



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA *IN VITRO* DO
EXTRATO DO FRUTO DA *Spondias tuberosa* EM FORMULAÇÃO
COSMÉTICA

TAILAINE NASCIMENTO DE CASTRO

Salvador

2022

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA *IN VITRO* DO
EXTRATO DO FRUTO DA *Spondias tuberosa* EM FORMULAÇÃO
COSMÉTICA**

TAILAINE NASCIMENTO DE CASTRO

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Edith Cristina Laignier
Cazedey

Coorientador: Prof. Dr. Milleno Dantas Mota

Linha de Pesquisa: Prospecção de Fármacos e
Recursos Naturais

Salvador

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

C355a

Castro, Tailaine Nascimento de

Avaliação da atividade fotoprotetora in vitro do extrato do fruto da *Spondias tuberosa* em formulação cosmética / Tailaine Nascimento de Castro. - Salvador, 2022.

107 fls : il.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Edith Cristina Laignier Cazedey.

Coorientador(a): Prof^o Dr. Mileno Dantas Mota.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2022.

1.Cosméticos - Fórmula, receitas, etc - Brasil. 2.Cosméticos - Umbu.
3.Antioxidantes - Umbu. 4.Recursos naturais - Umbu.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO
"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA IN VITRO DO EXTRATO DO FRUTO
DA SPONDIAS TUBEROSA EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA"

TAILAINE NASCIMENTO DE CASTRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 14 de fevereiro de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professora Dra. EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY
Universidade Federal da Bahia – UFBA
Doutorado em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



Professor Dr. MILLENO DANTAS MOTA
Universidade do Estado da Bahia – UNEB
Doutorado em Biotecnologia
Universidade Federal da Bahia



Dra. Elisalva T. Guimarães
Universidade do Estado da Bahia
Mat. n.º 145313223

Professora Dra. ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA



Professor Dr. ADEMIR EVANGELISTA DO VALE
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por me conduzir em todos momentos difíceis e pela sabedoria ao reconhecer todas as graças encontradas durante esta caminhada.

A minha família, em especial aos meus pais, Maria Nilza e José Mario, ao meu irmão e ao meu namorado, pelo apoio e suporte incondicional.

Aos meus orientadores, Prof. Dra Edith Cristina Laignier e Prof. Dr. Milleno Dantas por todos os ensinamentos, profissionalismo, disponibilidade e confiança a mim depositada.

Aos mestrandos Luiza Macedo, Gabriel Rocha, Vilmar Barbosa, Vagner Cardoso e Daniel Batista, companheiros de jornada, os quais tive o prazer de conhecer e que com certeza tornaram essa trajetória menos árdua.

A Universidade do Estado da Bahia, em particular, ao corpo docente, por contribuir com o meu aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, que de forma indireta tem uma participação em todo o trabalho aqui realizado.

À banca examinadora pela disponibilidade, atenção e sugestões.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CASTRO, T. N. **Avaliação da atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato do fruto da *Spondias tuberosa* em formulação cosmética** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2022,107p.

A aplicação de produtos naturais em formulações cosméticas é uma tendência mundial. Deste modo, os compostos fenólicos, em razão da sua estrutura química, vêm sendo utilizados em fotoprotetores, pois possuem a capacidade de absorver a energia ultravioleta e reduzir a formação de radicais livres. O fruto da *Spondias tuberosa* e, até mesmo os seus resíduos, tem demonstrado atividade antioxidante, devido à identificação e quantificação de compostos fenólicos, principalmente flavonoides e taninos e, por isso, há um potencial uso em formulações fotoprotetoras. Este trabalho avaliou a proteção solar *in vitro* do extrato etanólico do epicarpo do umbu incorporado em formulação cosmética. Os extratos concentrados tiveram seu conteúdo fenólico e de flavonoide total quantificados por espectrofotometria, a partir dos padrões de ácido gálico e quercetina, respectivamente. As formulações produzidas contendo os extratos padronizados em fenólicos totais, associados ou não com filtro solar orgânico sintético, tiveram o Fator de Proteção Solar (FPS) calculados utilizando o método espectrofotométrico de Mansur, além da avaliação da estabilidade preliminar. O extrato etanólico da *Spondias tuberosa* apresentou teor de fenólicos totais de $10,951 \pm 0,842$ mg GAE g⁻¹ e flavonoides totais de $5,143 \pm 0,179$ mg QE g⁻¹. As formulações F4, F5 e F6, que possuíam apenas o extrato em diferentes concentrações de fenólicos totais, apresentaram FPS inferior a 2. Entretanto, as formulações F7, F8 e F9, nas quais havia o extrato em diferentes concentrações de fenólicos totais, associado ao *ethylhexylmethoxycinnamate* (EHMC), filtro solar sintético, apresentaram incremento de 162% no valor do FPS. Além disso, nenhuma das formulações desenvolvidas apresentou alterações significativas quanto as características organolépticas, demonstrando-se estáveis nas condições e no tempo preliminar empregados no estudo. Portanto, o extrato do epicarpo do umbu utilizado isoladamente na formulação não demonstrou atividade fotoprotetora notável, no entanto, foi observado possível efeito sinérgico ao associar o extrato com o filtro solar sintético, devido ao aumento significativo no valor do FPS encontrado neste trabalho.

Palavras-chave: Cosmético; Fotoproteção; Antioxidante; Compostos fenólicos; *Spondias tuberosa*.

ABSTRACT

CASTRO, T. N. **Avaliação da atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato do fruto da *Spondias tuberosa* em formulação cosmética** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2022,107p.

The application of natural products in cosmetic formulations is a worldwide trend. In this way, phenolic compounds, in the formation of their chemical structure, have been used in photoprotectors, as they have the ability to absorb ultraviolet energy and reduce that of free radicals. The fruit of *Spondias tuberosa* and even its residues have antioxidant activity, due to the identification and quantification of phenolic compounds, mainly flavonoids and tannins and, therefore, it has a potential use in photoprotective formulations. This work seeks to evaluate the *in vitro* photoprotective effect of the umbu pericarp ethanolic extract incorporated in a cosmetic formulation. The concentrated extracts had their total phenolic and flavonoid content quantified by spectrophotometry with concentrations compared to the standards of gallic acid and quercetin, respectively. The formulations produced with the concentrated extracts in their composition, associated or not with synthetic organic sunscreen, had the Sun Protection Factor (SPF) quantified using Mansur's spectrophotometric method, in addition to the preliminary stability evaluation. The ethanolic extract of *Spondias tuberosa* showed a total phenolic content of 10.951 ± 0.842 mg GAE g⁻¹ and total flavonoids 5.143 ± 0.179 mg QE g⁻¹. The formulations F4, F5 and F6, which had only the extract of different concentrations of total phenolics, showed SPF lower than 2. Formulations F4, F5 and F6, containing only the extract, had an SPF less than 2. However, formulations F7, F8 and F9, in which there was extract in different concentrations of total phenolics, associated with ethylhexylmethoxycinnamate (EHMC), a synthetic sunscreen, showed an increase of 162% in the SPF value. Furthermore, all formulations showed insignificant changes in terms of organoleptic characteristics, demonstrating to be stable under the conditions and time used in the study. Therefore, the umbu epicarp extract used alone in the formulation did not demonstrate remarkable photoprotective activity, however, a possible synergistic effect was observed when associating the extract with the synthetic sunscreen, due to the significant increase in the SPF value found in this work.

Palavras-chave: Cosmetic; Photoprotection; Antioxidant activity; phenolic compounds; *Spondias tuberosa*.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| Abs | Absorvância |
| Abs0 | Absorvância do ensaio em branco |
| Abs1 | Absorvância do extrato. |
| ABTS | <i>2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid</i> |
| AlCl ₃ | Cloreto de alumínio |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| COLIPA | Associação da Indústria Cosmética Europeia |
| CPDs | Dímeros de pirimidina de ciclobutano |
| DEM | Dose Eritematosa Mínima |
| DPPH | <i>2,2-difenil-1-picril-hidrazil</i> |
| EE | Efeito eritematígeno |
| FPS | Fator de Proteção Solar |
| FPUVA | Fator de Proteção UV-A |
| FC | Fator de Correção |
| FRAP | Ensaio do poder redutor-antioxidante férrico. |
| GPx | Glutathione-peroxidase |
| GCO | <i>Global Cancer Observatory</i> |
| GAE | Equivalente a ácido gálico |
| HMS | Salicilato de homometil (<i>homomenthylsalicylate</i>) |
| I | Intensidade |
| I% | Atividade de radicais livres |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| INPI | Instituto Nacional da Propriedade Intelectual |
| IV | Infravermelho |
| λ | Comprimento de onda |
| MM | Melanoma maligno |
| M | Molar; molL ⁻¹ |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| nm | Nanômetro |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sódio |
| NMSC | Câncer de pele não melanoma |
| o/w | Óleo em água |
| O ₃ | Ozônio |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ORAC | Ensaio da Capacidade de absorção de radical de oxigênio |
| PPD | <i>Persistent Pigment Darkening</i> (Escurecimento Persistente do Pigmento) |
| QE | Equivalente a quercetina |
| RL | Radicais livres |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RON | Espécies reativas de nitrogênio |
| SOD | Superóxido-dismutase |
| TAC | Ensaio da Capacidade total antioxidante |

| | |
|-----|---------------------|
| TE | Trolox® equivalente |
| UV | Ultravioleta |
| UVA | Ultravioleta A |
| UVB | Ultravioleta B |
| UVC | Ultravioleta C |
| Vis | Visível |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| Figura 4.1 | Camadas da pele e suas estruturas | 18 |
| Figura 4.2 | Penetração das radiações UVA e UVB nas diferentes camadas da pele | 20 |
| Figura 4.3 | Efeitos maléficos à pele decorrente da exposição excessiva a radiação UV | 22 |
| Figura 4.4 | Mecanismo de ação de filtros solares orgânicos. | 24 |
| Figura 4.5 | Efeito de ressonância da molécula de cinamato | 25 |
| Figura 4.6 | Efeito de ressonância da molécula de benzofenona | 25 |
| Figura 4.7 | Mecanismo de ação de filtros solares inorgânicos | 26 |
| Figura 4.8 | Classificação dos compostos fenólicos | 29 |
| Figura 4.9 | Núcleo fundamental dos flavonoides e sua enumeração | 29 |
| Figura 4.10 | Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos. (a) Flavonois, Flavonas Flavanonas; (b) Ácido benzoico; (c) Antocianidinas; (d) Isoflavonas; (e) Ácido hidroxinâmico; (f) Estilbenos; (g) Lignanas; (h) Chalconas; (j) Taninos condensados; (k) Tanino hidrolisáveis. | 31 |
| Figura 4.11 | Árvore de <i>Spondias tuberosa</i> . | 33 |
| Figura 4.12 | Frutos em diferentes fases de maturação. | 34 |
| Figura 4.13 | Estruturas internas do umbu. | 34 |
| Figura 4.14 | Esquema básico do espectrofotômetro. | 37 |
| Figura 5.1 | Diagrama ilustrativo da metodologia que será empregada na pesquisa. | 38 |
| Figura 5.2 | Curva de calibração utilizada para determinação de fenólicos totais baseada nas concentrações de ácido gálico | 40 |
| Figura 5.3 | Curva de calibração utilizada para determinação de fenólicos flavonoides totais baseada nas concentrações de quercetina | 41 |
| Figura 6.1.1 | Metodologia aplicada na seleção dos artigos. | 50 |
| Figura 6.1.2 | Geração de espécies reativas de oxigênio. | 56 |
| Figura 6.1.3 | Frequência e métodos <i>in vitro</i> utilizados para a determinação da ação antioxidante em produtos de origem natural. | 58 |
| Figura 6.1.4 | Estrutura química básica dos compostos fenólicos. | 62 |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Figura 6.1.5 | Estrutura química básica dos ácidos fenólicos (a), flavonoides (b), estilbenos (c), lignanos (d) e taninos (e). | 68 |
| Figura 6.2.1 | Aparências das formulações desenvolvidas após 24h de preparo. | 85 |
| Figura 6.2.1 | Valores do FPS obtidos para cada formulação desenvolvida. | 86 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------------------------|--|---------------|
| Tabela 4.1 | Absorção máxima dos compostos fenólicos na região do UV-Vis. | 28 |
| Tabela 5.1 | Planificação qualitativa e quantitativa das formulações tópicas contendo extratos etanólico do epicarpo do umbu. | 43 |
| Tabela 5.2; Tabela 6.2.1 | Ponderação empregada no cálculo do FPS segundo Método de Mansur. | 46; 81 |
| Tabela 6.2.2 | Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais no extrato de umbu 1mgmL^{-1} . | 82 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Quadro 5.1 | Classificação das formulações quanto as características organolépticas. | 44 |
| Quadro 6.1.1 | Ensaio biológico empregado na avaliação da atividade fotoprotetora de extratos vegetais. | 63 |
| Quadro 6.1.2 | Relação de plantas e frutos contendo compostos fenólicos que apresentaram ação fotoprotetora e antioxidante a partir de métodos instrumentais utilizados na literatura. | 64 |
| Quadro 6.2.1 | Testes realizados para avaliar a estabilidade acelerada das formulações F1 a F9. | 85 |
| Quadro 6.2.2 | Valores de FPS obtidos utilizando uma mistura de filtros solares sintéticos. | 88 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 15 |
| 3 | OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 | Objetivo geral | 17 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 17 |
| 4 | REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 4.1 | Pele | 18 |
| 4.2 | Radiação solar e os danos causados..... | 19 |
| 4.3 | Fotoproteção | 22 |
| 4.4 | Uso de antioxidantes em formulações fotoprotetoras | 27 |
| 4.5 | <i>Spondias tuberosa</i> | 32 |
| 4.6 | Eficácia dos fotoprotetores..... | 35 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 5.1 | Revisão sistemática de métodos <i>in vitro</i> para determinação da fotoproteção e atividade antioxidante..... | 38 |
| 5.2 | Obtenção dos frutos da <i>Spondias tuberosa</i> | 39 |
| 5.3 | Preparo dos extratos a partir do epicarpo da <i>Spondias tuberosa</i> | 39 |
| 5.4 | Determinação compostos fenólicos totais (TPC) | 39 |
| 5.5 | Determinação do teor de flavonoides totais | 40 |
| 5.6 | Desenvolvimento de formulações cosméticas | 41 |
| 5.7 | Avaliação da estabilidade preliminar das formulações cosméticas..... | 44 |
| 5.7.1 | Análise das características organolépticas | 44 |
| 5.7.2 | Teste do estresse térmico..... | 45 |
| 5.7.3 | Ciclo gelo/degelo..... | 45 |
| 5.8 | Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> | 45 |
| 5.9 | Análise estatística | 46 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 6.1 | Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes <i>in vitro</i> (Aceito para publicação na Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas) | 47 |
| 6.1.1 | Introdução..... | 47 |
| 6.1.2 | Metodologia | 49 |
| 6.1.3 | Avaliação da ação fotoprotetora: métodos <i>in vitro</i> instrumentais e biológicos | 50 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 6.1.4 | Métodos <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antioxidante | 55 |
| 6.1.5 | Resultados e discussão | 61 |
| 6.1.6 | Conclusão | 70 |
| 6.2 | Avaliação da atividade fotoprotetora <i>in vitro</i> da formulação cosmética contendo extrato alcoólico do epicarpo do fruto da <i>Spondias tuberosa</i> (a ser submetido ao <i>Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology</i> | 78 |
| 6.2.1 | Introdução | 78 |
| 6.2.2 | Material e métodos | 79 |
| 6.2.2.1 | Determinação de compostos fenólicos totais (TPC) | 79 |
| 6.2.2.2 | Determinação do teor de flavonoides totais | 80 |
| 6.2.2.3 | Desenvolvimento de formulações cosméticas | 80 |
| 6.2.2.4 | Avaliação da estabilidade preliminar das formulações cosméticas..... | 81 |
| 6.2.2.5 | Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> | 81 |
| 6.2.3 | Resultados e discussão | 82 |
| 6.2.3.1 | Avaliação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais por espectrofotometria..... | 82 |
| 6.2.3.2 | Avaliação da estabilidade preliminar das formulações contendo extrato de <i>Spondias tuberosa</i> | 84 |
| 6.2.3.3 | Análise da atividade fotoprotetora <i>in vitro</i> | 85 |
| 6.2.4 | Conclusão | 89 |
| 7 | DISCUSSÃO GERAL | 93 |
| 8 | CONCLUSÕES | 95 |
| | Referências | 96 |
| | Anexo A: Comprovante de aceite do Artigo: Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes <i>in vitro</i> | 107 |

1 INTRODUÇÃO

A pele ao ser exposta de forma contínua e desprotegida à radiação ultravioleta (UV) colabora para a formação de radicais livres (RL), os quais desencadeiam inúmeras reações bioquímicas e provocam danos nas células dérmicas e epidérmicas. Essas reações causam a peroxidação dos lipídeos de membrana, degradação da matriz extracelular, fotoenvelhecimento e danos ao DNA que podem levar ao aparecimento do câncer (CABRAL *et al.*, 2011; ALVES, 2015; MACDANIEL *et al.*, 2019).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), é estimado o aumento de 91,1% dos casos de câncer de pele não melanoma (NMSC) em 2040, quando comparado os casos registrados em 2018. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) prevê, para cada ano do triênio 2020-2022, 83.770 novos casos em homens e 93.160 novos casos em mulheres do NMSC. A estimativa para cânceres do tipo melanoma é de 4.200 em homens e de 4.250 em mulheres (BRASIL, 2019; WHO, 2019).

Em 2018, o mercado global de fotoprotetores movimentou 9,23 milhões de dólares, tendo perspectiva de crescimento de 2,15% até 2024, demonstrando a importância desse setor (MORDOR INTELLIGENCE, 2019). De fato, historicamente, o mercado de protetor solar esteve sempre em evolução ao longo do tempo. Em 1880, o sulfato de quinina acidificado foi considerado um filtro solar químico. Nos Estados Unidos, em 1928, foram comercializados protetores solares, nos quais foram utilizados os primeiros filtros solares UV, *benzil salicilato* e o *benzilcinamato*. Posteriormente, novas moléculas fotoprotetoras foram surgindo e, principalmente, nos anos 1980, o interesse comercial nesses produtos foi aumentando significativamente, conforme a população tinha conhecimento dos efeitos deletérios da radiação UV (OLIVEIRA, 2018).

Nessa perspectiva, o grande desafio para a área de fotoproteção consiste na disponibilização de produtos cada vez mais seguros e eficazes (AMBROSIO, 2019). A aplicação de produtos naturais em formulações cosméticas é uma tendência mundial no mercado cosmético. A incorporação de compostos orgânicos naturais, capazes de absorver radiação UV e, de compostos polifenólicos, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, são alternativas empregadas no desenvolvimento

de protetores solares (DAL'BELO, 2008; GREGORIS *et al.*, 2013; FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos vêm sendo utilizados em formulações fotoprotetoras associadas aos filtros solares sintéticos. Os flavonoides, pertencentes a esse grupo de compostos conferem à planta proteção contra a oxidação gerada a partir da radiação UV. Os extratos de plantas ricos em flavonoides são capazes de absorver a luz ultravioleta, geralmente com dois picos máximos de absorção, nas regiões UVA e UVB, o que resulta na possibilidade de uso desses extratos no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras (COSTA *et al.*, 2015; MANSUR *et al.*, 2016).

Estudos realizados demonstraram que nas cascas da *Spondias tuberosa* foram encontrados taninos e flavonoides. Os frutos apresentam antocianinas, ácido ascórbico, minerais, flavonoides e carotenoides, conferindo-lhes um alto poder antioxidante. Desse modo, observou-se que essa planta tem potencial ação antioxidante, antiviral, anti-inflamatório, quimioprotetora e atividade anticolinesterase (RUFINO *et al.*, 2010; COSTA, 2015; ZERAIK *et al.*, 2016; SOUZA; CAMPOS, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2018).

A existência de estudos que estabelecem atividade antioxidante nos frutos da *S. tuberosa*, permite a correlação com seu potencial fotoprotetor. Isso posto, o presente trabalho buscou avaliar a capacidade fotoprotetora *in vitro* de extratos etanólicos do epicarpo da *Spondias tuberosa*.

2 JUSTIFICATIVA

Em 2018, mundialmente, foram registradas 125.867 mortes associadas ao câncer de pele, tendo maior prevalência em homens e idosos, na faixa etária acima de 65 anos. Avaliando o *ranking* de mortes relacionadas ao câncer, o câncer de pele ocupa a 18ª posição, sendo responsável por 1,3% das mortes quando comparado a todos os outros tipos de cânceres existentes (MOTA et al., 2020).

O aumento da incidência global do câncer de pele, assim como os números de mortes relacionados a ele, tem contribuído na busca por estratégias terapêuticas voltadas a prevenção e tratamento para essa doença. Assim como, a preocupação com a toxicidade, que gera reações cutâneas e processos alérgicos e o impacto ambiental decorrente do descarte inadequado de filtros solares sintéticos apresentam, têm levado a incorporação de extratos ricos em substâncias fenólicas, capazes de ampliar a proteção (HUBNER et al., 2019).

Os compostos fenólicos apresentam a capacidade de proteger a pele dos danos causados pelos raios UV (STEVANATO et al., 2013; MOTA et al., 2020). Logo, a existência dessas substâncias, consideradas antioxidantes naturais, na composição de alguns frutos parece explicar a capacidade de defesa do corpo contra agentes externos, entre eles a radiação UV (OMENA, 2012; PAULA, 2015). Eles atuam como antioxidantes, absorvem diretamente energia nesse espectro ou ainda, estabilizam filtros solares sintéticos (HUBNER et al., 2019), promovendo um incremento na atividade fotoprotetora (WRÓBLEWSKA et al., 2019).

Nessa perspectiva, em 2014, o Brasil foi considerado o maior produtor de frutas no mundo, com grande parcela dessa produção atribuída à região Nordeste. As condições climáticas e o tipo de vegetação dessa região favorecem o desenvolvimento e produção de frutas exóticas e muitas vezes exclusivas (COSTA, 2018). Dentre as frutas nativas da Caatinga, encontra-se o umbu, fruto da *Spondias tuberosa*, a qual possui sabor adocicado, levemente ácido e aroma característico, além de ser rico em compostos antioxidantes, ter alto valor nutricional, apresentar diversas aplicações terapêuticas e uma grande importância social, cultural e econômica para a região (GUIMARÃES, 2015; MERTENS et al., 2015; GUEDES, 2018).

A produção em larga escala do umbu levou à sua comercialização *in natura* ou ao processamento desses frutos na forma de polpas, sucos, sorvetes, entre

outros produtos (GUEDES, 2018). A Bahia é o maior produtor nacional desse fruto. Em 2015, a participação baiana na produção do país foi de 88%. Pernambuco atuou com 4% e o Rio Grande do Norte com 2% (BRASIL, 2017). Em 2019, a Bahia contribuiu com a maior parcela, 64,6%, da produção nacional (BRASIL, 2020), ainda que tenha havido redução, associada ao desmatamento, a seca prolongada e a criação de animais, como o bode, o qual se alimenta das sementes e impede a germinação de novas plantas (BRASIL, 2017).

A exploração sustentável e a conservação dos recursos vegetais devem ser estimuladas para a garantia do bioma brasileiro e a manutenção da fonte de renda da população, uma vez que, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), cerca de 1,3 bilhão de toneladas por ano de alimentos próprios para consumo humano são perdidos ou desperdiçados no mundo. Em relação as frutas e vegetais, nos países em desenvolvimento, as perdas concentram-se na produção agrícola, mas falhas no pós-colheita e na distribuição também são severas, devido a deterioração das safras perecíveis no clima quente e úmido (FAO, 2011).

Nesse sentido, agregar valor à cadeia produtiva e buscar meios de aproveitamento dos resíduos agroindustriais são aspectos importantes e que devem ser empregados, pois estudos relatam a presença de compostos bioativos em resíduos agroindustriais, como as cascas dos frutos. Compostos fenólicos, fitoesteróis, tocoferóis e terpenos, são exemplos de substâncias que podem ser encontradas em quantidades consideráveis nesses resíduos e que possuem potencial aplicação cosmética e terapêutica (COSTA *et al.*, 2015; DIAS, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial fotoprotetor *in vitro* do extrato etanólico do epicarpo do umbu (*Spondias tuberosa*) em formulação cosmética.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Analisar os métodos *in vitro* utilizados para determinar a atividade fotoprotetora e antioxidante de extratos naturais;

3.2.2 Determinar a concentração de fenólicos e flavonoides totais presentes no extrato etanólico de *S. tuberosa*;

3.2.3 Desenvolver formulações tópicas contendo extrato etanólico do epicarpo do umbu;

3.2.4 Avaliar a estabilidade preliminar das formulações cosméticas produzidas;

3.2.5 Determinar o Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* a partir de formulações tópicas desenvolvidas;

3.2.6 Avaliar o incremento do FPS de formulações contendo filtro solar orgânico sintético quando acrescido do extrato etanólico de umbu;

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Pele

A pele é o órgão que desempenha, essencialmente, as funções de revestimento e proteção contra fatores externo, entre eles a radiação solar. Ela é formada por duas camadas básicas, a epiderme e a derme, que estão unidas entre si pelas papilas dérmicas (Figura 4.1). Outra camada situada abaixo da epiderme e da derme, chamada de hipoderme ou tecido subcutâneo, é constituída basicamente de gordura e tecido conjuntivo e tem a função de unir a pele ao tecido muscular (SILVA, 2015; MOTA, 2020).

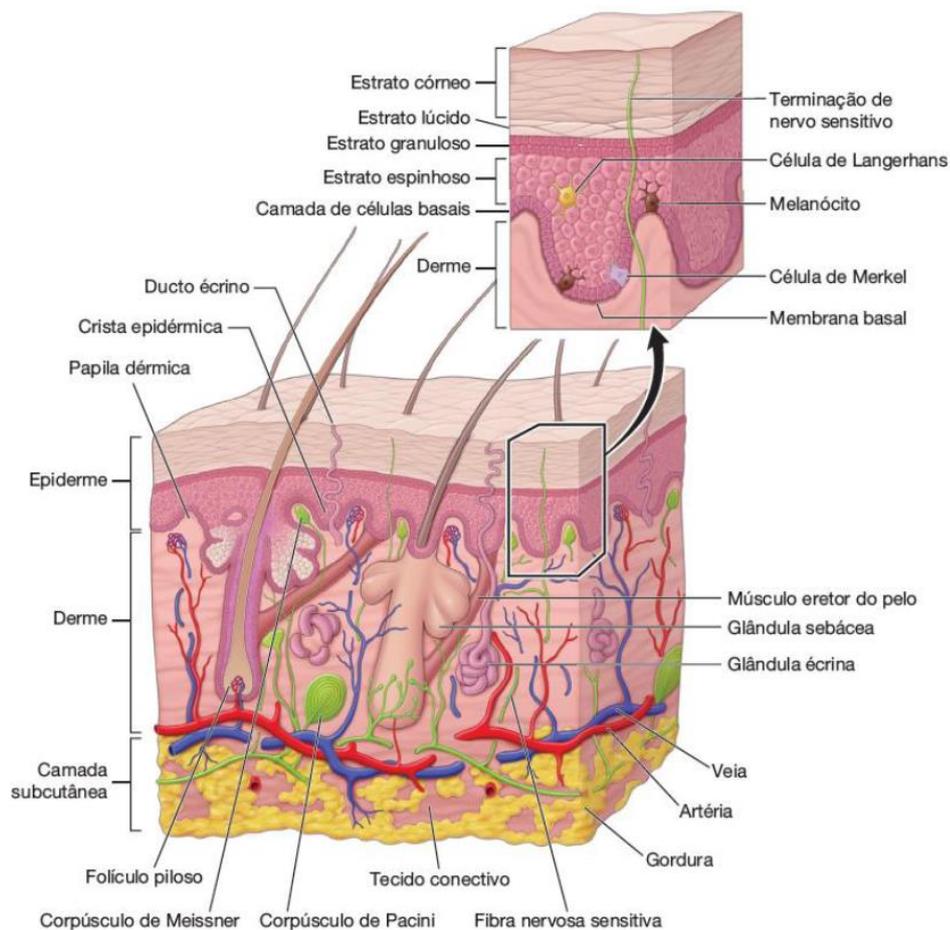


Figura 4.1: Camadas da pele e suas estruturas.

Fonte: BOHJANEN, 2014.

A epiderme, camada mais superficial da pele, é fina e estratificada. Ela é constituída pelos queratinócitos, células metabolicamente ativas, que se arranjam em forma de camadas: (1) basal, (2) espinhosa e (3) granulosa, (4) estrato lúcido e pelo (5) estrato córneo, no qual se encontram as células mortas queratinizadas e

onde, ainda, estão localizados parte dos melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, cromóforo capaz de absorver as radiações UV até regiões do infravermelho próximo (250 a 1200 nm), transformando-as em calor e diminuindo o processo de formação dos radicais livres. (NASCIMENTO, 2014; SILVA, 2015).

A derme é a camada da pele responsável por dar sustentação e firmeza da pele. Nessa camada encontram-se dispostas fibras de colágeno e elastina, produzidas pelos fibroblastos. Sendo que as fibras de colágeno são encontradas na derme papilar e as fibras de elastina, na derme reticular. Para manutenção e garantia da nutrição das células fibroblásticas existem vasos sanguíneos e linfáticos nessa região (NASCIMENTO, 2014).

4.2 Radiação solar e os danos causados

A radiação solar compreende um espectro eletromagnético dividido em três intervalos, de acordo com o seu comprimento de onda (λ): ultravioleta (UV) (100-400 nm), visível (Vis) (400-700 nm) e infravermelho (IV) (acima de 700 nm). A interação da pele humana com cada uma dessas faixas de radiação é percebida de formas e proporções diferentes. Radiações com maior λ são menos energéticas, se comparadas com aquelas que têm menor λ . Portanto, a radiação UV pode ser considerada a mais prejudicial para a pele por ter maior energia e desencadear reações fotoquímicas (OLIVEIRA, 2018; AMBRÓSIO, 2019).

A radiação UV equivale a cerca de 6 a 7% do total de radiações que atinge a superfície da terra, sendo responsável, em grande parte, pelos danos à pele induzidos pelo sol (SOUZA; CAMPOS, 2017). A radiação UV pode ser dividida em UV-C (100–280 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-A (315-400 nm) e o aumento no comprimento onde leva a maior penetração na pele (Figura 4.2) (MOTA et al., 2020).

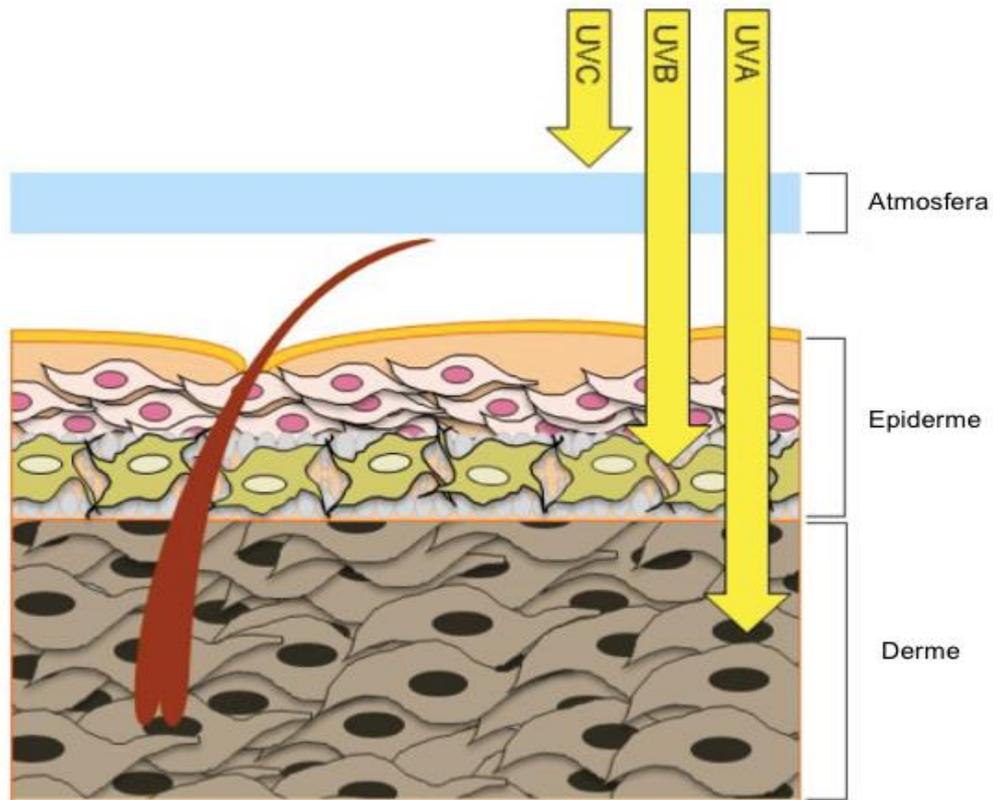


Figura 4.2: Penetração das radiações UVA e UVB nas diferentes camadas da pele.

Fonte: AMBRÓSIO, 2019.

A exposição à radiação UV-C, devido ao seu baixo comprimento de onda, seria extremamente nociva para a pele e ao DNA. Contudo, ela possui baixa solubilidade no oxigênio e grande parte dela também é retida pela camada de ozônio, barreira de defesa natural, o que impede que ela chegue à Terra. Assim, a minimização na destruição da camada de ozônio representa um dos grandes desafios na busca por proteção contra os danos causados pela radiação (NISHIKAWA, 2012; ROY, 2017; OLIVEIRA, 2018; AMBROSIO, 2019).

A radiação UV-B, corresponde a cerca de 1% de toda a radiação solar que entra em contato com a pele, sendo absorvida pela camada mais superficial da pele, a epiderme. No entanto, ela representa uma das partes mais ativas e energéticas da energia solar, sendo responsável pela alteração estrutural do DNA e, portanto, passível de trazer sérios prejuízos à saúde (ROY, 2017). Estudos demonstram que a exposição a esse tipo de radiação também pode causar queimaduras solares, bronzeamento e envelhecimento precoce da pele, além da transformação do ergosterol epidérmico em vitamina D (NISHIKAWA, 2012; SOUZA; CAMPOS, 2017).

Já a radiação UV-A, tipo de radiação mais frequente, atinge as camadas profundas da derme e está diretamente relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), na qual a desproporcionalidade entre a quantidade de ROS formados e a capacidade de neutralização desses radicais pelas substâncias antioxidantes, pode gerar estresse oxidativo (SILVA, 2015). Além disso, a radiação UV-A induz o bronzeamento e as manchas pigmentadas na pele, a supressão da imunidade e o câncer de pele (AMBRÓSIO, 2019).

De modo geral, a radiação UV induz a formação de ROS e danos ao DNA, alterando os genes p53, os quais tornam as células resistentes a apoptose e iniciam ciclos de mitose sem reparo no DNA, contribuindo para o surgimento de câncer de pele.

O câncer de pele é a doença mais comum em caucasianos em todo mundo, sendo que o maior fator de risco para o seu aparecimento é a exposição solar. O câncer de pele não melanoma, o qual tem um crescimento lento, localmente invasivo, com altas taxas de cura se diagnosticado precocemente, é considerado o câncer de maior incidência e com menor índice de mortalidade. Paralelamente, têm-se ainda, o câncer de pele melanoma ou carcinoma basocelular, que se origina nas células não queratinizadas presentes na camada basal da epiderme. Esse tipo de carcinoma é considerado mais agressivo devido a alta possibilidade de metástase (ZINK, 2014).

Assim como, está associada também a radiação solar, a indução de genes pró-inflamatórios, imunossupressão devido alterações na funcionalidade das células epidérmicas de Langerhans e a degradação do colágeno presente na matriz extracelular dos tecidos conjuntos, responsáveis pela sustentação da pele. Por isso, o aparecimento de sinais de envelhecimento da pele é comum nos casos de constante exposição solar (BOSH *et al.*, 2015; SOUZA; CAMPOS, 2017). A Figura 4.3, apresenta resumidamente os efeitos maléficos ocasionados pela exposição excessiva a radiação UV.

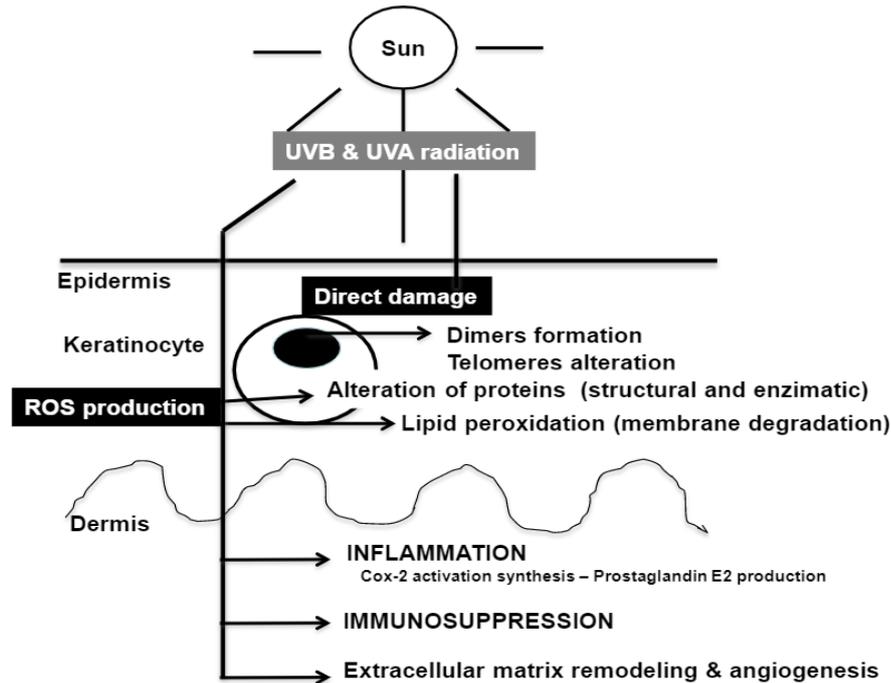


Figura 4.3: Efeitos deletérios à pele decorrente da exposição excessiva a radiação UV.

Fonte: BOSH *et al.*, 2015.

4.3 Fotoproteção

A pele que está em constante exposição ao sol possui, de forma inata, sistemas de defesa contra os efeitos agudos e crônicos que a radiação solar desencadeia. Esses sistemas eficientes, em curto prazo de exposição, conseguem diminuir a penetração da radiação UV, ativar os mecanismos de reparação do DNA e os antioxidantes endógenos (SILVA, 2012; AMBRÓSIO, 2019).

Almeida (2015) propõe que a fotoproteção pode ser alcançada por diversos mecanismos e que os cosméticos podem atuar: (1) promovendo a absorção direta dos raios UV; (2) diminuindo a inflamação; (3) modulando a atividade imunológica; (4) induzindo a apoptose; (5) exercendo ação antioxidante direta, através da supressão dos radicais livres; e (6) em ação indireta, induzindo respostas de sistemas endógenos antioxidantes.

Nesse sentido, o espessamento da pele, devido ao aumento da proliferação de células epidérmicas; a estimulação de substâncias que conseguem absorver a radiação UV, como a melanina e a forma “cis” do ácido urocânico no estrato córneo, respectivamente, por meio da estimulação dos melanócitos e pigmentação da pele e

pela isomerização do ácido urocânico, são barreiras que dificultam a penetração da radiação em níveis mais profundos da pele (AMBRÓSIO, 2019).

Além disso, a ativação de antioxidantes endógenos promove a neutralização de radicais livres (RL), impedindo que essas substâncias altamente instáveis provoquem a desestabilização de biomoléculas e desencadeiem doenças. O sistema antioxidante endógeno é composto principalmente pelas enzimas superóxido-dismutase (SOD), glutatona-peroxidase (GPx) e catalase, além da glutatona, um antioxidante não-enzimático (KHAN, 2018).

Quando a intensidade ou o tempo de exposição à radiação energética são suficientemente grandes, esses sistemas endógenos naturais diminuem sua eficácia, necessitando de outros agentes protetores. Assim, a fotoproteção pode ser considerada uma alternativa profilática e terapêutica contra os efeitos nocivos das radiações (ANDRADE, 2015; AMBRÓSIO, 2019).

Agentes ambientais, como o ozônio (O₃), que influenciam diretamente na quantidade de radiação que chega à Terra, e a utilização de vestimentas e acessórios que proporcionam a proteção física da pele, são itens que promovem a fotoproteção externa. Igualmente, a fotoquimioproteção, obtida por meio do uso de agentes tópicos, é uma das medidas adotadas para melhorar a eficácia na proteção solar (BALOGH et al., 2011; ANDRADE, 2015).

Segundo a RDC nº 30 de 1º de junho de 2012, o protetor solar pode ser considerado como sendo qualquer preparação cosmética com finalidade exclusiva ou principal de proteger contra a radiação ultravioleta, com aplicação na pele ou lábios (BRASIL, 2012).

Desse modo, os filtros solares conseguem absorver, dispersar e/ou refletir a radiação UV e, por conseguinte, interferem em reações químico-biológicas, as quais bloqueiam a formação de ROS, mediadores inflamatórios e fotoexcitação de biomoléculas, diminuindo os danos agudos causados e protegendo, em longo prazo, dos danos degenerativos à pele (BALOGH et al., 2011; SEIXAS, 2014; ANDRADE, 2015). Esses filtros atingem o estado eletrônico de excitação, a partir do qual a energia alcançada pode se dissipar em vibrações moleculares e/ou em forma de calor, por meio de colisões entre as moléculas vizinhas (OLIVEIRA, 2018).

Em geral, os filtros solares são divididos em filtros orgânicos e filtros inorgânicos, os quais apresentam mecanismos de ação diferentes entre si. Além

disso, os filtros solares orgânicos também podem ser classificados de acordo com o comprimento de onda em que são absorvidos (OLIVEIRA, 2018).

Os filtros orgânicos, devido a sua representação estrutural, geralmente compostos por grupos aromáticos conjugados a um grupo carbonila, conseguem absorver os raios UV de alta energia, convertendo-os em uma radiação inócua com baixa energia. Esses raios absorvidos são liberados em forma de calor (Figura 4.4) (OLIVEIRA, 2018).

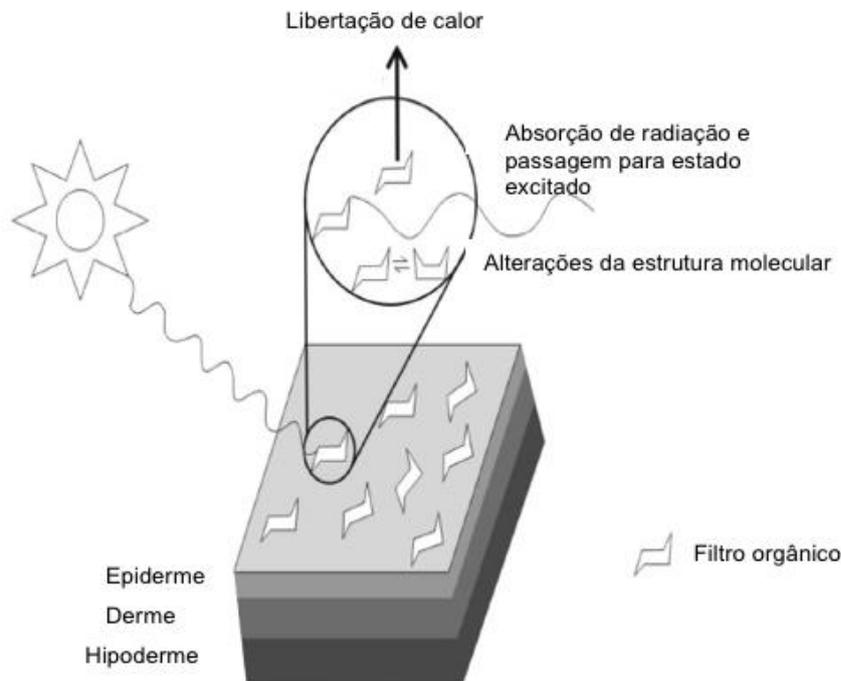


Figura 4.4: Mecanismo de ação de filtros solares orgânicos.

Fonte: AMBRÓSIO, 2019.

O filtro solar pode ter um pico de absorção máxima em comprimento de onda específico. Dessa maneira, temos os cinamatos como sendo a classe de filtros UV-B mais utilizada, devido sua compatibilidade com a maiorias das bases. Já os filtros UV-A, normalmente considerados de amplo espectro, tem como destaque: as benzofenonas (OLIVEIRA, 2018).

Assim, o *4-metoxicinamato de 2-etilhexila* ou *ethylhexylmethoxycinnamate (EHMC)* é um filtro orgânico que pertence a classe dos cinamatos, com absorção máxima de 310 nm. Estruturalmente, os cinamatos possuem na insaturação extra conjugada ao anel aromático e o grupamento carbonila que lhe confere uma maior

distribuição eletrônica. Dessa forma, o deslocamento eletrônico que ocorre, compreende a liberação de elétrons do grupo OCH_3 e o grupo éster fica disponível para aceitar elétrons (Figura 4.5) (SHAATH, 2010; LOPES; CRUZ; BATISTA, 2012)

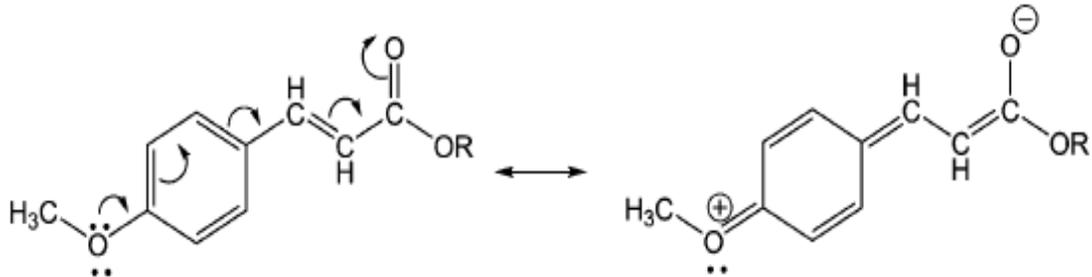


Figura 4.5: Efeito de ressonância da molécula de cinamato.

Fonte: SHAATH, 2010.

Já as benzofenonas são cetonas aromáticas que possuem uma ligação éster ou amida, as quais auxiliam no seu metabolismo *in vivo*. O deslocamento de elétrons dessa classe de filtros é decorrente da liberação de elétrons na posição *orto*, *para* ou ainda em ambas as posições, como mostrado na Figura 4.6, resultando na absorção máxima em dois picos, 286 nm (UV-B) e 324 (UV-A).

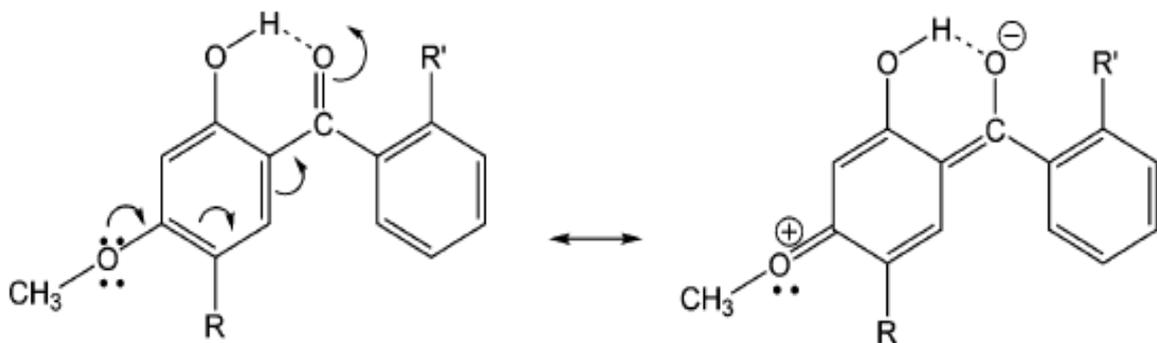


Figura 4.6: Efeito de ressonância da molécula de benzofenona.

Fonte: SHAATH, 2010.

No entanto, apesar de todas essas vantagens, o uso de filtros solares orgânicos sintéticos tem sido bastante discutido no que se refere a sua segurança, principalmente, com a classe das benzofenonas. Estudos ainda avaliam a parcela de responsabilidade desses filtros no desenvolvimento de reações de hipersensibilidade

cutânea, neurotoxicidade e efeitos hormonais deletérios, além dos impactos ambientais produzidos (GARNACHO SAUCEDO; SALIDO VALLEJO; MORENO GIMÉNEZ, 2020).

Com relação aos filtros inorgânicos, esses apresentam como mecanismo de ação a formação um filme que protege a pele por meio da reflexão e dispersão dos raios incididos sobre as partículas que o compõem (Figura 4.7) (BALOGH *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2011; SCHALKA; REIS, 2011; NISHIKAWA, 2012; TEIXEIRA, 2012).

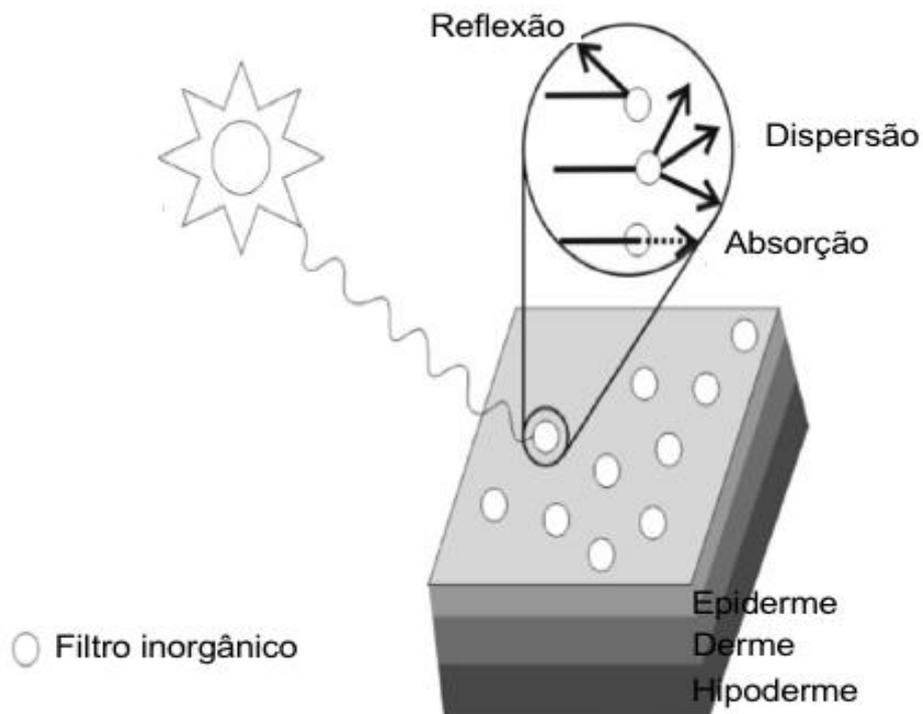


Figura 4.7: Mecanismo de ação de filtros solares inorgânicos.

Fonte: AMBRÓSIO, 2019.

São exemplos de filtros inorgânicos, o dióxido de titânio e o óxido de zinco, os quais normalmente deixam a pele esbranquiçada. Para a melhoria na aceitação dos produtos contendo esses filtros, desenvolveram-se novos materiais de revestimento e reduziu-se o tamanho das partículas para a escala nanométrica, garantindo maior espalhabilidade do produto, aparência atraente e mantendo a segurança e eficácia de proteção (SAUCEDO, 2020).

Ao comparar as estruturas moleculares de alguns filtros solares sintéticos com os compostos secundários de plantas, o estudo de Proserpio, em 1976 permitiu identificar semelhanças que conduziram aos estudos da capacidade fotoprotetora de extratos vegetais (MOURA, 2020).

Assim, para além do melhoramento nos filtros solares existentes quanto a segurança, eficácia, fotoestabilidade e sensorial, tem-se observado a redução na concentração dos filtros solares orgânicos, havendo a substituição ou adição de filtros solares naturais, derivados de plantas e frutos ricos em substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias, como meio de aumentar a eficácia fotoprotetora.

4.4 Uso de antioxidantes em formulações fotoprotetoras

A utilização de substâncias fotoprotetoras baseia-se, normalmente, na presença de grupos cromóforos que têm a capacidade de absorver a luz (BULLA et al., 2015). No entanto, a incorporação de compostos antioxidantes em formulações fotoprotetoras pode ser traduzida por mecanismos distintos e complementares que resultam na ação sinérgica de proteção.

Os filtros fotoprotetores atuam por meio da dispersão, reflexão e absorção da radiação UV, diminuindo a quantidade de radiação que atinge a superfície da pele. Ao passo que os antioxidantes neutralizam e eliminam as espécies reativas de oxigênio que não tenham sido bloqueadas pelos filtros solares ou pelo sistema antioxidante endógeno (WANG et al., 2011; AMBRÓSIO, 2019).

Os antioxidantes cobrem diferentes classes de compostos que podem interferir com ciclos oxidativos para inibir ou retardar o dano oxidativo de biomoléculas. Estudos dispostos na literatura concluíram que substâncias naturais antioxidantes, presente em plantas e frutos, são capazes de proteger a pele contra os danos solares. Dentre as classes mais estudadas para tal finalidade, destacam-se os compostos fenólicos, principalmente, os estilbenos, os flavonoides e os derivados do ácido hidroxicinâmico (STEVANATO et al., 2013; DIAS, 2017).

Os compostos fenólicos são considerados substâncias antioxidantes capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio a outras moléculas, devido a presença de ligações duplas que promovem o efeito de ressonância, além da

capacidade de quelação de íons de ferro que participam da peroxidação lipídica (STEVANATO et al., 2013; BULLA et al., 2015; CHERIBUM, 2019).

Além disso, devido a presença de cromóforos na estrutura dos polifenóis, essas moléculas têm a capacidade de absorver a radiação UV-Vis. Assim, o comprimento de onda absorvido sofre variação conforme a estrutura molecular entre os compostos fenólicos. Quanto aos espectros de absorção máxima da radiação UV-Vis, os flavonoides estão na faixa de 240-385 nm (banda II) e 300-550 nm (banda I), ou seja, tipicamente eles apresentam o amplo espectro de ação (SILVA, 2015). Na Tabela 4.1 estão listadas a absorção máxima para algumas substâncias fenólicas.

Tabela 4.1: Absorção máxima dos compostos fenólicos na região do UV-Vis.

| | Banda II (nm) | Banda I (nm) |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| Não flavonoides* | | |
| Fenóis simples | 266 - 295 | - |
| Ácidos fenólicos | 235 - 305 | - |
| Ácidos hidroxicianâmicos | 227 – 245, 310 - 332 | - |
| Hidroxicumarinas | 210, 250 – 260, 280 - 303 | 312 - 351 |
| Flavonoides | | |
| Isoflavonas | 245 - 275 | 310 - 330 |
| Flavonas, Biflavonas | 250 - 280 | 310 -350 |
| Flavonols | 250 - 280 | 350 -385 |
| Flavanonas | 275 - 295 | 310 - 330 |
| Chalconas | 240 - 260 | 365 - 390 |
| Auronas | 240 - 270 | 390 - 430 |
| Antocianinas | 265 - 275 | 465 - 560 |

*O solvente usualmente utilizado no ensaio é o metanol, com exceção das antocianinas, que utiliza metanol acidificado. Fonte: SILVA, 2015.

É característico dessas substâncias a presença de anéis fenólicos ligados por hidroxilas. Genericamente, os compostos fenólicos são classificados em: flavonoides e não-flavonoides, conforme Figura 4.8 (SILVA, 2015; DZIAŁO et al., 2016).

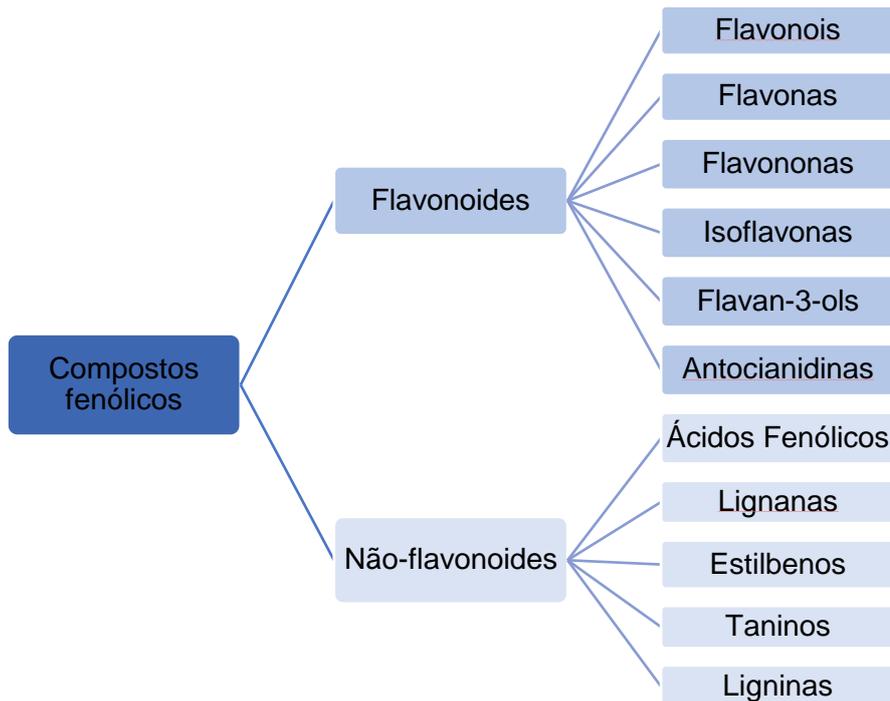


Figura 4.3.4: Classificação dos compostos fenólicos.

Fonte: Adaptada de DZIALO *et al.*, 2016.

Quimicamente, os flavonoides apresentam um núcleo fundamental ($C_6 - C_3 - C_6$), composto por 15 carbonos distribuídos por três anéis (Figura 4.9). A subdivisão dos flavonoides é baseada no carbono de ligação do anel B com o anel C e no padrão de oxidação do anel C. Dentre os grupos de flavonoides destacam-se: flavonóis, flavonas, isoflavonas, Flavan-3-ols e antocianidinas (COSTA, 2018).

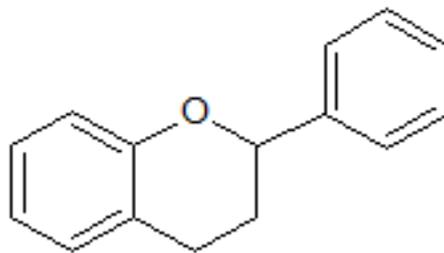


Figura 4.9: Núcleo fundamental dos flavonoides.

Fonte: SIQUEIRA, 2015

Os flavonoides podem ainda estar associados a açúcares, na forma C- ou O-glicosídicos, sendo os açúcares normalmente encontrados: glicose, ramnose, galactose e arabinose ou ainda, dissacarídeos (NASCIMENTO, 2014). Assim, o nível de oxidação e variações no esqueleto carbônico básico, devido a reações de

alquilação, glicosilação ou oligomerização, contribui para a diversidade estrutural dos flavonoides (GUIMARÃES, 2015).

Os compostos não-flavonoides, entre eles os ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos, taninos e ligninas, exibem atividade antioxidante e ação antineoplásica, além da proteção contra os raios UVA (BOSH et al., 2015). A Figura 4.10, apresenta a estrutura química de algumas substâncias fenólicas.

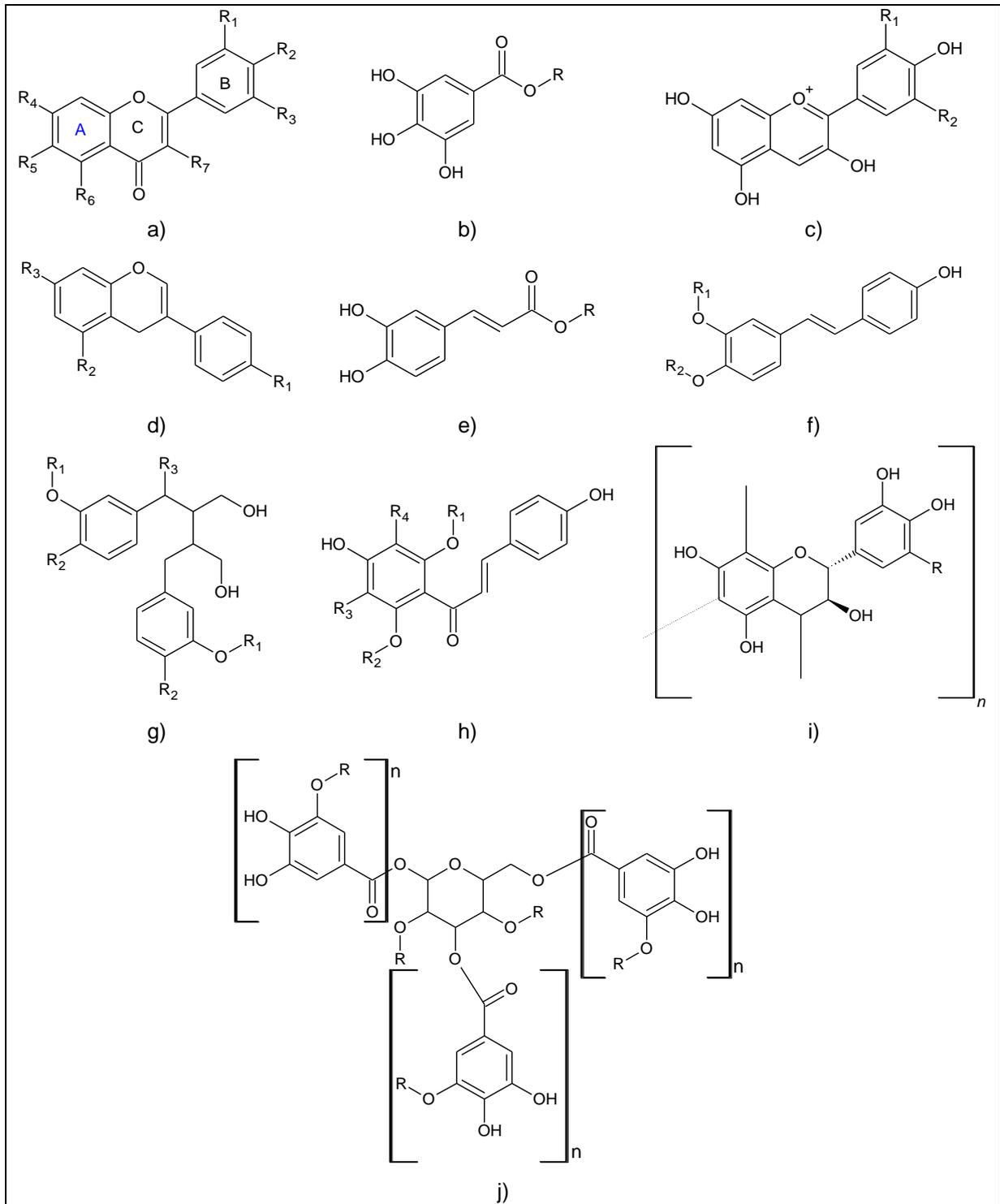
Os taninos, encontrados no chá preto, no chá verde e em outras espécies, desempenham atividade antioxidante importante, participando do processo de captação de radicais livres, inibindo os processos de peroxidação lipídica de ácidos linoleicos, fosfolipídios de membrana e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Além disso, suas ações fotoprotetoras foram observadas em células endoteliais humanas, fibroblastos e queratinócitos (BALOGH, 2011; ANDRADE, 2015; SILVA, 2015; RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018).

Muitos estudos vêm comprovando a importância na incorporação de compostos fenólicos em formulações fotoprotetoras. Cefali e colaboradores (2018) constataram que os extratos de amora e framboesa, ambos com altas concentrações de antocianinas, apresentaram ação fotoprotetora e antioxidante, a partir da determinação dos valores de Fator de Proteção Solar (FPS) e do teste com o radical DPPH.

Segundo a revisão de literatura realizada por Cherubium et al. (2019), os derivados fenólicos como estilbenos, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos, apresentam alta absorção de UV, com fator de proteção solar (FPS) de 7 a 29. Já o resveratrol e a quercetina demonstraram diminuição comprovada na formação de radicais livres e, conseqüentemente, redução de danos ao DNA, ao realizar-se o pré-tratamento de células epidérmicas com extratos ricos dessas substâncias.

Lima e colaboradores (2020) concluíram que algumas plantas da caatinga como por exemplo, *Boerhavia difusa L.* e *Momordica charantia L.*, atuam como filtros solares naturais e podem levar ao incremento do FPS a partir de formulações tópicas. Uma das hipóteses testadas refere-se ao ecossistema em que elas estão inseridas. A Caatinga, devido à alta incidência solar e baixa quantidade de água disponível, estimula a produção de metabólitos secundários, entre eles, os compostos fenólicos. Dessa forma, a alta concentração desses componentes pode favorecer o efeito fotoprotetor.

Figura 4.10: Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos. (a) Flavonois, Flavonas Flavanonas; (b) Ácido benzoico; (c) Antocianidinas; (d) Isoflavonas; (e) Ácido hidroxinâmico; (f) Estilbenos; (g) Lignanas; (h) Chalconas; (j) Taninos condensados.



Fonte: Adaptado de DIAS, 2017.

Várias espécies nativas das Caatinga apresentam elevadas concentrações de fenóis e atividade antioxidante bastante explorada e com potencial atividade fotoprotetora, entre elas encontra-se a *Spondias tuberosa*.

4.5 *Spondias tuberosa*

A família Anacardiaceae, composta por aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, é achada em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GUIMARÃES, 2015). Essa família apresenta-se na forma de árvores ou arbustos e, em geral, possuem frutos comestíveis, como as drupas. Ela é subdividida em cinco tribos (Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae). A tribo Spondiadeae inclui 17 gêneros, entre eles o gênero *Spondias*, o qual possui 18 espécies (SILVA, 2012; GUIMARÃES, 2015; GUEDES, 2018).

A espécie *Spondias tuberosa* Arruda, conhecida popularmente como “umbu” ou “imbu”, é uma espécie endêmica no Nordeste brasileiro, mas, que pode ser encontrada em todo o Sudeste do país (PAODJUEENAS et al., 2019). O “umbuzeiro”, dentro o gênero *Spondias*, é uma das plantas que mais merece destaque, devido a sua importância comercial, social e farmacológica (GUEDES, 2018).

Essa planta é bastante utilizada na suplementação alimentar de animais ruminantes e polinizadores durante a estação de seca, assim como é aproveitada na alimentação humana, devido a sua rica composição nutricional (GUIMARÃES, 2015; MERTENS et al., 2016).

O umbuzeiro é uma árvore de pequeno a médio porte, que mede, aproximadamente 2 - 10 metros de altura. Sua copa é arredondada e ampla, com tronco atrofiado e retorcido de cor cinza, conforme mostra a Figura 4.11 (SIQUEIRA, 2015; PAODJUEENAS et al., 2019). O início do período de floração é quase sempre antes das primeiras chuvas e a frutificação ocorre no período chuvoso (GUIMARÃES, 2015).



Figura 4.11: Árvore de *Spondias tuberosa*.

Fonte: A autoria própria, 2020.

Essa planta se adaptou a escassez de água, característico da Caatinga, graças ao desenvolvimento de xilopódios, tubérculos lenhosos nos quais são armazenados água e nutrientes que possibilitam o brotamento de novos ramos durante o período de seca. Essas estruturas também são comestíveis, sendo processadas e transformadas em conservas tipo *picles* (PAODJUENAS et al., 2019).

O fruto dessa planta, o umbu, apresenta-se na forma de drupas, redondas ou oblongas, com 2 a 4 cm de diâmetro, 10 a 20 g de massa, superfície lisa ou com algumas protuberâncias distais, conforme mostrado na Figura 4.12.



Figura 4.12: Frutos em diferentes fases de maturação.

Fonte: A autoria própria, 2020.

O epicarpo é de coloração variável, dependendo da fase de maturação, apresentando cor verde a amarela. O mesocarpo é branco-esverdeado, mole, succulento e de sabor agridoce. E o endocarpo, estrutura branca que envolve a semente. Já a semente é resistente, rica em gordura e proteínas, utilizada para produção de óleos e margarinas (Figura 4.13) (OMENA, 2012; SIQUEIRA, 2015; PAODJUENAS et al., 2019).

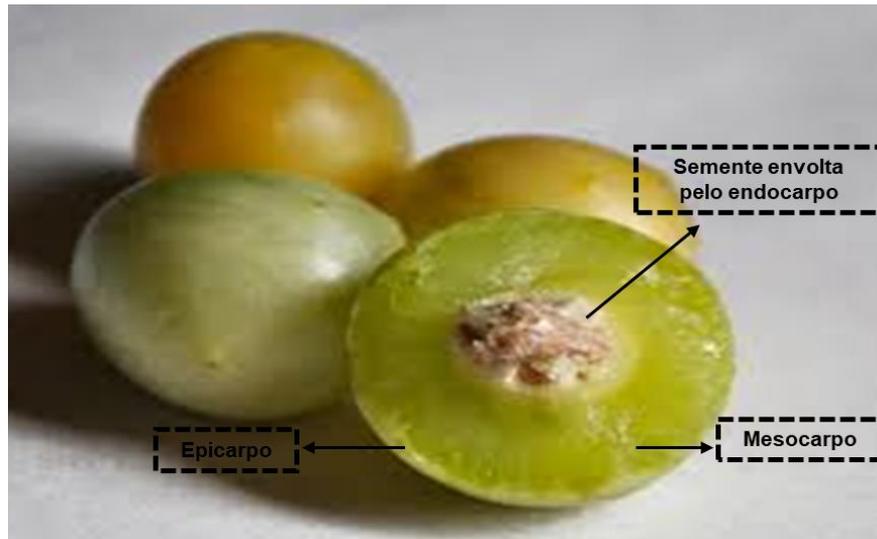


Figura 4.13: Estruturas internas do umbu.

Fonte: Adaptado de DIAS, 2017.

O emprego do umbu na medicina tradicional é muito variado e depende das diversas partes da planta que é utilizada. As cascas e entrecasas do tronco são popularmente usadas no tratamento do colesterol alto, dor no estômago, herpes labial, afecções uterinas e congestão (LINS-NETO *et al.*, 2010). As folhas apresentam atividade anti-inflamatória, antidiarreica e antiparasitária (SIQUEIRA, 2015). Já os frutos são tidos como tônicos devido a quantidade de vitaminas presentes, além da quantidade de compostos fenólicos, que auxiliam na atividade antioxidante (GUEDES, 2018).

Estudos fitoquímicos realizados nesse fruto revelaram a presença de compostos fenólicos, vitamina C, flavonoides, taninos, carotenoides e antocianinas, o que explica a pronunciada atividade antioxidante observada. A partir de análises cromatográficas foram determinadas as presenças de ácido gálico, clorogênico, protocatecuico, p-cumárico, vanílico e ferúlico (NASCIMENTO, 2014; COELHO, 2015).

Guimarães (2015) cita em seu trabalho, com extratos de *S. tuberosa*, que foram identificados um derivado do quinol (2,4,6-trihidroxi-4- (hidroximetil)ciclohexa-2,5-dien-1-ona), um flavonoide glicosado (rutina) e um éster do ácido *p*-cumárico (*trans-p*-cumarato de eicosanila). Assim, pelos compostos encontrados, correlacionam-se as atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e cicatrizante relatadas.

Também na literatura foi descrito um estudo que utilizou extrato metanólico das folhas da *Spondias tuberosa*, no qual observou-se atividade antimicrobiana *in vitro* contra algumas cepas de bactérias gram-negativas e apresentou atividade contra o vírus da dengue tipo 2 no modelo de célula de mosquito *in vitro* (COSTA, 2015; GUIMARÃES, 2015; SIQUEIRA, 2015). Além disso, no trabalho desenvolvido por Barbosa (2016), foram obtidos resultados que apontam o extrato etanólico bruto da casca de *Spondias tuberosa* como agente hepatoprotetor e hipoglicemiante, sendo uma possível alternativa terapêutica para a Diabetes mellitus e doenças associadas.

4.6 Eficácia dos fotoprotetores

As ações biológicas esperadas de um protetor solar podem ser analisadas pela sua capacidade de minimizar eritemas, edemas, riscos de queimaduras e carcinomas de pele. Para isso, em 1978, a *Food and Drug Administration* (FDA) indicou uma relação matemática entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM) da pele protegida, a partir da aplicação de 2 mg/cm² de protetor na pele, e a DEM da pele não protegida. Em ambas as situações, a pele é exposta a uma fonte de energia em quantidade e tipos pré-determinados (FDA, 2019).

Por meio dessa relação matemática, demonstrada na Equação 1, é que o Fator de Proteção Solar pode ser calculado.

$$FPS = \frac{\text{DEM na pele protegida}}{\text{DEM na pele não protegida}} \quad (1)$$

Em que:

DEM = dose mínima de energia capaz de produzir uma primeira vermelhidão perceptível na pele, com bordas bem definidas.

Segundo a disposição da RDC nº 30, de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fotoprotetores devem ter um FPS mínimo de 6,0 e o valor do Fator de Proteção UV-A (FPUVA) deve corresponder a, no mínimo, 1/3 do valor do FPS (BRASIL, 2012). De acordo com a FDA, cada filtro solar adicionado ao produto final deve apresentar um FPS não inferior a 2, sendo que o produto final deve ter um FPS não inferior ao número de filtros solares utilizados multiplicado por 2 (FDA, 2019).

Considerando as normativas em vigor, os valores de FPS descritos nos rótulos de protetores solares são determinados a partir de metodologias *in vivo*. Conforme a metodologia adotada pela FDA ou a *European Cosmetic and Toiletries Association* (COLIPA), cujos métodos são aplicados pela ANVISA, são selecionados grupos de 10 a 20 voluntários, de fototipos I, II e III, de acordo com a classificação de Fitzpatrick, ou seja, pessoas com a cor da pele que variam de branca a morena clara, as quais possuem sensibilidade ao sol. Os voluntários são submetidos a doses definidas e progressivas de radiação em áreas de pele protegida e não protegida pelo protetor teste. A quantidade aplicada na área é de 2 mg/cm² e, após 16 a 24 horas da exposição, é observada a DEM nas duas áreas e o FPS é calculado (COLIPA, 2006; BRASIL, 2012; NASCIMENTO, 2014; FDA, 2019).

Muito embora o método *in vivo* seja eficiente e àquele exigido pelas agências reguladoras para a determinação da capacidade de proteção da pele contra a radiação UV-B, o risco de queimaduras solares graves associado à realização do teste, assim como os aspectos éticos que envolvem a utilização de humanos em testes, têm sido apresentados como limitações desse método. Em contrapartida, o emprego de ensaios *in vitro* vêm sendo cada vez mais aplicados, principalmente, nas fases de triagem de potenciais filtros solares (DIMITROVSKA CVETKOVSKA et al., 2017).

Os métodos *in vitro* são baseados em análises espectroscópicas, nas quais é possível quantificar a energia do espectro UV absorvida por um filme aplicado a um suporte adequado ou uma solução. A espectroscopia UV, possibilita determinar a absorção da radiação em uma amostra, no intervalo de comprimentos de onda na faixa de 200 a 400 nm. A magnitude de absorção varia de acordo com número e do arranjo dos elétrons das moléculas ou íons absorventes, permitindo correlacionar o pico de absorção com os tipos de ligações existentes na espécie estudada (MOTA, 2020).

Os espectrofotômetros são instrumentos que têm a função de registrar dados relacionados às propriedades de absorvância ou transmitância de um material em função do comprimento de onda. De modo geral, eles contêm cinco componentes principais, que são fonte de radiação, monocromador ou seletor de recipientes para conter as soluções (cubetas), detectores e indicadores de sinal, demonstrados na Figura 4.14 (MOTA, 2020).

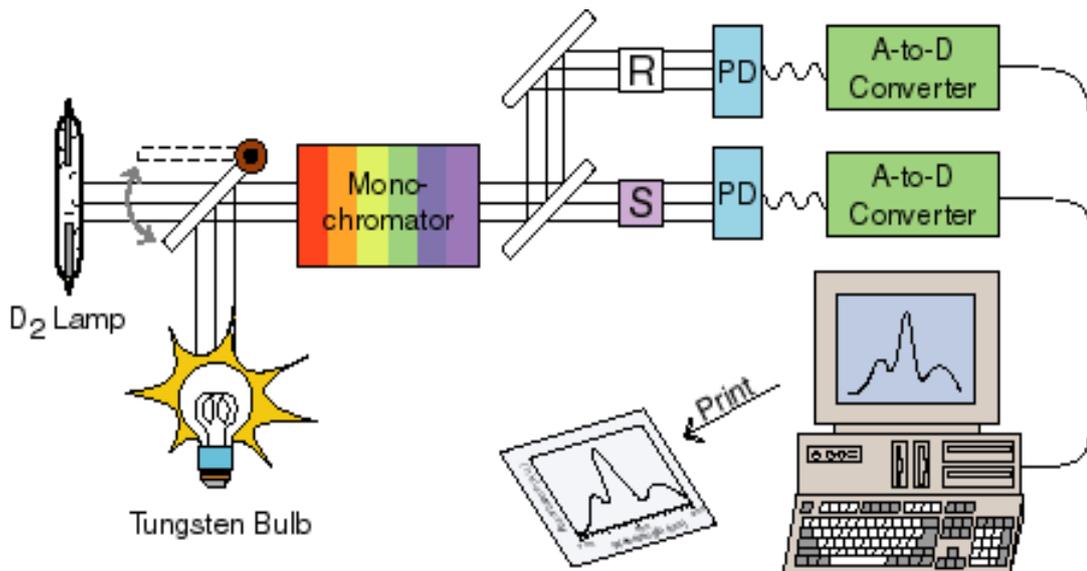


Figura 4.14: Esquema básico do espectrofotômetro

Fonte: <http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absfIr.html>

Nesse sentido, o método desenvolvido por Mansur (1986) é um dos exemplos que utilizam a espectrofotometria para determinar a absorvância molecular, e, assim, determinar o FPS teórico de filtros solares. Essa metodologia mostra-se eficaz, rápida e com boa correlação com os testes *in vivo* e, portanto, é uma das mais empregadas (MANSUR, 1986).

Alternativamente, Diffey e Robson (1989) desenvolveram um método que possibilita o cálculo do FPS teórico, utilizando um espectrofotômetro de refletância difusa, a partir do qual deve ser utilizado uma amostra contendo filtros inorgânicos incorporados aplicados em uma superfície para análise (DIFFEY; ROBSON, 1989).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os aspectos metodológicos que foram adotados nessa pesquisa estão resumidos na Figura 5.1. Para a execução deste trabalho foi realizada uma revisão sistemática de métodos *in vitro* para a avaliação fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos, seguido da coleta e preparo dos frutos para secagem em estufa com circulação de ar. As amostras secas foram maceradas com etanol para extração dos compostos bioativos. Os extratos foram concentrados e determinado o teor de fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante. Posteriormente, foram desenvolvidas e preparadas as bases cosméticas, nas quais foram incorporados os filtros orgânicos sintéticos e/ou os extratos etanólicos do pericarpo do fruto da *Spondias tuberosa*, que foram utilizadas na determinação do fator de proteção solar.

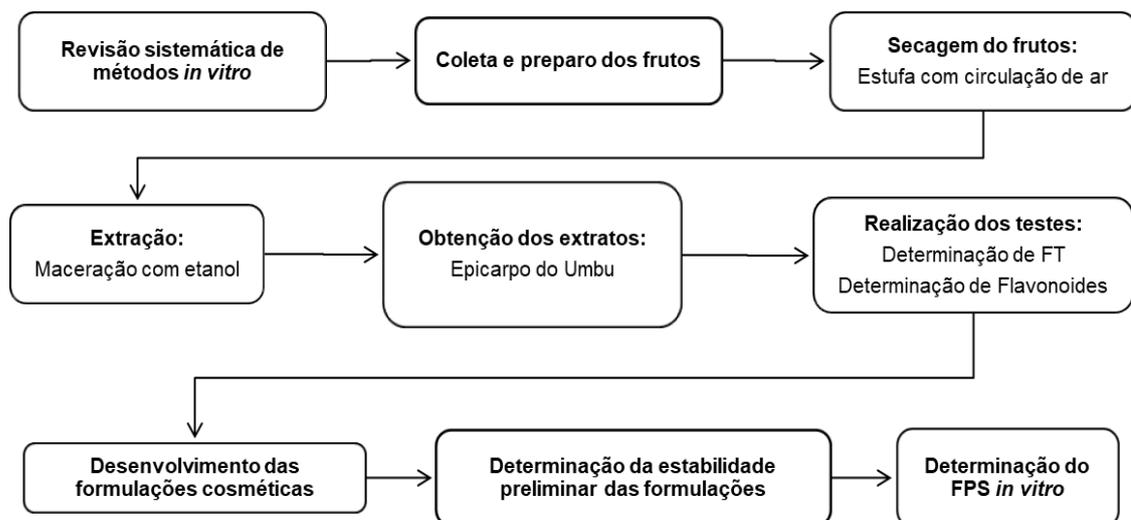


Figura 5.1: Diagrama ilustrativo da metodologia que foi empregada na pesquisa.

Fonte: Autoria própria, 2020.

5.1 Revisão sistemática de métodos *in vitro* para determinação da fotoproteção e atividade antioxidante

Com o intuito de conhecer e avaliar os métodos *in vitro* que podem ser aplicados na determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos

fenólicos foi realizada uma revisão sistemática utilizando a plataforma *Pubmed*, em abril de 2020.

Para alcançar o escopo dessa revisão, foram identificados estudos a partir das palavras-chave “*photoprotection*” e “*phenolics compounds*”, nos títulos e resumos dos documentos escritos em língua portuguesa e inglesa, utilizando diferentes combinações e operadores lógicos (“*And*”, para características exigidas; “*Or*”, para sinônimos ou palavras de sentidos semelhantes).

5.2 Obtenção dos frutos da *Spondias tuberosa*

Os frutos da *S. tuberosa* foram coletados em uma fazenda situada no município de Heliópolis-BA, no mês de fevereiro de 2020, período onde ocorre a maturação dos frutos. A identificação botânica foi feita por meio da comparação com os dados descritos na literatura especializada. Foram selecionados os frutos com tegumento íntegro, verdes e maduros, e sem sinais de contaminação ou deterioração. Esses foram lavados com água corrente e descascados. As cascas foram secas estufa com circulação de ar, em temperatura de 40°C por 72h.

5.3 Preparo dos extratos a partir do epicarpo da *Spondias tuberosa*

As cascas secas passaram por três ciclos de maceração de 48 horas cada, usando etanol absoluto como solvente extrator. Após cada ciclo, o sistema foi filtrado e acrescido mais solvente extrator. No final dos três ciclos, os extratos obtidos foram combinados, formando uma só amostra, a qual foi concentrada em evaporador rotativo a 45 °C, sob vácuo (MOTA *et al.*, 2019).

5.4 Determinação compostos fenólicos totais (TPC)

A concentração de fenólicos totais foi determinada através do método espectrofotométrico baseado na metodologia de Slinkard;Singleton (1977).

Foram preparadas soluções-padrão de ácido gálico nas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50,100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com 10 mL cada, para a construção da curva padrão (Figura 5.2). A partir da equação da reta foi calculada a concentração de fenólicos no

extrato de umbu, expresso em mg equivalente de ácido gálico por g de extrato (GAE g⁻¹).

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato metanólico de umbu (1 mg/mL) foi adicionada em 7,9 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (0,2 mol L⁻¹). A solução obtida foi deixada em repouso por 4 minutos em ambiente escuro. Posteriormente, foram acrescentados 2,25 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi mantida por 20 minutos a 50 °C no banho aquecido. As amostras contendo extrato de umbu e as soluções-padrão de ácido gálico foram submetidas ao mesmo processo descrito. Após isso, procederam-se as leituras das amostras em espectrofotômetro UV-Vis (FEMTO 700 Plus) no comprimento de onda 765 nm (MOTA, 2021).

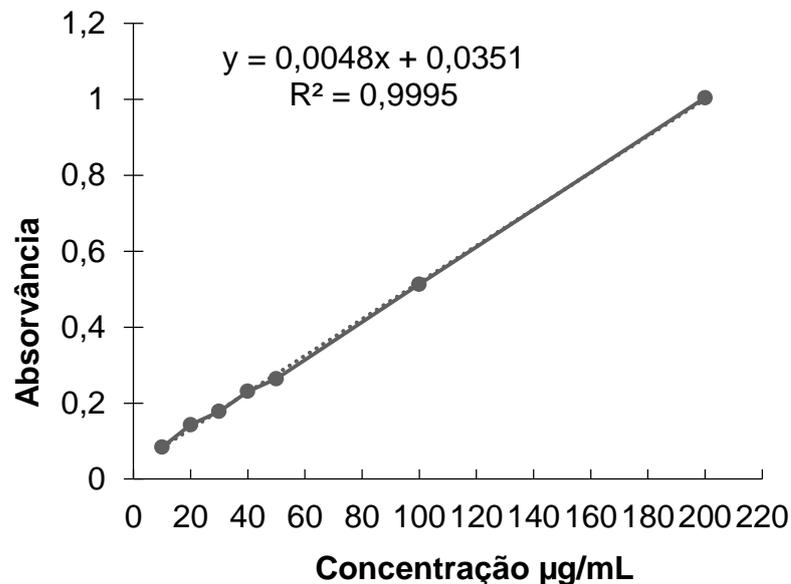


Figura 5.2 :Curva de calibração utilizada para determinação de fenólicos totais baseada nas concentrações de ácido gálico

5.5 Determinação do teor de flavonoides totais

Para a análise do teor de flavonoides totais foi produzida solução contendo 2 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% em metanol e 2mL do extrato do umbu diluído em metanol na concentração de 1 mg/mL.

Após 60 minutos no escuro, em temperatura ambiente, procedeu-se com a leitura da absorvância da amostra, em triplicata, em espectrofotômetro UV-Vis

(FEMTO 700 Plus), no comprimento de onda de 420 nm. O branco utilizado para calibração foi uma solução contendo 2 mL de metanol e 2 mL cloreto de alumínio. A concentração de fenólicos totais foi calculada por meio curva de calibração, utilizando padrão de quercetina nas concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 5.3). Os dados foram expressos em mg de equivalente a quercetina por g do extrato seco (QE g^{-1}) (SILVA *et al.* 2016).

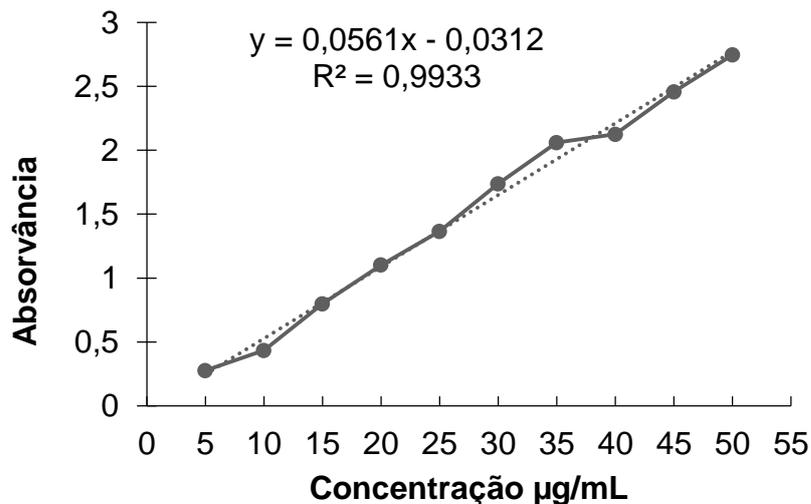


Figura 5.3: Curva de calibração utilizada para determinação de flavonoides totais baseada nas concentrações de quercetina.

5.6 Desenvolvimento de formulações cosméticas

Foram preparadas emulsões cremosas do tipo óleo em água (o/a), adaptada a partir do creme base aniônico descrito no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira 2ª edição (2012) e de acordo com a disponibilidade matérias primas no laboratório. Os dados quantitativos e qualitativos das formulações se encontram descritos na Tabela 5.1.

Para o preparo das emulsões, pesaram-se todos os componentes da Fase B e da Fase A em béqueres diferentes. Ambos foram submetidos ao aquecimento até uma temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$, para fusão dos componentes sólidos. Ainda sob agitação constante, a Fase B foi vertida, lentamente, sobre a Fase A, obtendo-se a emulsão. Depois, procedeu-se a incorporação dos extratos e filtros solares sintéticos às

emulsões (Fase C). As amostras foram acondicionadas em recipientes adequados e identificadas.

Assim, foram produzidas 9 formulações, sendo 3 controles (F1 – F3), 3 contendo o extrato em diferentes concentrações (F4 – F6) e 3 contendo o extrato associado ao filtro solar orgânico sintético *4-metoxicinamato de 2-etilhexila* ou *ethylhexylmethoxycinnamate* (EHMC) (F7- F9).

Tabela5.1 – Planificação qualitativa e quantitativa das formulações tópicas contendo extrato etanólico do epicarpo do umbu.

| COMPONENTES (INCI) | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 | F9 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| % (p/p) | | | | | | | | | |
| Fase A | | | | | | | | | |
| <i>Álcool cetosteárico</i> | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| <i>Miristrato de isopropila</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Butil-hidroxitolueno</i> | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| <i>Propilparabeno</i> | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Fase B | | | | | | | | | |
| <i>Propilenoglicol</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| <i>Lauril sulfato de sódio pó</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Metilparabeno</i> | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| <i>EDTA</i> | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| <i>Água destilada q.s.p.</i> | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Fase C | | | | | | | | | |
| <i>Salicilato de homomentila</i> | - | - | 8 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ethylhexylmethoxycinnamate (EHMC)</i> | - | 5 | - | - | - | - | 5 | 5 | 5 |
| <i>Ext. alcoólico do epicarpo do umbu (EACU)</i> | - | - | - | 0,125 | 0,250 | 0,500 | 0,125 | 0,250 | 0,500 |

Legenda:INCI – *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*(-): Matéria-prima não adicionada.

5.7 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações cosméticas

As formulações tópicas desenvolvidas foram submetidas à avaliação preliminar da estabilidade após um repouso de 24 horas do preparo. Para isso, foram analisadas as características organolépticas antes e depois das amostras serem submetidas a diferentes condições nos testes empregados: estresse térmico e ciclo gelo/degelo, a fim de observar algum sinal de instabilidade nas formulações (BRASIL, 2004).

5.7.1 Análise das características organolépticas

Essa análise tem como objetivo avaliar as características sensoriais das amostras quanto ao aspecto, cor e odor e a homogeneidade das amostras com a finalidade de identificar instabilidade visível após dos ensaios. Dessa forma, as formulações podem ser classificadas conforme demonstrado no Quadro 5.1 (BRASIL, 2008; NISHIKAWA, 2012).

Quadro 5.1: Classificação das formulações quanto as características sensoriais.

| CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS | CLASSIFICAÇÃO |
|--------------------------------|---|
| Aspecto | (IM) para intensamente modificada |
| | (M) para modificada |
| Cor | (LM) para levemente modificada |
| Odor | (N) para normal, sem alterações quanto ao aspecto |

Para a avaliação das formulações após os testes preliminares, foram consideradas Levemente Modificadas (LM) as formulações que apresentaram leve separação de fases. Enquanto que as formulações que apresentaram separação total de fases foram classificadas como Modificada (M) e, aquelas que apresentaram além da separação total de fases, alterações sensoriais e na viscosidade, foram consideradas como Intensamente Modificada (IM).

5.7.2 Teste do estresse térmico

Foram pesados 10g de cada formulação e todas foram acondicionadas em frascos de polietileno incolor e colocadas em banho termostaticado. Realizou-se a elevação da temperatura de 10 em 10 °C, iniciando a 40 °C e terminando em 80 °C, mantendo-se por trinta minutos em cada temperatura. A avaliação das características sensoriais foi realizada de acordo com o descrito no Quadro 5.1, após o término do ensaio na temperatura de 80 °C e após as amostras retornarem à temperatura ambiente (NISHIKAWA,2012).

5.7.2 Ciclo gelo/degelo

As amostras que não apresentarem alterações nas características organolépticas no teste de estresse térmico foram, posteriormente, submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Para isso, foram utilizados ciclos alternados de resfriamento (refrigeradores) e aquecimento (estufas). Os valores adotados para o ciclo foram: ciclos de 24 horas na estufa a 45 ± 2 °C e 24 horas no freezer a -5 ± 2 °C, durante 12 dias (6 ciclos). Após esse período foram avaliadas quanto as características organolépticas e classificadas de acordo com o Quadro 5.1 (BABY, 2007; BRASIL, 2008; NISHIKAWA,2012).

5.8 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro*

O Fator de proteção solar foi determinado de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Mansur e colaboradores (1986). 1g de cada formulação foram diluídas em 5 mL etanol, obtendo uma solução com concentração final de 0,2 mg mL⁻¹. As absorvâncias das soluções preparadas foram determinadas na faixa de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm, sendo feitas três determinações para cada comprimento de onda. Como branco foi adotado o etanol. O cálculo do FPS foi feito por meio da Equação (2) e Tabela 5.2.

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

Em que:

FC = Fator de Correção estimado a partir da amostra que contém 8% de Salicilato de Homomentila.

EE(λ) = Efeito eritematogênico da radiação solar a cada comprimento de onda (λ);

I (λ) = Intensidade da radiação solar a cada comprimento de onda (λ);

Abs (λ) = Leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da amostra a cada comprimento de onda (λ)

Tabela5.2: Ponderação empregada no cálculo do FPS segundo Método de Mansur.

| Comprimento de onda (nm) | EE x I (normalizado) |
|--------------------------|----------------------|
| 290 | 0,0150 |
| 295 | 0,0817 |
| 300 | 0,2874 |
| 305 | 0,3278 |
| 310 | 0,1864 |
| 315 | 0,0839 |
| 320 | 0,0180 |

Fonte: MANSUR, 1986.

5.9 Análise estatística

Para os testes de fenólicos totais e flavonoides totais foram calculados e expressos a média \pm desvio padrão, após análises em triplicata. Na análise da atividade fotoprotetores *in vitro* foi usado software GraphPad Prism 9.2.0[®], no qual foi realizada a análise estatística de variância ANOVA, seguida de teste de Tukey de múltipla variância, com significância de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados deste trabalho foi feita sob a forma de artigos. Eles foram escritos baseado nos objetivos traçados. No cabeçalho do item é informado a situação dos artigos: publicado, aceito, em revisão ou a submeter, até o momento da defesa, e também a revista escolhida para submissão.

O artigo 1 (item 6.1) aborda sobre os trabalhos encontrados na literatura que discutem a atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos, sob a perspectiva de utilização de métodos *in vitro*.

O artigo 2 (item 6.2) traz resultados quanto ao teor de fenólicos e flavonoides totais do extrato alcoólico do epicarpo do fruto da *Spondias tuberosa* e a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) do extrato incorporado à formulação cosmética desenvolvida.

6.1 Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes *in vitro* (Aceito para publicação na Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas)

6.1.1 Introdução

A radiação ultravioleta (UV) representa uma estreita faixa do espectro eletromagnético, entre 200 e 400 nm, sendo dividida em UV-C (100–280 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-A (315-400 nm) (MOTA et al.,2020). A exposição contínua a essa radiação é um dos fatores externos que mais contribui para a geração de radicais livres (RL), os quais, em excesso, provocam a desestabilização de biomoléculas e o desencadeamento de doenças como o câncer (MCDANIEL et al., 2019).

A exposição solar induz ao estresse oxidativo pela alta produção de RL e, posto que os mecanismos antioxidantes endógenos não conseguem suprimir de forma efetiva as ações deletérias dessas espécies reativas, uma estratégia que fornece à pele mecanismos de defesa contra a radiação solar é a utilização de antioxidantes naturais (GREGORIS et al, 2013). Os antioxidantes naturais são

substâncias exógenas que podem atuar de forma sinérgica com os mecanismos endógenos, de maneira a suprimir efetivamente as ações deletérias dos RL, neutralizando essas espécies reativas e protegendo a pele (SILVEIRA et al., 2013).

Sabe-se que o emprego de metabólitos secundários vegetais têm a capacidade de estabilizar os RL. Dentre eles, chama-se a atenção para os compostos fenólicos, por possuírem grupamentos cromóforos em sua estrutura. Estes compostos promovem a absorção da radiação em comprimentos de onda compatíveis aos raios UV, mostrando-se adequados para a composição dos filtros solares (COSTA et al., 2015; NUNES et al., 2018). Os compostos fenólicos, para além da potencialização da proteção da pele contra a radiação UV, possuem também ação antioxidante, anti-inflamatória e imunossupressora (RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018).

Uma estratégia atualmente muito utilizada para ampliar o espectro de ação e aumentar a fotoestabilidade de filtros solares é a utilização de extratos naturais, ricos em compostos fenólicos, devido a sua capacidade de agir contra os radicais livres e absorver os fótons UV (WRÓBLEWSKA et al., 2019). A estrutura química desses compostos permite doação de elétrons ou átomos de hidrogênio à outras moléculas, devido à presença das ligações duplas, que promove a deslocalização mais ampla do elétron não pareado. O efeito de ressonância que ocorre quando a molécula é excitada é tido como um dos motivos que justificam a capacidade antioxidante desses compostos (STEVANATO et al., 2013; BULLA et al., 2015)

Nessa perspectiva, o uso de filtros solares naturais representa a diminuição da concentração de filtros solares sintéticos em formulações fotoprotetoras (SILVA et al., 2016) promovendo redução do risco de reações cutâneas adversas, as quais muitas vezes estão relacionadas às altas concentrações de filtros artificiais (NUNES et al., 2018) redução da formação de subprodutos de fotodegradação, gerados a partir da associação de filtros sintéticos com o intuito de aumentar o Fator de Proteção Solar (FPS) (WRÓBLEWSKA et al., 2019) e, conseqüentemente, a diminuição do impacto ambiental pela menor quantidade de resíduos dos filtros e estabilizadores UV, que podem alcançar o mar e águas subterrâneas (ORLANDA et al., 2015; FERNANDES et al., 2018; HUBNER et al., 2019).

Ao avaliar o desenvolvimento de protetores solares, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência que regula o registro, produção e consumo de cosmético nos EUA, exige a determinação *in vivo* para a avaliação da eficácia de um

filtro solar. Nesse estudo é verificada a dose mínima de energia UV necessária para produzir eritema na pele desprotegida que representa o valor do FPS (FDA, 2019). Entretanto, uma vez que os testes *in vivo* envolvem o uso de animais e humanos e, conseqüentemente, aspectos relativos à ética e à custo operacional elevado, tais experimentos devem ser analisados e discutidos (DIMITROVSKA CVETKOVSKA et al., 2017).

Em alternativa, os testes *in vitro*, os quais empregam a análise instrumental físico-química, são amplamente utilizados para triagem (MANSUR et al., 2016). Os testes *in vitro* têm boa aceitação durante a fase de desenvolvimento do produto, pois apresentam boa correlação com os ensaios *in vivo*, são economicamente viáveis, rápidos, não invasivos, mais seguros e atendem o aspecto ético (POLONINI et al., 2013; KHAN, 2018; WRÓBLEWSKA et al., 2019). Além disso, muitos estudos vêm utilizando metodologias *in vitro* com modelos biológicos, nos quais culturas celulares e bactérias geneticamente modificadas são empregadas com o intuito de prever mecanismos de fotoproteção de inúmeros compostos, os quais frequentemente não podem ser preditos apenas pela análise instrumental (ALMEIDA et al., 2015; BACCARIN et al., 2015; FERNANDES et al., 2018).

Este trabalho buscou, por meio de uma revisão sistemática da literatura, analisar os métodos *in vitro*, instrumentais ou modelos biológicos, empregados para determinar a atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos e dessa forma, contribuir com o processo de escolha de cada método.

6.1.2 Metodologia

Foi realizada uma pesquisa na base de dados *Pubmed*, em abril de 2020, de artigos publicados a partir de 2010. A Figura 6.1.1 resume a metodologia empregada na seleção dos artigos, com base nos critérios previamente definidos, visando atender aos objetivos do trabalho. Desse modo, a partir das palavras-chave “*photoprotection*” e “*phenolics compounds*”, foram inclusos trabalhos nos quais abordavam métodos *in vitro* empregados na avaliação de compostos fenólicos presentes, ou isolados, em extratos de plantas, frutos e líquens. Sendo excluídos, dados de patentes, estudos de caso, revisões bibliográficas, estudo clínico e trabalhos que utilizassem apenas métodos *in vivo*.

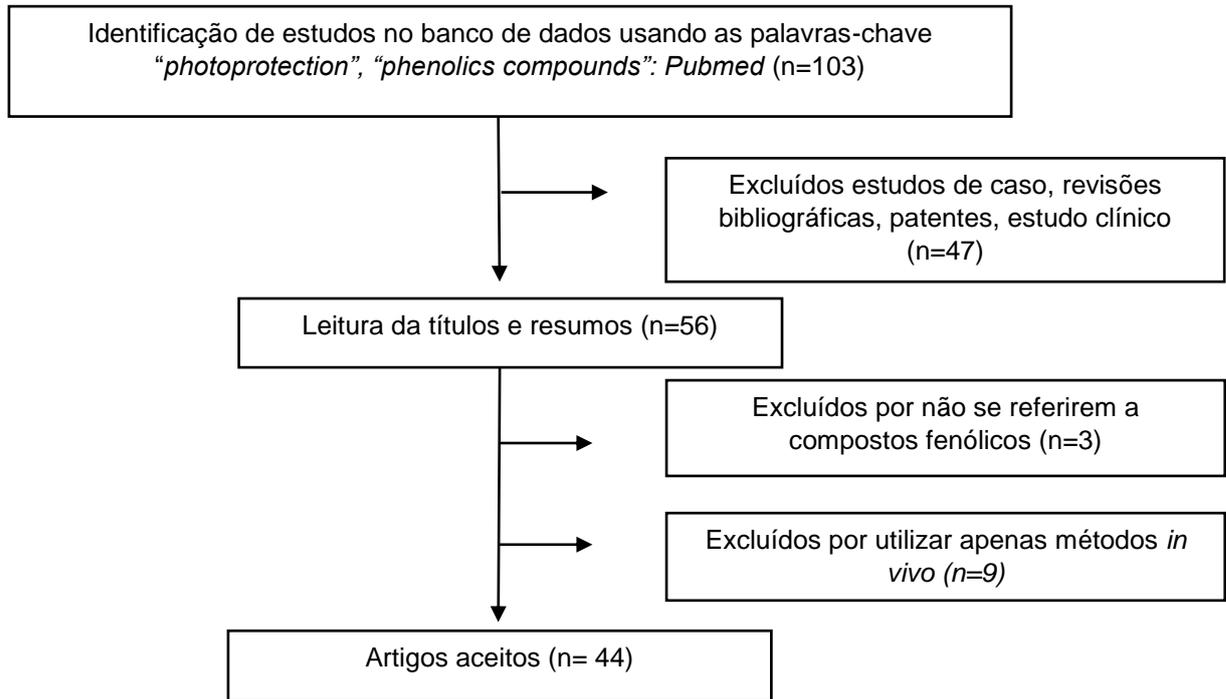


Figura 6.1.1: Metodologia aplicada na seleção dos artigos.

6.1.3 Avaliação da ação fotoprotetora: métodos *in vitro* instrumentais e biológicos

A proteção da pele contra os raios UV é sem dúvida necessária para minimizar o aparecimento de doenças. Em geral, os filtros solares são classificados em filtros orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos, devido à sua estrutura química, agem através de um mecanismo químico, absorvendo os raios UV de alta energia, convertendo-os em uma radiação de baixa energia. Já os inorgânicos, agem pela formação de uma barreira física que protegem a pele através da reflexão e/ou dispersão dos raios que incidem sobre as partículas, fazendo com que estes voltem ou se dispersem (NGOC et al., 2019).

Assim, predominantemente, a eficácia dos filtros solares é avaliada a partir da determinação do FPS e, também, pelo Escurecimento Persistente do Pigmento (PPD) *in vivo* (POLONINI et al., 2013). Entretanto, a utilização de métodos instrumentais como metodologia *in vitro*, a exemplo da espectrofotometria, é bastante comum na triagem de filtros solares para o desenvolvimento de novos produtos (CVETKOVSKA et al., 2017).

A espectrofotometria de absorção molecular, na região do UV ou visível, baseia-se na capacidade que algumas substâncias têm de absorver luz e, portanto, consegue determinar a absorvidade de moléculas orgânicas, quando uma luz é incidida. Segundo a Lei de Lambert-Beer, a capacidade de absorção da luz é proporcional a concentração das moléculas e da espessura do meio atravessado, sendo a transmitância inversamente proporcional a absorvância (MANSUNR et al., 1986). A partir desses princípios são calculados os valores de absorvância e transmitância de filtros solares e, posteriormente, o FPS teórico.

Dentre os métodos espectrofotométricos empregados para a determinação do FPS, o estudo de Mansur e colaboradores (1986) mostra-se um dos mais utilizados, devido a simplificação e rapidez no cálculo do fator de proteção. A partir desse trabalho foi proposta a fórmula apresentado na Equação 1, que se baseia na construção de uma curva de absorção de filtros solares dentro do espectro da radiação ultravioleta. Nessa proposta, multiplica-se os valores de absorvância dentro do espectro de 290 a 320 nm, com aumento de 5 em 5 nm, e o somatório do efeito eritematígeno final é multiplicado pelo fator de correção (FC) padrão 10, obtido a partir da determinação do FPS de um creme contendo 8% de homosalato (HMS), que é padronizado internacionalmente como valor de FPS 4. Validando esse método, no trabalho de Mota e colaboradores (2019), foi observado que a alteração do veículo utilizado promove alteração no valor do fator de correção. Assim, utilizando uma amostra padronizada de HMS a 8%, foi obtido o FC de 10,24.

$$FPS = FC + \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (1)$$

Em que:

FC = Fator de Correção (= 10), estimado a partir da amostra que contém 8% de Salicilato de Homomentila (homosalate);

EE(λ) = Efeito eritematígeno da radiação solar a cada comprimento de onda (λ);

I (λ) = Intensidade da radiação solar a cada comprimento de onda (λ);

Abs (λ) = Leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da amostra a cada comprimento de onda (λ).

Ainda, no que se refere a metodologias instrumentais, Diffey e Robson (1989) propuseram um método baseado em medições espectrofotométricas, o qual considera o espectro de transmitância. Para isso é aplicado o protetor solar em camada fina e homogênea em uma fita de Transpore[®], na faixa de 290 a 400 nm.

Desse modo, aspectos como espalhamento, espessura e homogeneidade do protetor solar na placa e experiência do analista são fatores críticos que alteram os resultados do FPS. Corroborando essa metodologia, Cvetkovska et al. (2017) realizaram um estudo que utilizou, além das fitas de Transpore[®] (Método 1), placas de polimetilmetacrilato (PMMA) (Método 2), como suporte para aplicação de uma quantidade de protetores solares comerciais, em diferentes viscosidade, valores de FPS e pressões de aplicação do produto. Ambos os métodos forneceram resultados reprodutíveis e ótima correlação *in vivo*.

A fórmula demonstrada na Equação 2 foi utilizada por Cvetkovska et al. (2017) baseado no trabalho de Diffey e Robson (1989), para calcular o valor de FPS e poder comparar os resultados *in vitro* com o método *in vivo* e estabelecer a correção entres ambos.

$$FPS = \frac{\int_{\lambda=290 \text{ nm}}^{\lambda=400 \text{ nm}} E(\lambda)I(\lambda)d(\lambda)}{\int_{\lambda=290 \text{ nm}}^{\lambda=290 \text{ nm}} E(\lambda)I(\lambda)10^{-A}d(\lambda)} \quad (2)$$

Em que:

$E(\lambda)$ = espectro de ação do eritema no comprimento de onda λ .

$I(\lambda)$ = irradiância espectral recebida da fonte de UV no comprimento de onda λ .

$A(\lambda)$ = absorvância monocromática da camada de produto de teste no comprimento de onda λ

$d(\lambda)$ = passo do comprimento de onda (1 nm).

Além do FPS, outro parâmetro *in vitro* que pode ser analisado é o comprimento de onda crítico ($c\lambda$), o qual determina o espectro de ação do produto fotoprotetor na faixa de comprimento de onda de 290 a 400 nm (WRÓBLEWSKA et al, 2019). Esse é o comprimento de onda em que a integral da área sob o espectro de absorção da amostra atinge 90% da absorção total (POLONINI et al., 2013). O FDA considera esse parâmetro como instrumento para a avaliação da proteção UV-A e determina que para ser considerado protetor solar de amplo espectro o $c\lambda$ mínimo seja de 370 nm (WRÓBLEWSKA et al, 2019).

Segundo o estudo realizado por Polanini et al. (2013) o fator de proteção UV-A (FPUV-A) foi obtido a partir da utilização dos resultados do seu FPS, pela técnica de transmitância difusa *in vitro*, por meio do cálculo da dose de irradiação (D), obtendo o PPD e a FPUV-A teóricos, calculado pela Equação 3. Além disso, os pesquisadores ainda determinaram o $c\lambda$ e a relação UV-A/UV-B.

$$FPUV-A = \frac{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) X d\lambda}{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) X I(\lambda) X 10^{-A(\lambda)X C} X d\lambda} \quad (3)$$

Em que:

$P(\lambda)$ é o espectro de ação PPD.

$A(\lambda)$ é a absorvância monocromática média do produto de teste.

Como mostrado, a espectrofotometria apresenta-se como uma técnica bastante empregada para a determinação da fotoproteção e seus parâmetros. Dentre os artigos analisados, cerca de 82% utilizaram ensaios instrumentais, sendo que 69% seguiram a metodologia proposta por Mansur *et al.* (1986) e 31% basearam-se no método de Diffey e Robson (1989). Essa ferramenta representou excelente ganho na obtenção dos valores de FPS de filtros solares, em razão da sua rapidez e simplicidade de execução, além da boa correlação dos resultados com testes *in vivo* (HUPEL *et al.*, 2011; CVETKOVSKA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018) e, ainda, pela possibilidade de utilização de solventes não tóxicos, seguros para os operadores, reforçando a importância da química analítica verde (CARDOSO, *et al.*, 2020).

Entretanto, não podemos deixar de pontuar as limitações dos métodos espectrofotométricos, principalmente, aquelas relacionadas à fatores extrínsecos. Esses fatores estão associados aos diferentes solventes nos quais os filtros solares são dissolvidos, à combinação e concentração dos filtros solares ativos, à interação do veículo com os componentes da formulação, ao pH e propriedades reológicas, ao tipo de espectrofotômetro utilizado e a rugosidade do substrato (RUANO *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2018).

O emprego de métodos biológicos, principalmente, de culturas de células dérmicas humanas ou de modelo murino, surge como uma proposta que vem sendo cada vez mais explorada. Esses métodos ampliam o olhar sobre os danos causados à pele e como as substâncias naturais podem contribuir nesse processo (SCHUCH *et al.*, 2014). Dentre os trabalhos analisados, 32% utilizaram os métodos biológicos *in vitro* para avaliar a atividade fotoprotetora (POLONINI *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2015; BACCARIN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; SKROVANKOVA *et al.*, 2015; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2016; BACCARIN *et al.*, 2017; GASPARRINI *et al.*, 2017; BALDIVIA *et al.*, 2018; BATISTA *et al.*, 2018; KOSTYUK *et al.*, 2018; LEFAHAL *et al.*,

2018; NUNES et al., 2018; HUBNER et al., 2019; NGOC et al., 2019; SMERILLI et al., 2019), sendo que 7 desses trabalhos utilizaram tanto os métodos instrumentais quanto os métodos biológicos para essa finalidade (SKROVANKOVA et al., 2015; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2016; BALDIVIA et al., 2018; FERNANDES et al., 2018; SILVA et al., 2019; SMERILLI et al., 2019).

Os ensaios biológicos empregados, categorizados na Tabela 1, possibilitam determinar a viabilidade celular, fototoxicidade, genotoxicidade e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, a partir da exposição de células a diferentes doses de radiação UV, por um determinado período (LEFAHAL et al., 2018; RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018).

O estudo desenvolvido por Almeida e colaboradores (2015) demonstrou a potencial atividade fotoprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Castanea sativa*, devido a sua capacidade antioxidante direta e indireta, que ativa o sistema antioxidante endógeno. Para isso, foi realizado o ensaio com o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e o corante azul de tripano para avaliar a viabilidade celular. A ação protetora do extrato foi calculada a partir da contagem de células viáveis após exposição aos raios UV-A. A avaliação do dano ao DNA foi observada a partir do número de micronúcleos formados quando as células eram expostas à radiação e também pela quantificação da proteína NRF2 e de genes que codificam a expressão de enzimas que protegem o corpo de ROS intracelulares.

Bacarin *et al.* (2017) utilizou uma outra metodologia para avaliar a extensão de danos ao DNA celular. O teste Cometa consiste em eletroforese em gel de célula única, na qual as células, após serem expostas à radiação UV, são lisadas, para exposição do material genético, e incubadas em solução tampão alcalina para que haja o desenrolamento do DNA e a observação de suas zonas de quebra, a partir da utilização de soluções fluorescentes. É determinada, posteriormente, a porcentagem de DNA em cauda, demonstrando a capacidade de fotoreparo do extrato teste.

Ainda sobre a avaliação dos danos ao DNA, Hu e coautores (2015) observaram a capacidade de fotoreparo dos oxyresveratrol e kuwanon O, isolados das raízes de *Morus australis*. Nesse estudo foi constatado que o tratamento prévio com ambos compostos fenólicos, em queratinócitos epidérmicos humanos, conseguiram diminuir os níveis de CPDs e 8-OHdG, reduzindo a oxidação que o DNA sofre quando exposto a radiação UV, resultando na proteção do material

genético dessas células. A quantificação desses compostos danosos ao DNA foi realizada por imunensaio enzimático.

Inúmeras metodologias podem ser utilizadas para a determinação da atividade antioxidante de extratos, utilizando cultura de células que sofreram irradiação UV. Hu e colaboradores (2015) utilizaram o peróxido de hidrogênio como indutor de ROS e a quantificação de nitrosamina, formada quando queratinócitos são expostos a radiação UVA, para a avaliação a atividade fotoprotetora. Nos trabalhos de Svobodová *et al.* (2018) e Baldívia *et al* (2018), foi empregado o 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), indicador da formação de ROS. Também foi quantificado, por espectrofotometria, o nível de glutathione intracelular a partir da reação com ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico (DTNB) (RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ *et al*, 2018).

Os métodos biológicos descritos conseguiram avaliar a capacidade dos ativos em proteger as células e o DNA contra a radiação UV (BACCARIN *et al.*, 2015; BATISTA *et al.*, 2018). Além disso, possibilitaram a elucidação do mecanismo de proteção e a influência que ROS possuem nos efeitos deletérios para as estruturas celulares (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Entretanto, o desenvolvimento e validação de bioensaios envolve diversos desafios, uma vez que ele visa demonstrar respostas de organismos vivos, a partir de técnicas *in vitro*. Dessa forma, para garantir a reprodutibilidade, precisão e acurácia é necessário conhecer, detalhadamente, o mecanismo que envolve e seu alvo de estudo, para estabelecer os pontos críticos que devem ser avaliados e controlados no decorrer do processo. Por esse motivo, características como: manutenção da viabilidade da cultura celular, reagentes utilizados, sensibilidade das técnicas, que envolvem comumente sinais colorimétricos, luminescentes ou fluorimétricos, devem ser constantemente analisadas (CAMACHO-SANDOVAL *et al.*, 2018).

6.1.4 Métodos *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante

A exposição à radiação solar é responsável pela formação de RL. A interação entre os raios UV e espécies endógenas cromóforas como ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos, porfirinas, heme entre outras, geram moléculas

instáveis e extremamente deletérias como os ROS e espécies reativas de nitrogênio (RON)(RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018).A Figura 6.1.2 demonstra como ocorre a formação, por exemplo, dos ROS.

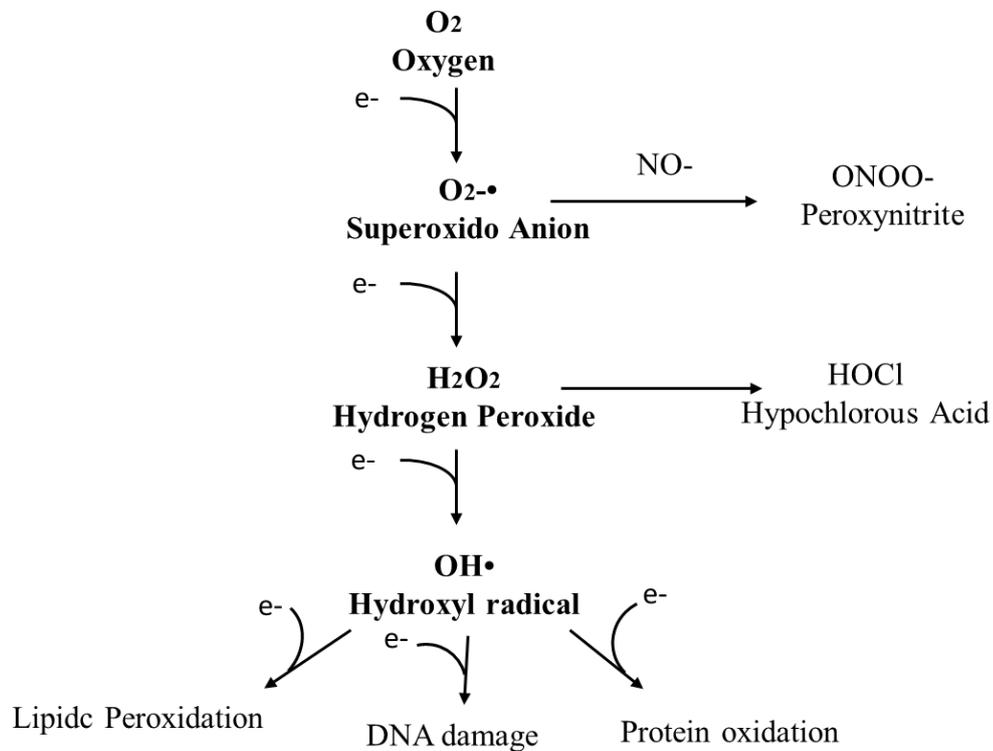


Figura 6.1.2: Geração de espécies reativas de oxigênio

Fonte: Adaptado do trabalho CHEN; HU; WANG, 2012.

O acúmulo dos RL provoca degradação de biomoléculas, oxidação dos lipídios presentes nas membranas celulares, indução do processo inflamatório, imunossupressão, além de danos extensos ao DNA(ALMEIDA et al., 2015), podendo ocasionar queimaduras, envelhecimento precoce e, no pior dos casos, câncer de pele, que, embora tenha causa multifatorial, tem na exposição excessiva à radiação UV um dos fatores agravantes a predisposição dessa patologia(BALDIVIA et al., 2018).

A exposição solar é um dos fatores externos que ocasiona a ativação do sistema de defesa da pele formado, principalmente, por enzimas e antioxidantes endógenos, responsáveis pela proteção. Um dos primeiros eventos que ocorre após a exposição ao sol é a pigmentação da pele. A pigmentação acontece porque há a

ativação melanogênica e de enzimas, como tirosinase e tirosina quinase, as quais promovem a síntese de melanina. Essa proteína é responsável pela coloração e proteção da pele, posto que absorve parte da energia transmitida pelos raios solares e ativa citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam uma cascata de reações no organismo. O processo de pigmentação da pele é especialmente estimulada após a exposição à radiação UVB, por atingir as camadas mais superficiais (SILVEIRA et al., 2013).

Paralelamente à exposição da pele aos raios UV e à formação de RL, há o estabelecimento do estresse oxidativo que propicia a produção e ativação de antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, assim como, antioxidantes endógenos não-enzimáticos, capazes de neutralizar ROS e RON, protegendo as células e outras biomoléculas da oxidação (SILVEIRA et al., 2013). Especialmente a glutathione, antioxidante não-enzimático, consegue inativar os RL pela doação de elétrons e também é um cofator de vários antioxidantes endógenos, tornando-se peça-chave para a eficiência no processo de proteção do organismo (SMERILLI et al., 2019).

A atividade antioxidante pode ser avaliada utilizando metodologias *in vitro* e *in vivo*. Em geral, os testes *in vitro* avaliam a capacidade de inibição de enzimas e a redução de radicais livres (BALDIVIA et al., 2018).

A Figura 6.1.3 apresenta os ensaios *in vitro* que foram realizados em 32 estudos selecionados. Por meio destes trabalhos foi possível identificar os principais testes *in vitro* empregados para a determinação da ação antioxidante em produtos de origem natural, sendo os mais utilizados: radical *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-a,a-diphenyl-bpicrylhydrazyl* (DPPH), empregado em 30 estudos analisados (93,8%). O radical *2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid* (ABTS), empregado em 9 estudos (28,1%).

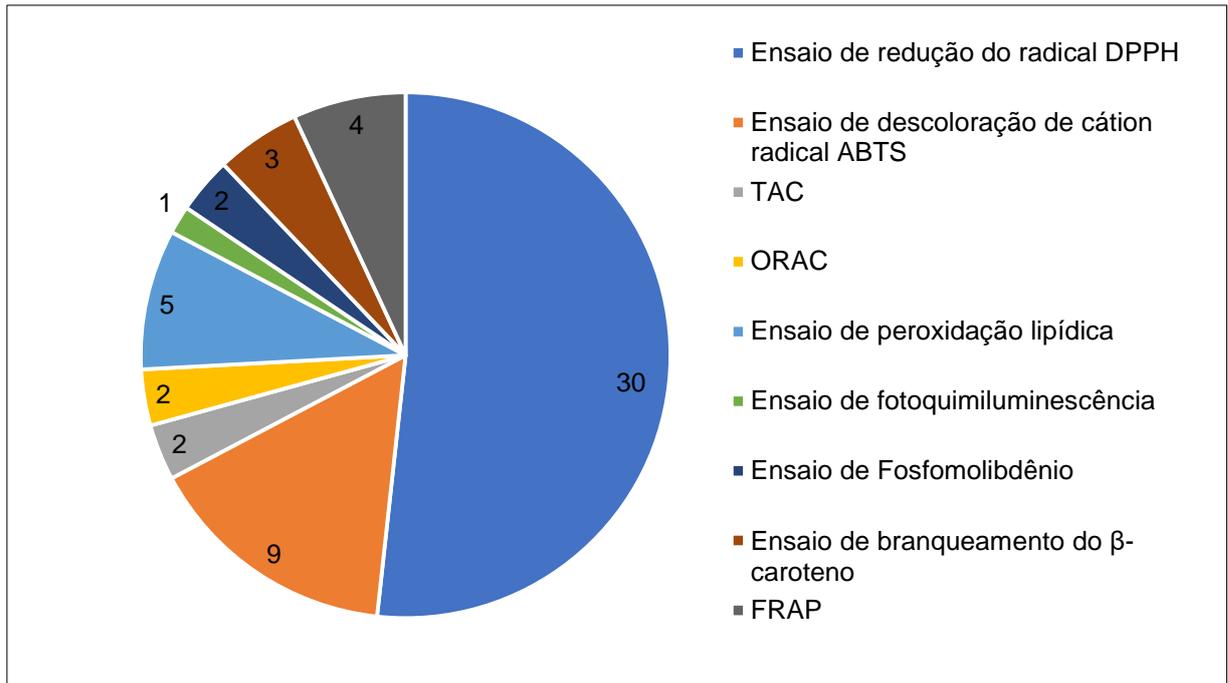


Figura 6.1.3: Frequência dos métodos *in vitro* utilizados em estudos que determinaram a ação antioxidante em produtos de origem natural. DPPH: radical *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-a, a-diphenyl-bpicrylhydrazyl*; ABTS: radical *2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid*; TAC:Ensaio da Capacidade total antioxidante; ORAC: Ensaio da Capacidade de absorção de radical de oxigênio; FRAP: Ensaio do poder redutor-antioxidante férrico.

Dentre os estudos analisados, observou-se que 50% utilizaram dois ou mais métodos associados para a avaliação antioxidante. Em geral, o ensaio do radical DPPH era associado a outro método. De acordo com alguns autores (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; MANSUR et al., 2016), para a garantia de resultados mais fiéis quanto a atividade antioxidante é necessário a utilização de dois ou mais modelos. A comparação entre os resultados obtidos melhora a capacidade de prever a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos.

Quando se discutem os métodos *in vitro* que avaliam a capacidade antioxidante de um composto, podemos encontrar ensaios que se baseiam na transferência de um único elétron (SET) ou ainda, ensaios que conseguem medir a transferência de átomos de hidrogênio (HAT). Dentro de cada grupo, temos diversos ensaios que possuem o mesmo mecanismo de ação, diferindo entre si, quanto a sua cinética de reação, assim como em relação as vantagens e desvantagens que cada um apresenta. O ensaio SET engloba, a determinação do conteúdo fenólico total (TPC), radical livre DPPH, poder antioxidante redutor férrico (FRAP), o ensaio de redução de cobre (CUPRAC) e o radical livre ABTS. Já o ensaio HAT, abrange os testes que aferem a capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), a

oxidação de lipídeos e o parâmetro antioxidante de captura total de radicais (TRAP) (TAN; LIM, 2015).

O ensaio que utiliza o radical DPPH é um método bastante difundido, devido, principalmente, ao seu baixo custo e rapidez, automatização, reprodutibilidade e estabilidade. Nesse método, tem-se a redução do DPPH, na presença de um agente antioxidante, ocasionando uma conversão de cor, do violeta para o amarelo claro, e sua concentração é medida por meio da espectrofotometria (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Deste modo, quanto maior for a intensidade da descoloração, maior a atividade antioxidante do agente testado.

No entanto, algumas problemáticas são encontradas na utilização dessa metodologia. O uso de concentrações variadas de DPPH, incubação, volume de amostra, sistemas de solventes e interferência do pH na determinação da concentração inibitória para atingir 50% do efeito máximo (IC₅₀), além da tendência não linear entre a concentração de antioxidante e DPPH com a eliminação de ROS, são problemas que podem ocorrer. Para isso, é necessário que haja padronização dessas condições para garantir a precisão do teste. De acordo com Tan e Lim(2015), condições que podem contornar algumas dessas problemáticas seriam a utilização de 50 µM de DPPH; ambiente com pouca luz ou ao abrigo da luz; metanol como solvente para amostras menos polares ou metanol tamponado para aquelas mais polares; o padrão recomendado é o ácido ascórbico por ter um cinética de reação similar ao DPPH.

Em estudo feito por Mansur e colaboradores (2016), foi apontado uma outra limitação para o ensaio do DPPH. Esse ensaio, em geral, não é realizado para avaliar a atividade antioxidante de uma formulação, uma vez que, nem todos os componentes da formulação serão completamente solubilizados e, dessa forma, interfeririam nas medições espectrofotométricas. Portanto, seu uso fica mais restrito a análise de compostos isolados.

O método que utiliza o radical ABTS é similar ao teste feito com o DPPH. O ABTS é oxidado por radicais *peroxil* ou outros oxidantes, na presença de peróxido de hidrogênio, gerando um radical intensamente colorido, o qual é determinado por espectrofotometria (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Esse radical apresenta algumas vantagens, a exemplo da solubilidade em solventes aquosos e orgânicos, ampliando a possibilidade de avaliar compostos lipofílicos e hidrofílicos; tem estabilidade em ampla faixa de pH e não é afetado por forças iônicas. Porém, este

método apresenta algumas limitações, entre elas a demora em alcançar o ponto final da reação que ocorre entre o radical e o produto teste, gerando muitas vezes valores da capacidade antioxidante inferiores e falseados; esse método deve ser, quase sempre, associado a outros métodos, pois não consegue quantificar com precisão a capacidade antioxidante sozinho, visto que não considera as taxas de reação (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009; TAN; LIM, 2015).

A capacidade dos compostos fenólicos em reduzir completamente os íons de ferro é utilizada no ensaio *Ferric Reducing-Antioxidant Power* (FRAP), para estimar a atividade antioxidante. Neste ensaio, é usado o complexo amarelo férrico de tripiridiltriazina (Fe (III) -TPTZ), o qual sofre redução, formando o complexo azul ferroso de tripiridiltriazina (Fe (II) -TPTZ). A partir da coloração azul que é observada, emprega-se a espectrofotometria para quantificar o poder de redução. O FRAP tem como vantagens, a simplicidade, rapidez, baixo custo, robustez e a possibilidade de automação. Entretanto, problemas como, a quelação desses complexos quando é utilizado extratos de alimentos e a taxa reacional lenta, a qual resulta em reações incompletas, podem ocorrer e limitar o poder antioxidante de determinada substância (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

O ensaio de fotoquimiluminescência fundamenta-se na geração do radical livre superóxido, a partir da excitação óptica de um fotossensibilizador, como por exemplo o luminol. Esse teste tem como vantagens a não utilização de um agente oxidante e de altas temperaturas para gerar radicais livres, é rápido e bastante sensível. No entanto, existe uma baixa correlação dos seus resultados com outros ensaios como, por exemplo, ORAC e FRAP, além de dificuldade de interpretação dos resultados, por não se ter conhecimento do mecanismo reacional completo (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Esses fatores, podem justificar sua baixa utilização na prática laboratorial, conforme demonstra esta revisão.

O teste de branqueamento do β -caroteno tem como mecanismo a inibição da descoloração de carotenoides, quando exposto a luz ou devido à presença radicais peróxil. Nesse teste o ácido linoleico é oxidado pelos radicais livres presentes no meio, estimulado pelo *2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride* (AAPH) ou peróxido de hidrogênio. Os subprodutos formados iniciam a autooxidação do β -caroteno (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Este é um método rápido e com uma abordagem cinética que elava a precisão na triagem de agentes antioxidantes, porém, a descoloração do β -caroteno pode acontecer por várias vias

e dificultar a interpretação dos resultados. Desse modo, tem-se buscado utilizar o carotenoide crocina, que tem absorvância extremamente forte na faixa do visível e sofre branqueamento apenas sob o ataque *deperoxil* (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Outra forma de avaliar quantitativamente a capacidade antioxidante de um composto natural é o teste do complexo de fosfomolibdênio. Esse método baseia-se na redução do molibdênio, em pH ácido, formando um complexo verde, fosfato de molibdênio, mensurado por espectroscopia UV (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Devido à sua simplicidade e aos reagentes baratos, esse método torna-se uma alternativa para avaliação da capacidade antioxidante total (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

6.1.5 Resultados e discussão

A radiação UV consegue penetrar na pele humana em diferentes proporções, dependendo do seu comprimento de onda e energia. Sabe-se que 95-99% dos raios que atingem a pele são do tipo UV-A, o qual tem maior capacidade de penetração nas células (RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018). A radiação UV-A é capaz de gerar mais estresse oxidativo e causar dez vezes mais a peroxidação lipídica (COSTA et al., 2015), induzir à formação de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) na camada basal e o acúmulo de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), sendo potencialmente capaz de gerar danos genéticos e mutações nas camadas mais profundas da epiderme (HU et al., 2015). É também nessa região energética que os filtros solares demonstram maior instabilidade (COSTA et al., 2015).

Os raios UV-B atingem principalmente as camadas mais superficiais da pele, sua penetração é menor, se comparado aos fótons UV-A, no entanto, são mais deletérios, passíveis de causar, além de queimaduras solares e inflamação, alterações no ciclo celular, provocando o surgimento de câncer (BACCARIN et al., 2015). Quanto aos raios UV-C, em sua grande maioria, são absorvidos pela camada de ozônio e, portanto, não atingem a terra (HU et al., 2015).

Desse modo, de acordo com os estudos *in vitro* selecionados, apresentados nos Quadros 6.1.1 e 6.1.2, foi possível observar que as atividades fotoprotetora e

antioxidante dos compostos fenólicos estão relacionadas com a concentração de fenólicos totais e os tipos de compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais.

Estruturalmente, essas atividades biológicas dos compostos fenólicos, cuja estrutura básica é demonstrada na Figura 6.1.4, relacionam-se com o alto peso molecular e alto grau de hidroxilação no anel aromático, influenciam nos resultados obtidos, pois relacionam-se com a capacidade de doar elétrons e poder antioxidante (BALDIVIA et al., 2018).

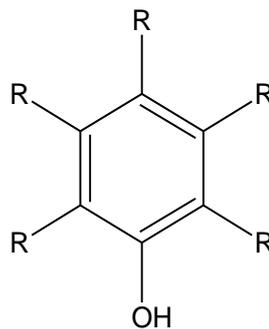


Figura 6.1.4: Estrutura química básica dos compostos fenólicos

Nesse cenário, os extratos naturais elencados no Quadro 6.1.2, com função de proteção solar e antioxidante, apresentaram elevadas concentrações desses compostos (SOUSA et al., 2012; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; FIGUEIREDO et al., 2014; COSTA et al., 2015; SILVA et al., 2016; BACCARIN et al., 2017; BALDISSOROTTO et al., 2018; BALDÍVIA et al., 2018; KHAN et al., 2018; RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019; CEFALI et al., 2019; HUBNER et al., 2019; SMERILLI et al., 2019; WRÓBLEWSKA et al., 2019; LIMA; SOUZA; LIMA, 2020) e, conseqüentemente, maiores valores de FPS. Sendo que entre esses estudos citados, constatou-se que 82% dos extratos, também apresentaram ação antioxidante, associada a fotoproteção.

Quadro 6.1.1: Ensaios biológicos empregados na avaliação da atividade fotoprotetora de extratos vegetais.

| Amostras | Linhagem de células/murino | Tipo/dose de irradiação | Fotoproteção/Viabilidade celular | Genotoxicidade | Outras atividades | Referência |
|--|--|---|--|--|---|-------------------------------------|
| Extrato das folhas de <i>Castanea sativa</i> | Queratinócitos humanos (HaCaT) | UV-A 0.5mJ/cm ² | Ensaio de sal de tetrazólio; Corante de tripano | Ensaio de bloqueio micronúcleo | - | (ALMEIDA et al., 2015) |
| Óleo de semente de <i>Punica granatum</i> | Queratinócitos humanos (HaCaT) Fibroblastos (3T3) | UV-B 90–200 mJ/cm ² | Ensaio de sal de tetrazólio; Ensaio de absorção de vermelho | Ensaio do cometa | - | (BACCARIN et al., 2015) |
| Extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> | Células mononucleares do sangue periférico | - | Ensaio de sal de tetrazólio | - | Nível ROS (H ₂ DCFDA)*; Avaliação da membrana mitocondrial; Atividade da caspase-3 | (BALDIVIA et al., 2018) |
| Oxyresveratrol e kuwanon O a partir <i>Morus australis</i> | Queratinócitos humanos (HaCaT) | UV-A 4.32 J/cm ² | Ensaio <i>CellCounting Kit-8</i> (CCK-8) | Determinação do 8-OHdG; do estresse oxidativo celular; de CPDs; Expressão do p53 | Produção de ROS induzido por H ₂ O ₂ ; Quantificação de nitrosamina. | (HU; CHEN; WANG, 2015) |
| Preparação da silimiarina e silibin | Fibroblastos | UV-A 7,5 - 10 J/cm ² | Ensaio de absorção de vermelho neutro | Ensaio cometa | Nível de ROS (H ₂ DCFDA)*; Nível de GHS intracelular; Atividade da caspase-3 | (RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2018) |
| Extrato do rizoma <i>Rheumrhaponticum</i> | Melanócitos epidérmicos humanos | UV-A e UV-B 75-1200mJ cm ² | Ensaio de sal de tetrazólio Quantificação da α-MSH | - | Nível de IL-1α**, TNF-α*** | (SILVEIRA et al., 2013) |
| Extrato de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum sp.</i> | Cultura de <i>Salmonella. Typhimurium</i> | UV-A 0,7 – 20 mJ / cm ² de | - | - | Photo-Ames test | (FERNANDES et al., 2018) |
| Extrato de <i>Sanionia uncinata</i> | Cultura de <i>Salmonella. Typhimurium</i> | UV-A 0,04 – 6,5 J/cm ² | - | - | Photo-Ames test | (FERNANDES et al., 2017) |
| Extrato metanólico de <i>Fragaria X ananassa</i> , Duch | Fibroblasto humano | UVA 275 kJ / m ² | Células viáveis após exposição das células ao UV-A por 60 min | - | Ensaio de apoptose; Nível de ROS (CellROX® Orange Reagent); Taxa de consumo de oxigênio | (GASPARRINI et al., 2017) |
| <i>Olea europaea</i> L. <i>Polypodium leucotomos</i> Resveratrol | Cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | UV-A 20Jm ⁻² s ⁻¹ UV-B 1,2 Jm ⁻² s ⁻¹ | Células viáveis após exposição das células ao UV por 140 min | - | - | (SILVA et al., 2019) |

| | | | | | | |
|---|--|---|---|--|---|------------------------------|
| Extrato do epicarpo da <i>Garcinia brasiliensis</i> | Fibroblasto humano | UV-B 0,060 – 0,500 J / cm ² | Ensaio de absorção de vermelho neutro | - | Atividade de MPO; Teste GHS; Determinação da IL-1β e TNF-α*** | (FIGUEIREDO et al., 2014) |
| Extrato de <i>Melissa Officinalis</i> , L | Queratinócitos humanos (HaCaT) | UV-B 800 -1200 J / m ² | Ensaio de sal de tetrazólio | Ensaio cometa; Ativação H ₂ AX | - | (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2016) |
| Flavonoides: Apigenina, Naringenina e Pinocembrin | Células renais de embrião humano (HEK-293); Cepas de <i>Escherichia coli</i> (PQ37) | UV-B 10 - 1000 J / m ² | Coloração azul de tripano | Ensaio cometa; | - | (GARCÍA FORERO et al., 2019) |
| Polifenóis isolados | Queratinócitos humanos imortalizados e normais | UVB + UVA (0,1-3 J + 1 – 6 J / cm ²) | PrestoBlue; coloração fluorescente laranja de acridina e etídio brometo | - | - | (KOSTYUK et al., 2018) |

*2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato; ** Alfa-Interleutina-1; ***Fator de necrose tumoral alfa.

Quadro 6.1.2: Relação das amostras analisadas contendo compostos fenólicos que apresentaram ação fotoprotetora e antioxidante a partir de métodos instrumentais utilizados na literatura.

| Amostras | Solvente | Compostos fitoquímicos | Principais efeitos** | Métodos | Referência |
|--|---------------|------------------------------------|----------------------|---|------------------------|
| <i>Nephelium lappaceum</i> L. | Etanol + Água | Flavonoides Taninos | FS | Método de Mansur | (MOTA et al., 2020) |
| <i>Campomanesiaguazumifolia</i> ; <i>Campomanesi axanthocarpa</i> ; <i>Campomanesi adamantium</i> ; <i>Campomanesi sessiliflora</i> . | Etanol + Água | Flavonoides Compostos fenólicos | FS | Método de Diffey e Robson | (CATELAN et al., 2019) |
| <i>Vitis vinifera</i> L. | Etanol + Água | Flavonoides | FS; A | Método de Diffey e Robson; DPPH | (HUBNER et al., 2019) |
| Própolis vermelha | Etanol + Água | Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; DPPH, ABTS | (ALMEIDA et al., 2019) |
| Própolis vermelha | Etanol + Água | Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; DPPH, peroxidação lipídica | (PERMANA et al., 2020) |
| Amora Framboesa | Etanol + Água | Flavonoides | FN; A | Método de Diffey e Robson; DPPH | (CEFALI et al., 2019) |
| <i>Capnophyllum peregrinum</i> (L.) | Metanol | Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; | (LEFAHAL et al., 2018) |

| | | | | | |
|---|--|---|-----------|--|---------------------------------|
| | | Compostos fenólicos | | DPPH, ABTS, FRAP e Teste de Fosfomolibdênio | |
| <i>Moringa oleífera</i> | Etanol Água Metanol | Compostos fenólicos Flavonoides | A | Método de Diffey e Robson; DPPH, ORAC, FRAP e Fotoquimiluminescência | (BALDISSEROTTO et al., 2018) |
| <i>Elaeis guineenses</i> J. | - | Betacaroteno Compostos fenólicos | FN; A | Método de Mansur; DPPH, ABTS | (DAL PRÁ et al., 2017) |
| <i>Schinusterebinthifolius</i> R. | Etanol + Água | Compostos fenólicos | FN; A | Método de Mansur; DPPH, peroxidação lipídica | (BULLA et al., 2015) |
| <i>Marceiataxifolia</i> | Etanol | Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; DPPH | (COSTA et al., 2015) |
| <i>Psidiumguajava</i> | Etanol + Água | Compostos fenólicos Flavonoides | FS; A | Método de Diffey e Robson; DPPH. | (MILANI et al., 2018) |
| <i>Encholiriumspectabile</i> | Etanol Metanol Acetato de etila Hexano Clorofórmio | Compostos fenólicos Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; DPPH, peroxidação lipídica | (OLIVEIRA et al., 2013) |
| <i>EuphorbiatirucallL.</i> | Etanol + Água | Compostos fenólicos Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; DPPH | (ORLANDA, J.F.F, VALE, 2015) |
| <i>Schinopsis brasiliensis</i> E. | Etanol | Compostos fenólicos Flavonoides Taninos | FN; A | Método de Mansur; DPPH, peroxidação lipídica, | (LIMA-SARAIVA et al., 2017) |
| <i>Spondias purpúrea</i> L. | Metanol | Compostos fenólicos Flavonoides | FN; A | Método de Mansur; DPPH | (SILVA et al., 2016) |
| <i>Spondias purpúrea</i> L. | Hexano | Compostos fenólicos Flavonoides | A | Método de Mansur; DPPH, ABTS, FRAP e Teste de Fosfomolibdênio | (ALMEIDA et al., 2017) |
| <i>Baccharisantioquensis</i> | Metanol Acetato de etila | Flavonoides | FN; A | Método de Diffey e Robson; DPPH; peroxidação lipídica | (MEJÍA-GIRALDO et al., 2016) |
| <i>Sorbustorminalis</i> | Metanol | Compostos fenólicos | A | DPPH, ABTS, peroxidação lipídica | (OLSZEWSKA, 2011) |
| <i>Chusqueabambusoides</i> ; <i>Chusqueacapituliflora</i> ; <i>Aulonemiaaristulata</i> ; <i>Chusqueameyeriana</i> ; <i>Merostachys pluriflora</i> . | Etanol + Água | Flavonoides Compostos fenólicos | FS; A | Método de Diffey e Robson; DPPH | (WRÓBLEWSKA et al., 2019) |
| <i>Holomitriopsislaevifolia</i> ; <i>Leucobryum sp.</i> | Água Metanol Etanol | Compostos fenólicos Flavonoides | FN; FS; A | Método de Mansur; DPPH | (FERNANDES et al., 2018) |
| <i>Sanioniauncinata</i> | Etanol Etanol + Água | Compostos fenólicos Flavonoides | FN; FS; A | Método de Mansur; DPPH | (FERNANDES et al., 2017) |

| | | | | | |
|--|---------------|---|--------|--|------------------------------|
| | Metanol | | | | |
| Análogos sintéticos do Resveratrol | - | Polifenóis | FN* | Método de Diffey e Robson | (POLONINI et al., 2013) |
| <i>Boerhaviadiffusa</i> L.; <i>Momordicacharantia</i> L. | Etanol | Compostos fenólicos | FN; A | Método de Mansur; DPPH | (LIMA; SOUSA; LIMA, 2020) |
| <i>Erythrina velutina</i> W. | Etanol + Água | Alcaloides, Flavonoides Terpenos | FN; A | Método de Mansur; DPPH | (RAMOS et al., 2020) |
| <i>Anibacanelilla</i> ; <i>Brosimumacutifolium</i> ; <i>Dalbergia monetária</i> ; <i>Caesalpinia pyramidalis</i> ; <i>Arrabidaea chica</i> ; <i>Aspidospermanitidum</i> | Etanol + Água | Flavonoides | FN*; A | Método de Diffey e Robson; DPPH | (MARTINS et al., 2016) |
| <i>Fragaria X ananassa</i> D. | Metanol | Polifenóis Flavonoides | A | Método de Mansur; ABTS;FRAP; DPPH | (GASPARRINI et al., 2017) |
| Polifenóis isolados | - | Flavonoides Estilbenos Derivados ácido hidroxicinâmico | FN; A | Método de Diffey e Robson; peroxidação lipídica | (STEVANATO et al., 2013) |
| <i>Olea europaea</i> L. <i>Polypodiumleucotomos</i> Resveratrol | - | Polifenóis Flavonoides | FS; A | Método de Diffey e Robson; DPPH | (SILVA et al., 2019) |
| <i>Garcinia brasiliensis</i> | Etanol | Flavonoides Compostos fenólicos | A | DPPH | (FIGUEIREDO et al., 2014) |
| <i>Melissa Officinalis</i> , L | - | Compostos fenólicos | A | ABTS; ORAC | (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2016) |
| Polifenóis isolados | - | Resveratrol Chalcone Ácido trans-Ferulico Silibinin Taxifolin Verbascoside | FN | Método de Mansur | (KOSTYUK et al., 2018) |
| Flavonoides isolados | - | Apigenina Pinocebrin | FN | Método de Mansur | (GARCÍA FORERO et al., 2019) |
| <i>Amburana cearenses</i> ; <i>Aspidosperma cuspa</i> ; <i>Aspidospermapyrifolium</i> ; <i>Crotonsonderianus</i> ; <i>Curatella americana</i> ; <i>Dimorphandra gardneriana</i> ; <i>Lippiamicrophylla</i> ; | Etanol | Compostos fenólicos Flavonoides | FN; A | Método de Diffey e Robson DPPH | (NUNES et al., 2018) |

| | | | | | |
|---|---------------------------------|------------------------------------|-------|---|---|
| <i>Lueheapaniculata</i> | | | | | |
| Subprodutos dos grãos de café | - | Flavonoides Compostos fenólicos | FS | Método de Diffey e Robson | (MARTO et al., 2016) |
| <i>Bauhiniamicrostachya</i> var. <i>massambabensis</i> Vaz | Água + acetona Água + Etanol | Flavonoides | FS | Método de Mansur | (MANSUR et al., 2016) |
| <i>Byrsonimasericea</i> | Etanol Água | Taninos Heterósides digitálicos | - | Método de Mansur | (MEDINA; LOUCHARD; GONÇALVES, 2015) |
| <i>Moringa oleifera</i> | Água | Flavonoides Compostos fenólicos | FN; A | Método de Diffey e Robson DHHP, ORAC, FRAP, fotoquimioluminescência | (BALDISSEROTTO et al., 2018) |

Legenda: Não relatado (n.r.), filtro UV natural (FN), antioxidante (A), fotoproteção sinérgica (FS).

*Apenas o extrato *Dalbergia monetária* apresentou FPS igual ou superior a 6,0.

**O critério utilizado na classificação da atividade fotoprotetora foi baseado no que é preconizado pelo FDA, na qual determina que o FPS 2 como valor mínimo para um filtro solar em produtos acabados (16). Desse modo, os trabalhos que tiveram extratos com FPS igual ou maior que 2, foram considerados Filtros UV naturais (FN), aqueles que tiveram a capacidade de incrementar o FPS na presença de um filtro solar sintético foram considerados como apresentando Fotoproteção Sinérgica (FS).

Dentre os principais grupos de compostos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos e taninos, observa-se em sua estrutura básica, um anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas (STEVANATO et al., 2013) (Figura 6.1.5). Tem sido constantemente levantada a hipótese que a capacidade antioxidante dos fenólicos está diretamente relacionada com o número de hidroxilas livres (KASOTE et al., 2015). Nessa perspectiva, espera-se que compostos com maior capacidade de doar elétrons, apresentem maior atividade antioxidante.

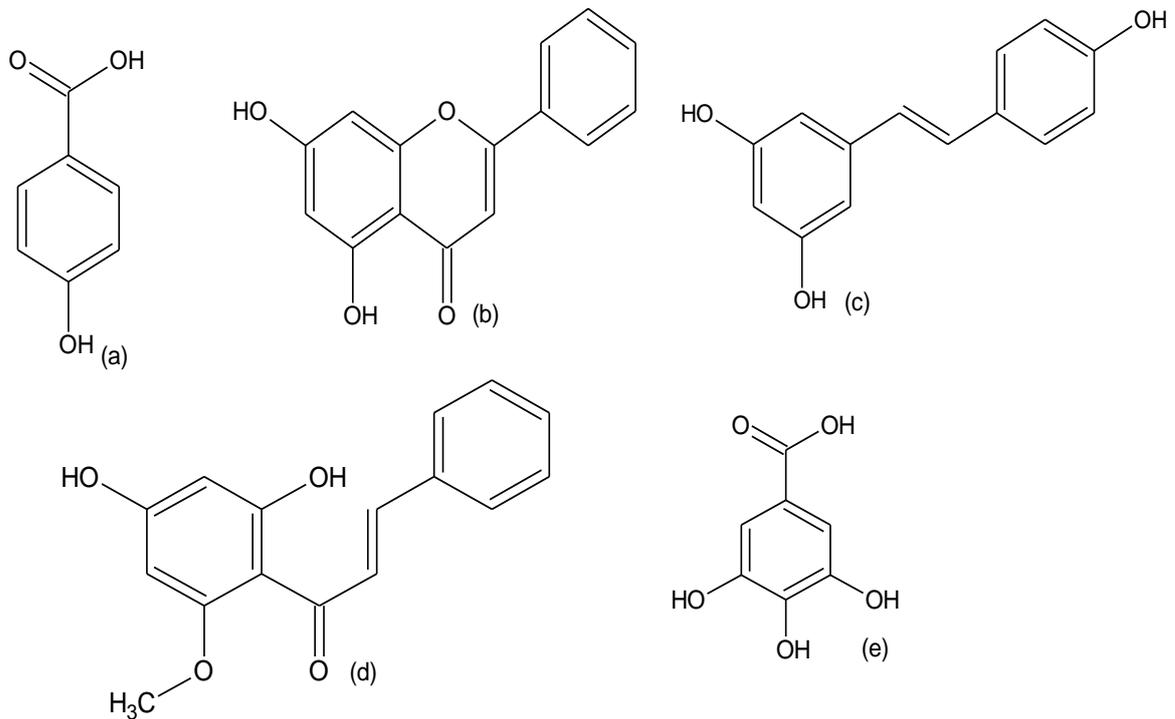


Figura 6.1.5: Estrutura química básica dos ácidos fenólicos (a), flavonoides (b), estilbenos (c), lignanos (d) e taninos (e).

Para Stevanato e coautores (2013), ao avaliar a ação fotoprotetora dos estilbenos, flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico, além da alta capacidade de absorção UV desses compostos, as diferenças na estrutura molecular e na massa, corroboram com diferentes valores de absorvância molar e comprimento de onda máximo, confirmando que essas características devem ser levadas em consideração ao determinar a eficácia da molécula em proteger ou não a pele da luz solar.

Diferentemente, alguns extratos contendo compostos fenólicos em sua composição ou ainda, que apresentaram capacidade de absorção UV, não tiveram atividade fotoprotetora significativa. Foram encontrados 3 trabalhos (8,3%)

(GONÇALVES., 2015; MEDINA; LOUCHARD, 2015; BALDISSOROTTO et al., 2018; RAMOS et al., 2020), nos quais os extratos botânicos não conseguiram alcançar FPS maior que 6,0, tendo baixo potencial como filtros solares naturais. Segundo Ramos e colaboradores (2020), a intensidade de proteção solar que um extrato pode oferecer, depende da quantidade de grupos cromóforos, do intervalo de absorção, da concentração e comprimento de onda. Isso justifica o fato de que nem todos os extratos que possuem compostos fenólicos em sua composição apresentam boa atividade fotoprotetora.

Foi observado que 28% dos trabalhos selecionados apresentaram extratos vegetais com capacidade de incrementar a ação fotoprotetora (STEVANATO et al., 2013; ORLANDA; VALE, 2015; MARTO et al., 2016; CVETKOVSKA et al., 2017; KOSTYUK et al., 2018; MILANI et al., 2018; HUBNER et al., 2019; SMERILLI et al., 2019; MOTA et al., 2020). Esse incremento foi evidenciado a partir do aumento do FPS, quando os extratos foram associados aos filtros solares sintéticos. Isso está relacionado efeito sinérgico de muitos compostos naturais, sendo uma proposta interessante a ser explorada.

Diante da perspectiva de desenvolvimento de produtos voltados à fotoproteção tópica, é possível identificar problemáticas no que diz respeito a garantia da eficácia de um fotoprotetor. Segundo Baldisseretto et al. (2018), embora os filtros solares sejam úteis, eles não conseguem proteger a pele de modo integral e, sugere ainda, que as causas para isso são a incorreta aplicação, a proteção incompleta e a toxicidade de filtros sintéticos. Assim, durante o desenvolvimento do produto fotoprotetor, deve-se atentar a questões relacionadas ao surgimento de sensibilização dérmica, fotoirritação, fotoestabilidade e compatibilidade de filtros solares, que são problemas que afetam diretamente na aceitabilidade do produto por parte do consumidor e, conseqüentemente, sua utilização adequada, além da sua eficiência (BACCARIN et al., 2015; FERNANDES et al., 2018; HUBNER et al., 2019).

Outra questão relevante, refere-se a fotoestabilidade que é de grande importância, pois além de delinear a eficácia da ação requerida, ela mensura, também, a segurança dos filtros solares, posto que a instabilidade reduz a capacidade de fotoproteção e pode gerar compostos de degradação com potencial de toxicidade. Um exemplo é o *ButylMethoxydibenzoylmethane*, filtro orgânico sintético UV-A, considerado instável, pois é degradado em aproximadamente 50 a 90% após 60 minutos de exposição aos raios UV (HUBNER et al., 2019), sofrendo

tautomerização e, em consequência, perdendo sua eficácia, para além de gerar produtos da fotodegradação (WRÓBLEWSKA et al, 2019).

Sendo assim, ao avaliar os métodos empregados na avaliação das atividades de fotoproteção e antioxidante, observa-se métodos tradicionalmente aplicados, os quais apresentam limitações que já foram estabelecidas ao longo do tempo. No entanto, ainda existe a necessidade de estudos que aumentem a performance dessas técnicas, que estabeleçam sua correlação com métodos *in vivo*, pois isso garante maior precisão, exatidão e reprodutibilidade, que validem os resultados encontrado, podendo representar um avanço nos requisitos de registros de produtos fotoprotetores.

Ao passo que, os modelos biológicos podem ser considerados alternativas para presumir *in vitro*, de forma mais detalhada e consistente, o que ocorre a nível biológico, visto que é possível identificar e traçar mecanismos de ação das substâncias. Portanto, a associação de métodos instrumentais e biológicos deve ser estimulada, a fim de aumentar a qualidade das análises realizadas.

6.1.6 Conclusão

A partir dos estudos analisados, conclui-se que os compostos fenólicos, em especial os flavonoides, apresentam relação direta com a fotoproteção, ao passo que, plantas e frutos que possuem elevadas concentrações destes compostos podem promover proteção contra os danos causados pelos raios ultravioleta. A utilização de produtos naturais, ricos em substâncias antioxidantes e fotoprotetoras, revela-se uma estratégia interessante para reduzir a dependência de filtros solares sintéticos.

A utilização de métodos instrumentais, baseados nos princípios da absorvância e transmitância molecular, deve ser bastante encorajada, pois apresenta correlação *in vivo* e permite realizar a triagem de filtros solares, economizando tempo e recursos.

Já a utilização de métodos biológicos é uma alternativa pertinente para avaliar os efeitos mais profundos que a radiação UV pode desencadear na pele humana, uma vez que permite avaliar os danos ao DNA, a viabilidade celular e a inativação ou ativação de enzimas relacionadas ao mecanismo da apoptose entre outros

aspectos, que somados aos dados obtidos com a utilização dos métodos instrumentais de avaliação da fotoproteção e da atividade antioxidante, conseguem prever as atividades biológicas e identificar possíveis compostos naturais que podem ser empregados na indústria cosmética e farmacêutica como filtros solares, antioxidantes e até antitumorais.

Referências

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALMEIDA, I. F. et al. Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 28–34, 2015.
- ALMEIDA, C. L. F. et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- ALMEIDA, W. A. D. S. et al. Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 3, p. 373–380, 2019.
- BACCARIN, T. et al. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 127–136, 2015.
- BACCARIN, T.; LEMOS-SENNA, E. Potential Application of Nanoemulsions for Skin Delivery of Pomegranate Peel Polyphenols. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3307–3314, 2017.
- BALDISSEROTTO, A. et al. *Moringa oleifera* leaf extracts as multifunctional ingredients for “natural and organic” sunscreens and photoprotective preparations. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.
- BALDIVIA, D. DA S. et al. Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *stryphnodendron adstringens*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1–23, 2018.
- BATISTA, C. M. et al. The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, n. January, p. 198–207, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução –

RDC n° 30, de 01 de Junho de 2012. Resolução da Diretoria Colegiada. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil**, 2019.

BULLA, M. K. et al. Evaluation of photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi extract. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 3, p. 558–566, 2015.

CAMACHO-SANDOVAL, R. et al. Development and validation of a bioassay to evaluate binding of adalimumab to cell membrane-anchored TNF α using flow cytometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 235–240, 2018.

CARDOSO, A. DOS S. T. et al. Green analytical methods for isosorbide dinitrate determination by UV spectrophotometry and stability indicating HPLC-PDA. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5153–5161, 2020.

CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, n. November 2018, p. 111500, 2019.

CEFALI, L. C. et al. In vitro antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 539–544, 2019.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013–1024, 2012.

COSTA, S. C. C. et al. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 413–418, 2015.

DAL PRÁ, V. et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from palm pressed fiber with high antioxidant and photoprotective activities. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 362–366, 2017.

DIMITROVSKA CVETKOVSKA, A. et al. Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 3, p. 310–319, 2017.

DZIAŁO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

FERNANDES, A. S. et al. Protection against UV-induced toxicity and lack of mutagenicity of Antarctic *Sanionia uncinata*. **Toxicology**, v. 376, p. 126–136, 2017.

FERNANDES, A. S. et al. Protection against UV-induced oxidative stress and DNA damage by Amazon moss extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 331–341, 2018.

FIGUEIREDO, S. A. et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65–73, 2014.

GARCÍA FORERO, A. et al. Photoprotective and Antigenotoxic Effects of the Flavonoids Apigenin, Naringenin and Pinocebrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 95, n. 4, p. 1010–1018, 2019.

GARNACHO SAUCEDO, G. M.; SALIDO VALLEJO, R.; MORENO GIMÉNEZ, J. C. Effects of solar radiation and an update on photoprotection. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 92, n. 6, p. 377.e1-377.e9, 2020.

GASPARRINI, M. et al. Strawberry-based cosmetic formulations protect human dermal fibroblasts against UVA-induced damage. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HU, S.; CHEN, F.; WANG, M. Photoprotective effects of oxyresveratrol and kuwanon o on DNA damage induced by UVA in human epidermal keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 541–548, 2015.

HUBNER, A. et al. The synergistic behavior of antioxidant phenolic compounds obtained from winemaking waste's valorization, increased the efficacy of a sunscreen system. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, 2019.

HUPEL, M.; POUPART, N.; AR GALL, E. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 362–371, 2011.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KASOTE, D. M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982–991, 2015.

KHAN, M. A. Sun Protection Factor Determination Studies of Some Sunscreen Formulations Used in Cosmetics for Their Selection. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 5- s, p. 149–151, 2018.

KOSTYUK, V. et al. Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. **Rejuvenation Research**, v. 21, n. 2, p. 91–101, 2018.

LEFAHAL, M. et al. In Vitro Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Contents,

Antioxidant and Photoprotective Activities of Crude Methanolic Extract of Aerial Parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) Growing in Algeria. **Medicines**, v. 5, n. 2, p. 26, 2018.

LIMA-SARAIVA, S. R. G. DE et al. Chemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Photoprotective Activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.

LIMA, A. D. DA S.; SOUSA, R. G. DE; LIMA, E. N. Incremento da atividade fotoprotetora e antioxidante de cosméticos contendo extratos vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 225, 2020.

MANSUR, J. DE S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. bras. dermatol**, v. 61, n. 3, p. 121–4, 1986.

MANSUR, M. C. P. P. et al. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251–258, 2016.

MARTINS, F. J. et al. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34–39, 2016.

MARTO, J. et al. The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 93–100, 2016.

MCDANIEL, D. H. et al. Evaluation of the antioxidant capacity and protective effects of a comprehensive topical antioxidant-containing water-soluble, enzymatic, and lipid-soluble antioxidants - **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology** - April 2019 - Volume 12 - Number 4 –46-53p.

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 Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 391–398, 2015.

MEJÍA-GIRALDO, J. C. et al. Photoprotective Potential of *Baccharis antioquiensis* (Asteraceae) as Natural Sunscreen. **Photochemistry and photobiology**, v. 92, n. 5, p. 742–752, 2016.

MERTENS, J. et al. Umbuzeiro (*Spondias Tuberosa*): a systematic review. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 36, p. 179–197, 2015.

MERTENS, J. et al. *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), a threatened tree of the Brazilian Caatinga? **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 3, p. 542–552, 2016.

MILANI, L. P. G. et al. Extract from byproduct *Psidium guajava* standardized in ellagic acid: additivation of the in vitro photoprotective efficacy of a cosmetic formulation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 6, p. 692–696, 2018.

MOTA, M. D. et al. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 205, n. February, p. 111837, 2020.

NGOC et al. Recent Trends of Sunscreen Cosmetic: An Update Review. **Cosmetics**, v. 6, n. 4, p. 64, 2019.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 119–123, 2018.

OLIVEIRA, R. G. et al. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n. 3, p. 102–105, 2013.

OLIVEIRA, M. A. M. P. Desenvolvimento de protetores solares bioativos. p. 76, 2018.

OLSZEWSKA, M. A. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. **Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research**, v. 68, n. 6, p. 945–953, 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 Mediciniais**, v. 17, n. 10.1590/1983-084X/14_012, p. 730–736, 2015.

PAODJUNAS, R. et al. Conhecimento tradicional e usos do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) por comunidades rurais do semiárido, Paraíba, nordeste, Brasil. **Ethnoscintia**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2019.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. et al. Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. **Journal of Dermatological Science**, v. 84, n. 2, p. 169–177, 2016.

PERMANA, A. D. et al. Phytosomal nanocarriers as platforms for improved delivery of natural antioxidant and photoprotective compounds in propolis: An approach for enhanced both dissolution behaviour in biorelevant media and skin retention profiles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 205, p. 111846, 2020.

POLONINI, H. C. et al. Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 964–968, 2013.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. et al. UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin. **Archives of Dermatological Research**, v. 310, n. 5, p. 413–424, 2018.

RAMOS, R.G. et al. Estudo comparativo da composição fitoquímica, citotoxicidade e potencias antioxidante e fotoprotetor da casca e folha de *Erythrina velutina*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2525–8761, p. 33140–33158, 2020.

ROY, S. Impact of UV radiation on genome stability and human health. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 207–219, 2017.

SCHUCH, A. P. et al. Highly sensitive biological assay for determining the photoprotective efficacy of sunscreen. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 19, p. 11584–11590, 2014.

SILVA, R. V. et al. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 509–514, 2016.

SILVA, A. C. P. et al. Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, n. January, p. 162–171, 2019.

SILVEIRA, J. P. S. et al. Photoprotective and antioxidant effects of Rhubarb: Inhibitory action on tyrosinase and tyrosine kinase activities and TNF- α , IL-1 α and α -MSH production in human melanocytes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 2, 2013.

SKROVANKOVA, S. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673–24706, 2015.

SMERILLI, A. et al. Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom skeletonema marinoi. **Antioxidants**, v. 8, n. 6, 2019.

SOUZA, C.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants Spirulina and dimethylmethoxy chromanol on sun-induced skin damage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. March, p. 52–64, 2017.

STEVANATO, R. et al. ACLU: Marijuana in Black and White. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 9, n. 3, p. 18, 2013.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Sunscreen drug products for over-the-counter human use: proposed rule**. **Federal Register**. [s.l: s.n.].

Disponível em, acesso em fevereiro de 2021:

<https://www.federalregister.gov/documents/2019/02/26/2019-03019/sunscreen-drug-products-for-over-the-counter-human-use>.

WRÓBLEWSKA, K. B. et al. In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. November 2018, p. 208–215, 2019.

YANG, S. I. et al. Reliable and simple spectrophotometric determination of sun protection factor: A case study using organic UV filter-based sunscreen products. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 518–522, 2018.

6.2 Avaliação da atividade fotoprotetora *in vitro* de formulação cosmética contendo extrato alcoólico do epicarpo do fruto da *Spondias tuberosa*

6.2.1 Introdução

O espectro de radiação ultravioleta (UV) que incide na Terra é dividida em UV-C (100 – 280 nm), UV-B (280 – 315 nm) e UV-A (315 – 400 nm). Sua interação com a pele desprotegida provoca danos superficiais, como queimaduras solares e bronzeamento ou até mesmo o câncer e o estresse oxidativo, decorrente das alterações do DNA e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (NISHIKAWA, 2012; AMBRÓSIO, 2019; MOTA et al., 2019).

A fotoproteção pode ser considerada uma alternativa profilática e terapêutica contra os efeitos nocivos das radiações, visto que os protetores solares conseguem absorver ou refletir os raios UV, diminuindo os danos causados à pele (BALOGH *et al.*, 2011; SEIXAS, 2014).

Para a avaliação da eficácia da fotoproteção em formulações cosméticas é adotado mundialmente o Fator de Proteção Solar (FPS). Esse parâmetro determina, *in vivo*, a quantidade de energia necessária para ocasionar eritema em uma pele desprotegida e protegida e, posteriormente, calcula-se sua razão, gerando um resultado numérico. No entanto, métodos alternativos, como o desenvolvido por Mansur (1986), que demonstra boa correlação *in vivo*, têm sido utilizados para triagem de filtros solares (WROBESKA et al., 2019).

Estrategicamente, a indústria cosmética tem buscado melhorar aspectos referentes à segurança e eficácia de protetores solares, a partir da utilização de compostos orgânicos naturais, capazes de absorver radiação UV e que, adicionalmente, apresentem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Dessa forma, produtos naturais contendo compostos fenólicos têm sido utilizados com a finalidade combater os danos causados pelos raios UV (DAL'BELO, 2008; GREGORIS *et al.*, 2013; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; COSTA, 2015; HUBNNER et al., 2019).

Nessa perspectiva, a partir da caracterização fitoquímica descrita em alguns estudos, foi observado no fruto da *Spondias tuberosa* valores significativos de antocianinas, flavonoides, carotenoides e ácido ascórbico, conferindo-lhe um alto

poder antioxidante e ação na redução dos danos causados pela radiação solar (RUFINO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2015; ZERAIK *et al.*, 2016; SOUZA; CAMPOS, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2018).

Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar, *in vitro*, a capacidade fotoprotetora de formulações contendo extratos alcoólicos do epicarpo da *Spondias tuberosa*, estimar o incremento do fator de proteção solar, quando adicionado filtros solares químicos e avaliar a estabilidade das formulações fotoprotetoras desenvolvidas.

6.2.2 Material e métodos

Os frutos da *S. tuberosa* foram coletados em uma fazenda situada no município de Heliópolis-BA, no mês de fevereiro de 2020, período onde ocorre a maturação dos frutos. A identificação botânica foi feita por meio da comparação com os dados descritos na literatura especializada. Foram selecionados os frutos com tegumento íntegro, verdes e maduros, e sem sinais de contaminação ou deterioração. Esses foram lavados com água corrente e descascados. As cascas foram secas estufa com circulação de ar, em temperatura de 40°C por 72h.

6.2.2.1 Preparo dos extratos a partir do epicarpo da *Spondias tuberosa*

As cascas secas passaram por três ciclos de maceração de 48 horas cada, usando etanol absoluto como solvente extrator. Após cada ciclo, o sistema foi filtrado e acrescido mais solvente extrator. No final dos três ciclos, os extratos obtidos foram combinados, formando uma só amostra, a qual foi concentrada em evaporador rotativo a 45 °C, sob vácuo (MOTA *et al.*, 2019).

6.2.2.2 Determinação de compostos fenólicos totais (TPC)

Foram preparadas soluções-padrão de ácido gálico nas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com 10 mL cada, para a construção da curva padrão (Figura 5.2). A partir da equação da reta foi calculada a concentração de

fenólicos no extrato de umbu, expresso em mg equivalente de ácido gálico por g de extrato (GAE g⁻¹).

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato metanólico de umbu (1 mg/mL) foi adicionada em 7,9 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (0,2 mol L⁻¹). A solução obtida foi deixada em repouso por 4 minutos em ambiente escuro. Posteriormente, foram acrescentados 2,25 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi mantida por 20 minutos a 50 °C no banho aquecido. As amostras contendo extrato de umbu e as soluções-padrão de ácido gálico foram submetidas ao mesmo processo descrito. Após isso, procederam-se as leituras das amostras em espectrofotômetro UV-Vis (FEMTO 700 Plus) no comprimento de onda 765 nm (MOTA, 2021).

6.2.2.3 Determinação do teor de flavonoides totais

Foram produzidas soluções contendo 2 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% em metanol e 2 mL do extrato diluído em metanol na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Após 60 minutos no escuro, em temperatura ambiente, procedeu-se com a leitura da absorvância da amostra, em triplicata, em espectrofotômetro UV-Vis (FEMTO 700 Plus), no comprimento de onda de 420 nm. O branco utilizado para calibração foi uma solução contendo 2 mL de metanol e 2 mL cloreto de alumínio. Os dados foram expressos em mg de equivalente a quercetina por g do extrato seco (QE g⁻¹) (SILVA *et al.* 2016).

6.2.2.4 Desenvolvimento de formulações cosméticas

Foram produzidas 9 formulações, sendo que: a formulação F1 continha apenas a emulsão base; na F2 foi acrescentado o *4-metoxicinamato de 2-etilhexila ou ethylhexylmethoxycinnamate* (EHMC) a 5%; na F3 foi adicionado o *Salicilato de homomentila* a 8%; as formulações F4, F5 e F6 foram acrescidas 0,125%, 0,25% e 0,5% de extrato etanólico de umbu em contrações crescente de fenólicos totais, respectivamente; já F7, F8 e F9 além do extrato de umbu nas concentrações supracitadas, continham 5% de EHMC. Os dados quantitativos e qualitativos das formulações se encontram descritos na Tabela 5.1.

Para o preparo das emulsões, pesaram-se todos os componentes da Fase B e da Fase A em béqueres diferentes. Ambos foram submetidos ao aquecimento até uma temperatura de 70 °C, para fusão dos componentes sólidos. Ainda sob agitação constante, a Fase B foi vertida, lentamente, sobre a Fase A, obtendo-se a emulsão. Depois, procedeu-se a incorporação dos extratos e filtros solares sintéticos às emulsões (Fase C). As amostras foram acondicionadas em recipientes adequados e identificadas.

6.2.2.5 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações cosméticas

A estabilidade preliminar foi determinada a partir do estresse térmico e ciclo gelo/degelo. Assim, para realização do estresse térmico, 10g de cada formulação acondicionadas em frascos de polietileno incolor, foram dispostas em banho termostaticado. Realizou-se a elevação da temperatura de 10 em 10 °C, iniciando a 40 °C e terminando em 80 °C, mantendo-se por trinta minutos em cada temperatura (NISHIKAWA,2012).

As mesmas amostras foram submetidas ao ciclo gelo/degelo, na qual foi determinado ciclos de 24 horas na estufa a 45 ± 2 ° C e 24 horas no freezer a -5 ± 2 °C, durante 12 dias (6 ciclos).

Ao final de cada teste, as amostras foram avaliadas quanto as características organolépticas (aspecto, cor e odor) e classificadas de acordo com o Quadro 2 (BRASIL, 2008; BABY, 2007; NISHIKAWA,2012).

6.2.2.6 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro*

O Fator de proteção solar foi determinado de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Mansur e colaboradores (1986). 1g de cada formulação foram diluídas em 5 mL etanol, obtendo uma solução com concentração final de 0,2 mg mL⁻¹. As absorvâncias das soluções preparadas foram determinadas na faixa de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm, sendo feitas três determinações para cada comprimento de onda. Como branco foi adotado o etanol. O cálculo do FPS foi feito por meio da Equação (2) e Tabela 5.2

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

Em que:

FC = Fator de Correção estimado a partir da amostra que contém 8% de Salicilato de Homomentila.

EE(λ) = Efeito eritematogênico da radiação solar a cada comprimento de onda (λ);

I (λ) = Intensidade da radiação solar a cada comprimento de onda (λ);

Abs (λ) = Leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da amostra a cada comprimento de onda (λ)

Tabela 6.2.1: Ponderação empregada no cálculo do FPS segundo Método de Mansur.

| Comprimento de onda (nm) | EE x I (normalizado) |
|--------------------------|----------------------|
| 290 | 0,0150 |
| 295 | 0,0817 |
| 300 | 0,2874 |
| 305 | 0,3278 |
| 310 | 0,1864 |
| 315 | 0,0839 |
| 320 | 0,0180 |

Fonte: MANSUR, 1986.

6.2.3 Resultados e discussão

6.2.3.3 Avaliação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais por espectrofotometria

Estudos fitoquímicos realizados com diversas partes do fruto da *Spondias tuberosa* revelam a presença diversos compostos bioativos, principalmente, os fenólicos e flavonoides (SILVA, 2012).

Neste trabalho, a quantificação de fenólicos e flavonoides totais foi obtida por meio da análise espectrofotométrica, utilizando reagentes específicos que interagem com esses compostos e formam complexos coloridos, os quais são lidos em comprimento de onda específico (RESENDE, 2010). Foram utilizadas as curvas de calibração do ácido gálico e da quercetina para o cálculo de concentração dessas substâncias.

O teor médio obtido de fenólicos e flavonoides totais no extrato etanólico do epicarpo do umbu foram apresentados na Tabela 6.2.2, sendo observado que o teor

de fenólicos foi superior, porém próximo do que foi relatado por Costa *et al.* (2015), mas o valor de flavonoides totais foi 10 vezes maior ao comparar com esse mesmo estudo.

No estudo de Costa e colaboradores, foram utilizados frutos coletados em região de caatinga entre os meses de dezembro e janeiro, no estágio de maturação maduro, e procederam a extração com o auxílio do banho de ultrassom, utilizando como solvente solução hidroalcoólica (etanol: água, 80:20, v/v). Deste modo, ao analisar os resíduos do umbu, foi determinado 776 mg de GAE $100\text{ g}^{-1} \pm 3,38$ de fenólicos e 52 mg de QE $100\text{ g}^{-1} \pm 0,45$ de flavonoides, o que equivalem a 7,7 mg GAE/g e 0,52 mg/g, respectivamente (COSTA et al., 2015).

Tabela 6.2.2: Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais no extrato de umbu 1mg mL^{-1} .

| Conteúdo | Concentração |
|---------------------------|---|
| Flavonoides totais | $5,143 \pm 0,179\text{ mg QE g}^{-1}$ |
| Fenólicos totais | $10,951 \pm 0,842\text{ mg GAE g}^{-1}$ |

No entanto, Ribeiro *et al.* (2019), utilizando amostras frescas, coletadas na região de semiárido, as quais foram liofilizadas, reduzido o tamanho das partículas e o processo extrativo foi realizado com acetona 70% por 30 minutos sob agitação, seguido por filtração, obteve valor de fenólicos totais 6 vezes menor ($1,775\text{ mg GAE g}^{-1}$) do que o presente trabalho.

Assim, ao analisar-se os resultados encontrados nos diferentes estudos apresentados, é importante atentar-se as diferenças entre as condições inerentes ao local de coleta, preparo das amostras, bem como àquelas específicas dos processos extração. Segundo Akula e Ravishankar (2011), características abióticas, como condições do solo, clima e época de colheita, impactam na concentração de metabólitos secundário, sendo necessário cautela ao estabelecer comparações quantitativas entre estudos.

De acordo com Mota et al. (2020), a escolha do método de extração e as condições em que esse processo é realizado, como solvente, tempo e temperatura, podem interferir na concentração de bioativos nos frutos.

O estudo realizado por Dias et al. (2018) reforça o impacto do método de extração e da polaridade do solvente utilizado. No trabalho desses pesquisadores foram observadas alterações nos teores de fenólicos presentes na semente do umbu empregando diferentes métodos extrativos. Foram utilizados: o soxhlet (SOX), a extração por fluido supercrítico utilizando dióxido de carbono (SFE-CO₂) e ultrassom assistido (UEA). O teor de fenólicos variou de 2,5 mg GAE g⁻¹ empregando a SFE-CO₂ a 76,0 mg GAE g⁻¹ para UEA. Além disso, constatou-se que solventes mais apolares como hexano, tiveram resultados menores de TPC ao comparar com o uso de etanol, devido as características polares das substâncias presentes na semente do umbu.

2.2.3.2 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações contendo extrato de *Spondias tuberosa*

Os estudos de estabilidade têm por finalidade garantir a segurança e efetividade dos produtos inseridos no mercado durante o seu prazo de validade. Tal como, traz informações importantes sobre o comportamento de excipientes e matérias-primas empregadas, tornando o processo de seleção dos componentes de formulações mais assertivo (MAIA, 2012).

Assim, a estabilidade torna-se um parâmetro que permite qualificar os produtos frente à avaliação das características organolépticas e físico-químicas das substâncias por determinado período (BRASIL, 2004).

Neste estudo foram desenvolvidas nove formulações, demonstradas na Figura 6.2.1, que apresentaram colorações variáveis, do branco ao verde escuro, em função da concentração de extrato utilizada. Todas as formulações se apresentaram como emulsões cremosas viscosas, com brilho, odor frutado e aspecto homogêneo, exceto as formulações F7, F8 e F9, nas quais foi perceptível pontos mais escuros, decorrentes da dificuldade de incorporação completa do extrato.

Nessa perspectiva, ao submeter as amostras à condições com extrema variação de temperatura para realização dos ensaios, observou-se que nenhuma das formulações apresentou alterações nas características organolépticas, conforme demonstra a Quadro 6.2.1, além disso, nenhuma mudança na consistência aparente e sinais de separação de fases foi constatado.

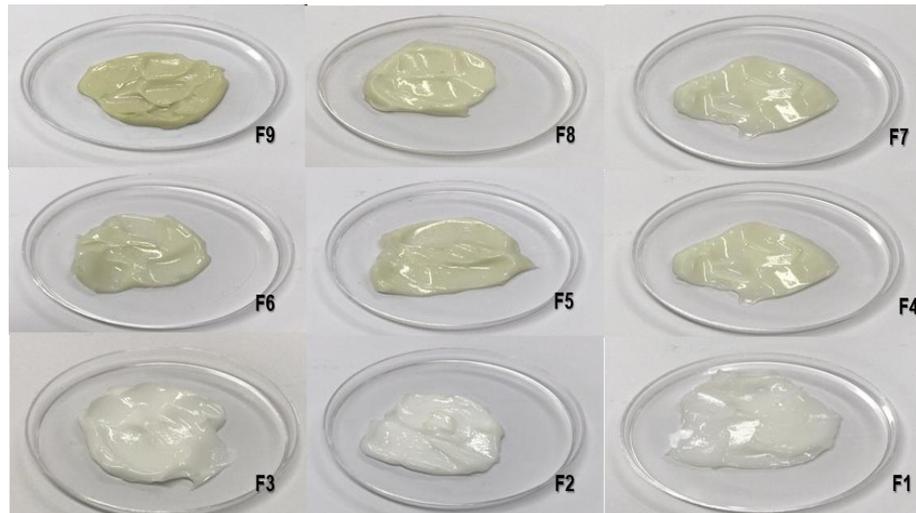


Figura 6.2.1: Aspectos das formulações desenvolvidas após 24h de preparo.

Quadro 6.2.1: Testes realizados para avaliar a estabilidade acelerada das formulações F1 a F9.

| Avaliações | Características organolépticas | Formulações | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------------|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 | F9 |
| Estresse térmico | Aspecto | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | Cor | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | Odor | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| Ciclo gelo/degelo | Aspecto | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | Cor | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | Odor | N | N | N | N | N | N | N | N | N |

N = normal, sem alterações quanto ao aspecto.

2.2.3.3 Análise da atividade fotoprotetora *in vitro*

Devido da importância da *S. tuberosa* para a medicina popular, somado aos escassos estudos científicos sobre suas atividades, buscou-se investigar seu potencial fotoprotetor por meio do método de Mansur (1989). Esse método, baseia-se na capacidade que algumas substâncias possuem em absorver a radiação UV, em determinado intervalo de comprimento de onda, sendo um importante meio para estimar o fator de proteção solar de formulações tópicas.

Os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, são substâncias facilmente encontradas em plantas nativas da região da Caatinga, nas quais desempenham a atividade de fotoproteção. Essas substâncias têm demonstrado potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante, com capacidade imunomoduladora e protetora do DNA, devido à inibição de mediadores inflamatórios induzidos pela radiação UV (ANDRADRE *et al.*, 2019).

Neste trabalho, todas as formulações cosméticas desenvolvidas foram testadas quanto ao seu potencial fotoprotetor na faixa UV-B. Os resultados estão expressos na Figura 6.2.2. Os valores de absorvância obtidos por meio da leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 290 a 320 nm, foram confrontados estatisticamente pela análise de variância, ANOVA.

Como resultado obteve-se o p -valor de $1,044 \times 10^{-36}$, demonstrando que existem diferenças significativas entre os FPS das formulações testadas, no nível de significância de 5% de confiança, à exceção de F1 e F4, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa para seus FPS ($p=0,7902$). Entre as formulações contendo somente o extrato, F4, F5 e F6, e o extrato com o filtro químico, F7, F8 e F9, a análise estatística apresentou p -valores menores que 0,05 ($3,007 \times 10^{-6}$ e $3,926 \times 10^{-6}$, respectivamente), comprovando, também, a rejeição da hipótese de efeitos ativos com a variação da concentração do extrato natural.

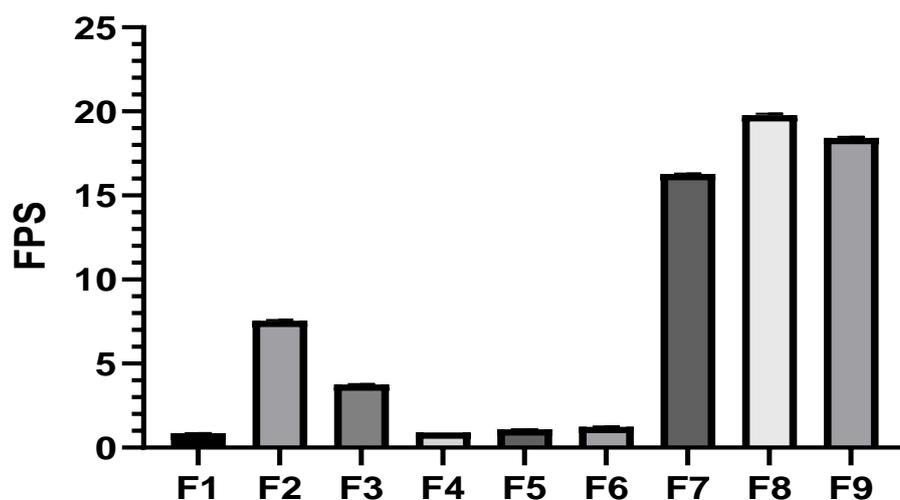


Figura 6.2.2: Valores do FPS obtidos para cada formulação desenvolvida.

De acordo com a Figura 6.2.2, as formulações contendo apenas o extrato do umbu nas concentrações 0,125%, 0,25% e 0,5% de fenólicos totais, tiveram valores de FPS inferiores a 2,0. O *Food and Drug Administration* (FDA) determina que cada filtro solar adicionado ao produto final deve apresentar um FPS não inferior a 2, sendo que o produto final deve ter um FPS não inferior ao número de filtros solares utilizados multiplicado por 2 (FDA, 2019).

No entanto, segundo as disposições contidas na Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa, RDC nº 30, de 1 de junho de 2012, para a comercialização de fotoprotetores no país, esses devem possuir um FPS mínimo de 6,0 e o valor do Fator de Proteção UV-A (FPUVA) deve corresponder a, no mínimo, 1/3 do valor do FPS (BRASIL, 2012).

É possível afirmar, portanto, a necessidade de altas concentrações de polifenóis para que a preparação de creme solar à base de extrato natural, utilizado de forma isolada numa preparação cosmética, tenha um desempenho fotoprotetor desejável (MOTA, 2020).

Trabalho semelhante foi realizado por Andrade et al. (2019), que avaliou a capacidade fotoprotetora de 15 espécies de plantas encontradas na caatinga pernambucana. entre elas o epicarpo de *Spondias tuberosa*, seco em temperatura ambiente, moído e submetido a maceração com 80% de etanol. Entretanto, ao analisar o extrato bruto, empregando a metodologia de Mansur (1986), foi determinado FPS de $7,22 \pm 0,36$. O conteúdo de fenólicos totais foi de $452,56 \pm 29,3$ mg TAE g⁻¹ e o teor de flavonoides não foi detectado, utilizando a rutina como padrão. Como explicitado anteriormente, diferenças na seleção do solvente utilizado podem interferir de forma quali-quantitativa nos compostos extraídos. Além disso, características geográficas, relacionadas ao clima, tempo de colheita e a região de coleta, devido à disponibilidade de nutrientes disponíveis, também interferem na concentração dos metabólitos secundários.

Analisando ainda os resultados expostos na Figura 6.2.2, observa-se que os valores de FPS alcançados nas formulações F7, F8 e F9, as quais contêm o extrato e o filtro sintético EHMC, apontam para o possível efeito sinérgico existente. Assim, esse fato por resultar em uma alternativa para reduzir a concentração do filtro orgânico quando associado a polifenóis na formulação. Tal redução é positiva, posto que pode reduzir custos de produção e potencial efeito tóxico dos filtros solares sintéticos.

De acordo com os resultados de Wroblewska et al. (2019), o aumento do FPS ou efeito sinérgico apresentando ao associar o extrato de *bamboo* com filtros orgânicos (*Octydimethyl PABA*, *Avobenzone* e *ethylhexylmethoxycinnamate [EHMC]*), foi decorrente da presença de polifenóis que possuem a capacidade de aumentar a fotoestabilidade dos filtros solares, absorver a radiação solar e pela atividade antioxidante, complementando a fotoproteção.

Corroborando com o exposto, o estudo de Hubner et al. (2019) sugere que o sinergismo entre flavonoides e filtros UV é capaz de reduzir a formação de fotoprodutos deletérios, potencializando a fotoproteção fornecida. Esses fotoprodutos são formados a partir da tautomerização que alguns filtros sintéticos como, *Avobenzone* e EHMC (WROBLEWSKA, et al., 2019).

É válido ressaltar, que nesse estudo não foi observado um aumento proporcional no FPS ao aumentar a concentração de fenólicos do extrato, pois a amostra F9 que muito embora tivesse maior conteúdo de fenólicos, teve valor menor de FPS ao ser comparada com a F8.

Assim, quando se compara a formulação F2, que contém apenas 5% de EHMC, e apresenta um FPS próximo a 8,0, em relação à formulação F8, na qual foi adicionado o extrato de umbu a 0,25%, houve um aumento 162% no FPS.

O EHMC é um filtro químico pertencente da classe dos cinamatos que absorve radiações na banda do UV-B, com absorção máxima de 310 nm (LOPES; CRUZ; BATISTA, 2012). A FDA limita seu uso em uma formulação de protetor solar a um máximo de 7,5% (p/p) e nessa concentração o FPS varia de 6,4 a 13,3, dependendo dos componentes da formulação utilizados (MOTA, 2020). Dessa maneira, para aumentar o FPS do protetor solar é necessário acrescentar outros filtros solares. O Quadro 6.2.2 apresenta valores de FPS que podem ser obtidos ao utilizar mistura de filtros solares sintéticos em uma formulação de protetor solar.

Quadro 6.2.2: Valores de FPS obtidos utilizando uma mistura de filtros solares sintéticos.

| Filtros solares | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Ethylhexylmethoxycinnamate</i> (EHMC) 5% | X | X | X | X |
| Salicilato de etil-hexila (EHS) 5% | | X | X | X |
| Octocrileno (OC) 10% | | | X | X |

| | | | | |
|--|------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Salicilato de homomentila (HSM) 15% | | | | X |
| FPS (Taxa % de aumento) | 7,9 | 9,8 (24%) | 20,1 (154%) | 24,4 (209%) |

Fonte: BASF, 2021.

Esta pesquisa mostrou que a combinação de extrato de umbu a 0,25% de fenólicos totais com 5% de EHMC pode melhorar os valores de FPS desse produto em cerca de 162% (F8, Figura 6.2.2). Deste modo, para alcançar resultados semelhantes ao que foi encontrado neste estudo, seria necessário combinar os seguintes filtros solares com suas respectivas concentrações: EHMC (5%) com EHS (5%) e OCR (10%), condizente aos valores da amostra 3, expresso no Quadro 6.2.2.

Portanto, é válido ressaltar que uso do extrato de umbu associado ao filtro EHMC pode permitir a redução do custo de produção do protetor solar, a minimização dos riscos de toxicidade e irritação cutânea sintéticos e diminuição dos impactos ambientais que o descarte inadequado que filtros solares sintéticos desencadeia (HUBNER *et al.*, 2019).

6.2.4 Conclusão

A maioria das formulações de filtro solar disponíveis comercialmente não fornece proteção, principalmente contra efeitos considerados crônicos, como envelhecimento da pele e fotocarcinogênese. Por isso, a indústria cosmética tem investido na utilização de extratos vegetais ricos em fenólicos compostos, como taninos e flavonoides, proporcionando maior proteção.

Sendo assim, o extrato etanólico da *Spondias tuberosa* apresentou teor de fenólicos e flavonoides totais superiores à de outros estudos realizados, porém, valor de Fator de Proteção Solar (FPS) menor que o valor mínimo preconizado (FPS 2) pelas Agências regulatórias.

Entretanto, a associação do extrato, em diferentes concentrações de fenólicos totais, às formulações F7, F8 e F9, que continham *octylmethoxycinnamate*, apresentaram incremento significativo em cerca de 162% do FPS, uma vez que compostos fenólicos contribuem no aumento da fotoestabilidade de filtros solares,

além de absorver parte da radiação UV e possuir atividade antioxidante, cooperando para o aumento da atividade fotoprotetora.

Por fim, o possível efeito sinérgico observado ao empregar o extrato do epicarpo do umbu associado ao EPMC reforça a necessidade de novos ampliar o estudo e demonstra a potencialidade de utilização extratos naturais em formulações fotoprotetoras, provenientes de resíduos de frutas.

Referências

AKULA, R., & Ravishankar, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v 6:11, 1720-1731; November, 2011.

AMBRÓSIO, A. M. F. S. **Protetores solares e o papel dos antioxidantes na sua constituição**. Dissertação (Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias: Lisboa, 2019.

ANDRADE, B.A. et al. Photoprotective Activity of Medicinal Plants From the Caatinga Used as Anti-inflammatories. **Pharmacognosy Magazine**, Volume 15, Issue 61, April-June 2019, 356-361.

BABY, A.R. et al. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichiliacatiguá*Adr. Juss (and) *Ptychopetalumolacoides* Bentham. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.3, p. 405-412, 2007.

BALOGH et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **AnBrasDermatol** – Volume 86 – 2011 -32-42p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, v.1, 47p, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 30, de 01 de Junho de 2012. Resolução da Diretoria Colegiada. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

CORDEIRO, B. M. P. C. *et al.* Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-Candida agent by causing mitochondrial and lysosomal damages - **BCM Complementary and Alternative Medicine** – 2018 - 18:284 – 1-10p.

COSTA, S. C. C. et al. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 413–418, 2015.

DAL'BELO, S.E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*. 179p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2008.

DIAS, J.L. et al. Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO₂, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities - **The Journal of Supercritical Fluids** – November, 2018. 37 p.

FIGUEIREDO, S. A. et al. **In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract** - Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – Volume 131 – 2014 - 65–73p.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HUBNER, A. et al. The synergistic behavior of antioxidant phenolic compounds obtained from winemaking waste's valorization, increased the efficacy of a sunscreen system. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, 2019.

LOPES, F.M.; CRUZ, R.O.; BATISTA, K.A. Radiação ultravioleta e ativos utilizados na formulação de protetores solares. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. vol.16, n.4, p183-199,2012.

MAIA, A. M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado). São Paulo, 2002.

MANSUR, J. DE S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. bras. dermatol**, v. 61, n. 3, p. 121–4, 1986.

MOTA, M. D. **Desenvolvimento e avaliação da atividade fotoprotetora de formulações cosméticas à base de extratos de frutos ricos em substâncias fenólicas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia: Salvador, 2020.

MOTA, M. D. et al. Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 201, n. September, p. 111639, 2019.

NISHIKAWA, D. O. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de formulações fotoprotetoras bioativas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo: São Paulo, 2012.

REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia: UFBA, Salvador. 2010, 118p.

RIBEIRO, L.O. et al. Nutrients and bioactive compounds of pulp, peel and seed from umbu fruit. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49:04, e20180806, 2019.

SEIXAS, V. C. **Desenvolvimento e avaliada da estabilidade e eficácia das formulações cosméticas contendo fosfato de cério com propriedades fotoprotetoras.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2014.

SILVA, G. A. da. **Avaliação da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antinoceptiva, anti-inflamatória e toxicidade do extrato metanólico e frações de folhas de *Spondias* sp. (Anacardiaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Natal, 2012.

SILVA, R. V. et al. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation, **Ind. Crops Prod.** 83, 509–514, 2016.

SOUZA, C.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants Spirulina and dimethylmethoxy chromanol on sun-induced skin damage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. March, p. 52–64, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, non-melanoma and melanoma skin cancer, both sexes, all ages Cancer Tomorrow** [Internet], 2019.

Disponível em, acesso em junho de 2021: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=900&cancers=17&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=500000&print=0

WRÓBLEWSKA, K. B. et al. In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. November 2018, p. 208–215, 2019.

ZERAIK, M. L. et al. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits- **Journal of Functional Foods** – Volume 21 – 2016 - 396–405p.

7 DISCUSSÃO GERAL

Diversos estudos têm mostrado a relação prejudicial decorrente da exposição da pele desprotegida à radiação ultravioleta. Por isso, estudos concentram-se em buscar alternativas para eliminar ou minimizar os eventos inflamatórios, imunossupressores e genotóxicos causados. Por conseguinte, a utilização de fotoprotetores contendo extratos naturais têm sido cada vez mais explorada devido aos bons resultados demonstrados.

A revisão sistemática da literatura apresentada, permitiu avaliar e discutir os métodos *in vitro*, instrumentais ou modelos biológicos, empregados para determinar a atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos.

Nessa perspectiva, métodos tradicionalmente consagrados que empregaram a espectrofotometria, como os métodos de Mansur et al. (1986) e de Diffey e Robson (1989), tiveram limitações estabelecidas ao longo do tempo, mas que apresentam boa correlação com os métodos *in vivo* e, por isso, são frequentemente empregados nos testes de triagem para a avaliação das atividades de fotoproteção.

Similarmente, diante da necessidade de incrementar as análises e se aproximar dos processos que ocorrem na pele após a exposição solar, a comunidade científica passou a valer-se de modelos biológicos, como cultura de células e bactérias, com intuito de identificar e traçar mecanismos de ação das substâncias que são produzidas. Entretanto, o emprego dessas técnicas *in vitro* também requer validação, sendo um dos pontos críticos para seu amplo emprego.

A atuação dos compostos fenólicos na proteção contra os radicais livres, formados após exposição aos raios solares, e sua capacidade de absorvê-los relaciona-se com a configuração estrutural da molécula. A partir dos trabalhos publicados na literatura constatou-se que o alto peso molecular e alto grau de hidroxilação no anel aromático influenciam na obtenção de diferentes valores de absorvância molar e comprimento de onda máximo de diferentes extratos, assim como o número de hidroxilas livres influencia na sua atividade antioxidante (STEVANATO et al., 2013; KASOTE et al., 2015; BALDIVIA et al., 2018).

No umbu, fruta nativa do Nordeste brasileiro, em especial no bioma Caatinga, foi identificado a partir de estudos fitoquímicos e cromatográficos, diferentes compostos fenólicos. Ao analisar o conteúdo fenólico e flavonoide totais do extrato alcoólico obtido do epicarpo do umbu foi quantificado, respectivamente,

10,951 ± 0,842 mg GAE g⁻¹ e 5,143 ± 0,179 mg QE g⁻¹. Os valores encontrados são próximos a alguns estudos da literatura (COSTA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019).

A variação nos resultados relacionados ao teor de metabólitos secundários está intrinsecamente relacionada às condições de coleta e metodologias empregadas no preparo, extração e a quantificação propriamente dita do extrato. A comparação desses valores, nos estudos avaliados, com os resultados adquiridos no extrato do epicarpo do umbu, sugere que o local de coleta, a época de colheita, a preparação da amostra para o processo extrativo e o solvente extrator usado possuem influência na quantificação fitoquímica presente.

Na avaliação da atividade fotoprotetora foi verificado que nenhuma das formulações contendo o extrato do umbu com diferentes concentrações de fenólicos totais obtiveram resultados relevantes (FPS igual ou superior a 2). No entanto, foi observada a capacidade do extrato do fruto da *S. tuberosa* de incrementar a ação fotoprotetora quando associado ao filtro solar sintético (EHMC), havendo um aumento 162% no FPS.

Nesse quesito, foi observado resultados similares em trabalhos presentes na revisão de literatura, que utilizaram outros extratos e também obtiveram incremento no FPS (CVETKOVSKA et al., 2017; HUBNER et al., 2019; KOSTYUK et al., 2018; MARTO et al., 2016; MILANI et al., 2018; MOTA et al., 2020; ORLANDA, J.F.F, VALE V.V., 2015; SMERILLI et al., 2019; STEVANATO et al., 2013).

O efeito sinérgico evidenciado pode ser resultante da ação de polifenóis, os quais tornam os filtros solares sintéticos mais fotoestáveis, além de serem capazes de absorver parte da radiação solar e propiciar a atividade antioxidante (HUBNER et al., 2019; WROBESKA et al., 2019).

Dessa forma, além da potencialização da fotoproteção fornecida pelo emprego do filtro solar sintético e pelo extrato do umbu, existe também uma redução na concentração de filtros utilizados, uma vez que, seria necessária a associação de 3 filtros solares sintéticos para obter o valor FPS próximo ao que foi encontrado neste estudo.

8 CONCLUSÕES

O impacto que o câncer de pele vem causando na saúde pública mundial, a partir dos dados analisados, revelam a necessidade de se criar meios que auxiliem na redução do número de mortes, assim como no número de pessoas acometidas por essa doença.

Nesse sentido, a fotoproteção como sendo a medida profilática mais efetiva contra o desenvolvimento de câncer de pele, tem evoluído na tentativa de melhoria da segurança e da eficiência dos filtros solares, para atender as demandas do mercado global. Dentre as estratégias adotadas, destaca-se o uso de extratos naturais ricos em compostos fenólicos.

Essas substâncias caracterizam-se pela presença de anel fenólico, no qual o número de hidroxilas correlaciona-se a capacidade antioxidante, assim como, a presença de cromóforos na estrutura permite absorver a radiação UV-Vis em diferentes comprimentos de onda, similarmente aos filtros orgânicos. Dessa forma, o presente estudo possibilitou quantificar os fenólicos e flavonoides totais no extrato alcoólico do pericarpo do umbu, paralelamente, avaliar o potencial fotoprotetor de formulações cosméticas contendo esse extrato.

A variação observada nos teores de fenólicos e flavonoides totais em diferentes estudos, devido aos fatores abióticos ou escolhas no processo de extração, revelam a dificuldade em comparar e padronizar uma concentração ótima para que se tenha atividade biológica evidenciada. Em suma, é necessário haver altas concentrações de polifenóis, assim como, avaliar a quantidade de grupos cromóforos, o intervalo de absorção e o comprimento de onda.

Nessa perspectiva, o extrato do fruto da *S. tuberosa* não apresentou atividade fotoprotetora quando utilizado de forma isolada nas formulações desenvolvidas. Entretanto, foi observado um efeito sinérgico ao adicionar filtro solar sintético orgânico, *Ethylhexylmethoxycinnamate* – EHMC, promovendo um aumento considerável do FPS. Este fato, revela-se louvável, pois, reduz a necessidade de maiores concentrações de filtros sintéticos e, conseqüentemente, minimiza o risco de irritação cutânea e toxicidade; promove diminuição no impacto ambiental devido ao descarte inadequado desses filtros; e reduz a subutilização das cascas do umbu, que teriam uma finalidade mais sustentável.

Referências

- AKULA, R., & Ravishankar, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v 6:11, 1720-1731; November, 2011.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALMEIDA, I. F. et al. Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 28–34, 2015.
- ALMEIDA, C. L. F. et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- ALMEIDA, W. A. D. S. et al. Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 3, p. 373–380, 2019.
- ALVES, A. V. F. **Efeito do extrato de própolis vermelha como medida fotoprotetora contra os danos causados pela radiação UV**. Dissertação (Mestrado). Universidade Tiradentes – UNIT: Aracaju, 2015.
- AMBRÓSIO, A. M. F. S. **Protetores solares e o papel dos antioxidantes na sua constituição**. Dissertação (Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias: Lisboa, 2019.
- ANDRADE, B. A. **Atividade fotoprotetora *in vitro* de espécies medicinais da caatinga pernambucana e incorporação em gel dermatológico**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 2015.
- ANDRADE, B.A. et al. Photoprotective Activity of Medicinal Plants from the Caatinga Used as Anti-inflammatories. **Pharmacognosy Magazine**, Volume 15, Issue 61, April-June 2019, 356-361.
- BABY, A.R. et al. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichiliacatiguá* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum lacoides* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.3, p. 405-412, 2007.
- BACCARIN, T. et al. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 127–136, 2015.
- BACCARIN, T.; LEMOS-SENNA, E. Potential Application of Nanoemulsions for Skin

Delivery of Pomegranate Peel Polyphenols. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3307–3314, 2017.

BALDISSEROTTO, A. et al. *Moringa oleifera* leaf extracts as multifunctional ingredients for “natural and organic” sunscreens and photoprotective preparations. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.

BALDIVIA, D. DA S. et al. Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *stryphnodendron adstringens*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1–23, 2018.

BALOGH et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras Dermatol – Volume 86 – 2011 -32-42p.**

BARBOSA, H. M. **Efeito antidiabético e hipolipidêmico do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* arruda em ratos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 2016.

BASF, Sun screen simulator, Web. (2019). Disponível em (acesso em 26 de novembro de 2021): https://www.sunscreensimulator.basf.com/Sunscreen_Simulator

BATISTA, C. M. et al. The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, n. January, p. 198–207, 2018.

BOHJANEN, K. **Estrutura e funções da pele.** In: SOUTOR, C.; HORDINSKY, M. *Dermatologia clínica.* Porto Alegre: AMGH, 2014. 376p. (Lange).

BOSH, R.; NEENA, P.; SUÁREZ-PÉREZ J. A.; JUARRANZ, A.; DEVMURARI, A.; CHALENSOUK-KHAOSAAT, J.; GONZÁLEZ, S. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. **Antioxidants**, 4, 248-268, 2015.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura: umbu. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos.** -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** Brasília: ANVISA, v.1, 47p, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 30, de 01 de Junho de 2012. Resolução da Diretoria Colegiada. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Umbu: análise mensal de janeiro de 2017. **Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB**, 2017.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa |**

2020 Incidência de Câncer no Brasil, 2019.

BULLA, M. K. et al. Evaluation of photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi extract. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 3, p. 558–566, 2015.

CABRAL, L. D. da S.; PEREIRA, S. de O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil - **Revista Científica do ITPAC** – Araguaína – Volume 4, n.3, Pub.4 – julho, 2011.

CAMACHO-SANDOVAL, R. et al. Development and validation of a bioassay to evaluate binding of adalimumab to cell membrane-anchored TNF α using flow cytometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 235–240, 2018.

CARDOSO, A. DOS S. T. et al. Green analytical methods for isosorbide dinitrate determination by UV spectrophotometry and stability indicating HPLC-PDA. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5153–5161, 2020.

CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, n. November 2018, p. 111500, 2019.

CEFALI, L. C. et al. In vitro antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 539–544, 2019.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013–1024, 2012.

CHERUBIM, D.J. L.; MARTINS, C. V. B.; FARIÑA, L. O.; LUCCA, R. A. S. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **J Cosmet Dermatol**, 00:1–5, 2019.

COELHO, M. I. S. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca do umbu (*Spondias tuberosa* arruda) obtidos por diferentes técnicas.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2015.

COLIPA GUIDELINES. International sun protection factor (SPF) test method. **Colipa**, CTFA SA, JCIA, CTFA, maio, 2006.

CORDEIRO, B. M. P. C. *et al.* Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages - **BCM Complementary and Alternative Medicine** – 2018 - 18:284 – 1-10p.

COSTA, S. C. C. et al. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic

extract and its potential for sunscreen formulations. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 413–418, 2015.

COSTA, G. A. **Carotenoides e compostos fenólicos de *Spondias* do nordeste brasileiro: composição e bioacessibilidade**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 2018.

DAL PRÁ, V. et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from palm pressed fiber with high antioxidant and photoprotective activities. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 362–366, 2017.

DAL'BELO, S.E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*. 179p. **Tese (Doutorado)**– Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2008.

DIAS, J.L. et al. Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO₂, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities - **The Journal of Supercritical Fluids**, 37 p, November,2018.

DIAS, Jônatas Lopes. **Extração supercrítica e técnicas convencionais de extração na obtenção de compostos bioativos da semente de umbu (*Spondias tuberosa*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 2017.

DIFFEY, B. L.; ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 40, n. 3, p. 127–133, 1989.

DIMITROVSKA CVETKOVSKA, A. et al. Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 3, p. 310–319, 2017.

DZIAŁO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

FERNANDES, A. S. et al. Protection against UV-induced toxicity and lack of mutagenicity of Antarctic *Sanionia uncinata*. **Toxicology**, v. 376, p. 126–136, 2017.

FERNANDES, A. S. et al. Protection against UV-induced oxidative stress and DNA damage by Amazon moss extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 331–341, 2018.

FIGUEIREDO, S. A. et al. **In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract** - Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – Volume 131 – 2014 - 65–73p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Global food losses and food waste - extent, causes and prevention**. Rome, 2011.

GARCÍA FORERO, A. et al. Photoprotective and Antigenotoxic Effects of the Flavonoids Apigenin, Naringenin and Pinocebrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 95, n. 4, p. 1010–1018, 2019.

GARNACHO SAUCEDO, G. M.; SALIDO VALLEJO, R.; MORENO GIMÉNEZ, J. C. Effects of solar radiation and an update on photoprotection. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 92, n. 6, p. 377.e1-377.e9, 2020.

GASPARRINI, M. et al. Strawberry-based cosmetic formulations protect human dermal fibroblasts against UVA-induced damage. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GUEDES, J. A. C. **Estudo do perfil metabolômico de folhas de cajazeira, umbuzeiro e abacaxizeiro e sua correlação com potencial atividade anticâncer por meio de análise multivariada**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 2018.

GUIMARÃES, A. L. **Estudo fitoquímico e biológico *in vitro* de *Spondias tuberosa* arruda (Anacardiaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Vale do São Francisco: Petrolina, 2015.

HU, S.; CHEN, F.; WANG, M. Photoprotective effects of oxyresveratrol and kuwanon o on DNA damage induced by UVA in human epidermal keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 541–548, 2015.

HUBNER, A. et al. The synergistic behavior of antioxidant phenolic compounds obtained from winemaking waste's valorization, increased the efficacy of a sunscreen system. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, 2019.

HUPEL, M.; POUPART, N.; AR GALL, E. Development of a new *in vitro* method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 362–371, 2011.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KASOTE, D. M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982–991, 2015.

KHAN, M. A. Sun Protection Factor Determination Studies of Some Sunscreen Formulations Used in Cosmetics for Their Selection. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 5- s, p. 149–151, 2018.

KOSTYUK, V. et al. Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. **Rejuvenation Research**, v. 21, n. 2, p. 91–101, 2018.

LEFAHAL, M. et al. In Vitro Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Photoprotective Activities of Crude Methanolic Extract of Aerial Parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) Growing in Algeria. **Medicines**, v. 5, n. 2, p. 26, 2018.

LIMA, A. D. DA S.; SOUSA, R. G. DE; LIMA, E. N. Incremento da atividade fotoprotetora e antioxidante de cosméticos contendo extratos vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 225, 2020.

LIMA-SARAIVA, S. R. G. DE et al. Chemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Photoprotective Activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.

LINS-NETO, E. M. F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): Na Endemic Species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil - **Economy Botany**. Volume 64, n.1 – 2010 – 11-21p.

LOHANI, A.; MISHRA, A. K.; VERMA, A. Cosmeceutical potential of geranium and calendula essential oil: Determination of antioxidant activity and in vitro sun protection factor. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 550–557, 2019.

LOPES, F.M.; CRUZ, R.O.; BATISTA, K.A. Radiação ultravioleta e ativos utilizados na formulação de protetores solares. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**.vol.16, n.4, p183-199,2012.

MAIA, A. M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado). São Paulo, 2002.

MANSUR, J. DE S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. bras. dermatol**, v. 61, n. 3, p. 121–4, 1986.

MANSUR, M. C. P. P. et al. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251–258, 2016.

MARTINS, F. J. et al. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34–39, 2016.

MARTO, J. et al. The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 93–100, 2016.

MCDANIEL, D. H. et al. Evaluation of the antioxidant capacity and protective effects of a comprehensive topical antioxidant containing water-soluble, enzymatic, and lipid-

soluble antioxidants - **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology** - April 2019 - Volume 12 - Number 4 –46-53p.

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 Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 391–398, 2015.

MEJÍA-GIRALDO, J. C. et al. Photoprotective Potential of **Baccharis antioquensis** (Asteraceae) as Natural Sunscreen. **Photochemistry and photobiology**, v. 92, n. 5, p. 742–752, 2016.

MERTENS, J. et al. *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), a threatened tree of the Brazilian Caatinga? **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 3, p. 542–552, 2016.

MERTENS, J. et al. Umbuzeiro (*Spondias Tuberosa*): a systematic review. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 36, p. 179–197, 2015.

MILANI, L. P. G. et al. Extract from byproduct *Psidium guajava* standardized in ellagic acid: additivation of the in vitro photoprotective efficacy of a cosmetic formulation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 6, p. 692–696, 2018.

MISHRA, A. K.; MISHRA, A.; CHATTOPADHYAY, P. Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 3, p. 351–360, 2011.

MORDOR INTELLIGENCE. **Global Sun Care Products Market - Growth, Trends and Forecasts (2019–2024)** [Internet]. Hyderabad, India. 2018. Disponível em (acesso em junho de 2021): <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/sun-care-products-market>

MOTA, M. D. **Desenvolvimento e avaliação da atividade fotoprotetora de formulações cosméticas à base de extratos de frutos ricos em substâncias fenólicas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia: Salvador, 2020.

MOTA, M. D. et al. Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 201, n. September, p. 111639, 2019.

MOTA, M. D. et al. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum L*) ethanolic extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 205, n. February, p. 111837, 2020.

NASCIMENTO, M. S. S. T. **Desenvolvimento tecnológico de formulação fotoprotetora a base de produtos naturais**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Campo Grande, 2014.

NGOC et al. Recent Trends of Sunscreen Cosmetic: An Update Review. **Cosmetics**,

v. 6, n. 4, p. 64, 2019.

NISHIKAWA, D. O. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de formulações fotoprotetoras bioativas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo: São Paulo, 2012.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 119–123, 2018.

OLIVEIRA, M. A. M. P. Desenvolvimento de protetores solares bioativos. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias: Lisboa, 2018.

OLIVEIRA, R. G. et al. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n. 3, p. 102–105, 2013.

OLSZEWSKA, M. A. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 68, n. 6, p. 945–953, 2011.

OMENA, C. M. B. **Atividade antioxidante e anticolinesterase dos extratos etanólicos dos frutos: Siriguela *Spondias purpúrea* Linnaeus; Umbu *Spondias tuberosa* Arruda; Jenipapo *Genipa americana* Linnaeus e Mangaba *Hancornia speciosa* Gomes**. Tese (Doutorado em Ciências) -Universidade Federal de Alagoas: Maceió, 2012.

ORLANDA, J.F.F, VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 10.1590/1983-084X/14_012, p. 730–736, 2015.

PAODJUNAS, R. et al. Conhecimento tradicional e usos do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) por comunidades rurais do semiárido, Paraíba, Nordeste, Brasil. **Ethnoscintia**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2019.

PAULA, L. C. de. **Efeito De Diferentes Métodos De Conservação Sobre Os Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante De Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Goiás: Goiás, 2015.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. et al. Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. **Journal of Dermatological Science**, v. 84, n. 2, p. 169–177, 2016.

PERMANA, A. D. et al. Phytosomal nanocarriers as platforms for improved delivery of natural antioxidant and photoprotective compounds in propolis: An approach for enhanced both dissolution behaviour in biorelevant media and skin retention profiles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 205, p. 111846, 2020.

POLONINI, H. C. et al. Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 964–968, 2013.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a, **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. et al. UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin. **Archives of Dermatological Research**, v. 310, n. 5, p. 413–424, 2018.

RAMOS, R. G. et al. Estudo comparativo da composição fitoquímica, citotoxicidade e potencias antioxidante e fotoprotetor da casca e folha de *Erythrina velutina*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2525–8761, p. 33140–33158, 2020.

REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia: UFBA, Salvador. 2010, 118p.

RIBEIRO, L.O. et al. Nutrients and bioactive compounds of pulp, peel and seed from umbu fruit. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49:04, e20180806, 2019.

ROY, S. Impact of UV radiation on genome stability and human health. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 207–219, 2017.

RUFINO, M.S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**- Volume 121 – 2010- 996–1002p.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **An Bras Dermatol** - Volume 86 – 2011 - 507-15p.

SCHUCH, A. P. et al. Highly sensitive biological assay for determining the photoprotective efficacy of sunscreen. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 19, p. 11584–11590, 2014.

SEIXAS, V. C. **Desenvolvimento e avaliada da estabilidade e eficácia das formulações cosméticas contendo fosfato de cério com propriedades fotoprotetoras**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2014.

STEVANATO, R. et al. ACLU: Marijuana in Black and White. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 9, n. 3, p. 18, 2013.

SILVA, A. R. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740–746, 2012.

SILVA, G. A. da. **Avaliação da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antinoceptiva, anti-inflamatória e toxicidade do extrato**

metanólico e frações de folhas de *Spondias* sp. (Anacardiaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Natal, 2012.

SILVA, R. V. et al. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation, **Ind. Crops Prod.** 83, 509–514, 2016.

SILVA, A. C. P. et al. Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, n. January, p. 162–171, 2019.

SILVEIRA, J. P. S. et al. Photoprotective and antioxidant effects of Rhubarb: Inhibitory action on tyrosinase and tyrosine kinase activities and TNF- α , IL-1 α and α -MSH production in human melanocytes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 2, 2013.

SIQUEIRA, E. M. da S. ***Spondias tuberosa* Arr. (Umbu): Estudo fitoquímico e avaliação do potencial anti-inflamatório.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Natal, 2015.

SKROVANKOVA, S. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673–24706, 2015.

SMERILLI, A. et al. Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom skeletonema marinoi. **Antioxidants**, v. 8, n. 6, 2019.

SOUZA, C.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants Spirulina and dimethylmethoxy chromanol on sun-induced skin damage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. March, p. 52–64, 2017.

STAFUSSA, A.P. et al. Bioactive compounds of 44 traditional and exotic Brazilian fruit pulps: phenolic compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Properties**, 2018, vol. 21, n° 1, 106-118.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015.

TEIXEIRA, S. M. M. C. G. **Veiculação de filtros solares utilizados na fotoproteção.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Fernando Pessoa: Porto, 2012.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Sunscreen drug products for over-the-counter human use: proposed rule.** **Federal Register**. [s.l: s.n.]. Disponível em, acesso em fevereiro de 2021: <https://www.federalregister.gov/documents/2019/02/26/2019-03019/sunscreen-drug->

products-for-over-the-counter-human-use.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Major Fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, 111, 816–823, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.054.

WANG, S. Q., OSTERWALDER, U.; JUNG, K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. **Journal of American Dermatology**, 65(3), 525–530p, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, non-melanoma and melanoma skin cancer, both sexes, all ages Cancer Tomorrow** [Internet], 2019.

Disponível em, acesso em junho de 2021: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=900&cancers=17&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=500000&print=0

WRÓBLEWSKA, K. B. et al. In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. November 2018, p. 208–215, 2019.

YANG, S. I. et al. Reliable and simple spectrophotometric determination of sun protection factor: A case study using organic UV filter-based sunscreen products. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 518–522, 2018.

ZERAIK, M. L. et al. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits- **Journal of Functional Foods** – Volume 21 – 2016 - 396–405p.

ZINK, B.S. Câncer de pele: a importância do seu diagnóstico, tratamento e prevenção. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, 2014;13(Supl. 1):76-83.

Anexo A: Comprovante de aceite do Artigo “Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes *in vitro*”.

Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas

Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Bogotá D. C., Colombia, 15 de octubre de 2021.

Profesora

Dra. EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY
Medicines Research and Analysis Center (MRaAC),
Department of Medicine,
Faculty of Pharmacy,
Federal University of Bahia,
Salvador, Bahia, Brazil

Estimada colega Edith Cristina,

Mediante esta comunicación me es grato informarle que su manuscrito titulado “**Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes *in vitro***”, escrito por Tailaine Nascimento de Castro, Milleno Dantas Mota, y Edith Cristina Laignier Cazedey, ha sido aceptado para publicación en nuestra revista (Vol. 51, No. 2, agosto de 2022).

En este orden de ideas, esperamos enviarle las respectivas pruebas de imprenta tan pronto como sea posible.

Sin otro particular y agradeciendo por la atención prestada me suscribo de usted.

Cordial saludo,

Prof. Fleming Martínez R., D.Sc.
Director-Editor RCCQF

2
AÑOS
Bicentenario
0

[Página 1 de 1]
Elaboró: F. Martínez

Av. Carrera 30 # 45-03 - Ciudad Universitaria
Edificio 450, FARMACIA
(+57 1) 3165080 - (+57 1) 3165000 Ext. 14608
Bogotá, D. C., Colombia
fmartinezr@unal.edu.co

Proyecto
cultural y colectivo
de nación

