra teste; o branco utilizado é a água destilada;

- testes de irritabilidade ocular do creme gel com extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi *in vitro* - teste em membrana cório-alantoide de ovos de galinha - a metodologia utilizada é baseada no método oficial de avaliação do potencial irritante onde a formulação é aplicada sobre a membrana cório-alantoide (MCA) do ovo de galinha, no 10º dia de incubação, e observada presença ou não de efeitos irritantes como hiperemia, hemorragia e coagulação ou opacidade; para análise da formulação são utilizados 4 ovos fertilizados de galinha, com peso entre 50 e 60 g. 4 ovos são utilizados como controle, sobre os quais nenhuma substância foi adicionada; os ovos são adquiridos, pesados, identificados e incubados por 10 dias a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ com umidade relativa de aproximadamente 70%; após esse procedimento, os ovos são colocados em posição vertical, sobre um suporte, com a câmara de ar voltada para cima, tendo a casca retirada com o auxílio de um disco de lixa num motor de baixa rotação odontológico, expondo a membrana da casca, a qual foi umidificada com solução salina a 0,9 % a 37°C ; com o auxílio de uma pinça, a membrana da casca é removida; ao realizar esse procedimento, é exposta a membrana cório-alantoide (MCA) que é observada quanto a quaisquer alterações, que implicam o descarte do ovo; é aplicada sobre a membrana cório-alantoide 300 µL da formulação, não diluída e mantida a 37°C , e após 20 segundos de contato é lavado com 5 mL de solução salina a 37°C , para a retirada da formulação;

após análise visual, é injetada uma solução de tiopental nos ovos fertilizados; a graduação de cada fenômeno é determinada no período de 5 minutos; a classificação da formulação é obtida com a média dos valores de graduação dos 4 ovos, o grau de irritação é dividido em quatro categorias;

- controle de qualidade do fitocosmético - teste de estabilidade acelerada ou teste da centrifugação - após 24 horas de sua produção, são pesados cerca de 5 g da formulação em tubos de centrifuga; o teste da centrifugação é realizado a temperatura ambiente 25°C, com velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G), durante 30 minutos e em triplicata; após este tempo, a formulação é analisada macroscopicamente quanto ao seu aspecto;

- teste do estresse térmico - são pesados 5 g da formulação e transferidos para tubos de ensaio; as amostras são submetidas ao estresse térmico em triplicata, em banho-maria termostatzado, no intervalo de temperatura entre 40 a 80°C, com elevação de 10°C a cada 30 minutos até 80°C; a formulação é analisada macroscopicamente quanto ao aspecto após atingirem a temperatura ambiente de 25°C;

- determinação dos aspectos organolépticos - as características organolépticas avaliadas são aspecto e cor (visualmente) e odor (através do olfato); as amostras são armazenadas a temperatura ambiente de 25°C, a 45°C na estufa e a 4°C na creme gel geladeira; semanalmente, por um período de 30 dias, uma alíquota de cada diluição é colocada em vidro relógio para comparação com o grupo controle, que é preparado da formulação base não- iônica, armazenado à temperatura de 19°C e ao abrigo da luz;

- avaliação do pH do creme gel - esta avaliação é realizada semanalmente, por um período de 30 dias, por meio de um acompanhamento do valor do pH da formulação, sendo o valor determinado com pHmetro calibrado; as medições são realizadas em solução diluída a 1:10 com água destilada e em triplicata;

- determinação da espalhabilidade do creme gel - uma placa molde circular de vidro com um orifício central é colocada sobre uma placa suporte de vidro; sob essa placa, é posicionada uma folha de papel milimetrado e uma fonte luminosa; a amostra é introduzida no orifício da placa e nivelada com uma espátula; em seguida, a placa-molde é retirada; após 1 minuto, é calculada a superfície abrangida, através da medição do

diâmetro em duas posições opostas; este procedimento é repetido acrescentando-se novas placas, registrando a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 19 placas; a espalhabilidade (E_i), determinada a 25°C, é calculada através da equação $E_i = (d^2 \times \pi) / 4$, onde E_i é a espalhabilidade da amostra para peso i (mm²) e d o diâmetro médio (mm).

3) **“FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por formulação conter extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi que apresenta propriedades antioxidante, antienvelhecimento e fotoprotetora.

4) **“FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por formulação enriquecida com o extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi apresentar grandes quantidades de fenóis e flavonoides.

4) **“FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por formulação cosmética base, cuja fase oleosa compreende óleo mineral como agente emoliente 2%; Tween 80 como agente emulsificante 2,5%; Polawax 400 como agente emulsificante 10%; parabenos como conservante 0,5%.

6) **“FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por formulação cosmética base, cuja fase aquosa compreende carbopol como agente viscoso 0,5%; glicerina como umectante 4%; água destilada como veículo 80,5%.



FIG.1



FIG.2

RESUMO

“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR E FORMULAÇÃO DE FITOCOSMÉTICO EM CREME GEL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA CONTENDO EXTRATO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. - PEQUI”, mais precisamente trata-se de um método de obtenção de fitocosmético em creme gel e formulação de fitocosmético em creme gel antioxidante e fotoprotetora com extrato de *Caryocar brasiliense* Camb. - Pequi - obtido do resíduo da polpa, torta, resultante da extração do óleo da polpa; preparo do extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi; preparo da formulação cosmética base; desenvolvimento da formulação cosmética contendo este extrato; caracterização fitoquímica do fitocosmético por dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas; avaliação farmacológica *in vitro* do fitocosmético através da determinação das atividades antioxidante, antienvhecimento e fotoprotetora; análise toxicológica do extrato e do fitocosmético; g) controle de qualidade do fitocosmético.