



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SARAH RAQUEL GOMES DE LIMA-SARAIVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA COM EFEITO
FOTOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE PLANTA NATIVA DA CAATINGA.**

RECIFE

2017

SARAH RAQUEL GOMES DE LIMA-SARAIVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA COM EFEITO
FOTOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE PLANTA NATIVA DA CAATINGA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco; como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Coorientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

RECIFE

2017

Catálogo na fonte:

bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S243d Saraiva, Sarah Raquel Gomes de Lima.

Desenvolvimento de uma formulação cosmética com efeito fotoprotetor e antioxidante de planta nativa da caatinga / Sarah Raquel Gomes de Lima Saraiva. – Recife: o autor, 2017.

134 f.; il; 30 cm.

Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Inclui referências, apêndices, figuras e tabelas.

1. Protetores solares. 2. Flavonoides. 3. Antioxidantes. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 116)

SARAH RAQUEL GOMES DE LIMA-SARAIVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA COM EFEITO
FOTOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE PLANTA NATIVA DA CAATINGA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco; como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada: 11/12/ 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a.: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim- (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr.: Luiz Alberto Soares- (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a.: Terezinha Gonçalves da Silva- (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a.: Cláudia Sampaio de Andrade Lima- (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr.: Tadeu Peixoto Sobrinho- (Examinador externo)
Centro Universitário do Vale do Ipojuca

"Cristo é a minha força, a Oração é meu baluarte, a Fé é meu escudo."

Santa Rosa de Lima

Dedico este trabalho aos meus familiares, e em especial, aos meus pais Antônio Francisco e Maria da Conceição, ao meu esposo Henrique Saraiva e ao meu filho Isaac que me apoiaram em todos os momentos, sempre com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Grande é a minha lista de agradecimentos, e por isso me considero uma pessoa de sorte. Primeiramente, agradeço a **Deus**, o meu supremo guia e protetor, que está sempre presente em minha vida.

À minha orientadora, a minha querida professora **Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim**. Sem ela não estaria concretizando este sonho.

Ao Prof. Dr. **Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida**, o meu coorientador, agradeço não só pela oportunidade e atenção, mas também pela valiosa orientação.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**, e a todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (**FACEPE**) pelo auxílio financeiro e bolsa de doutorado.

A **Antônio Francisco de Lima e Maria da Conceição Gomes de Lima**, meus pais, que são os pilares da minha vida, sempre me proporcionaram educação, mesmo com dificuldades. E se cheguei até aqui, foi fruto de sacrifício e renúncia deles. Eles são para mim exemplo de perseverança. Só tenho a agradecer por isso.

Ao meu companheiro de todas as horas, meu esposo **Henrique César Costa Saraiva**, obrigada por todo o carinho, amor, paciência, compreensão, pelo incentivo diário, pelas noites e fins de semana perdidos comigo no laboratório e principalmente pela mão amiga que esteve presente nos momentos de angústia sempre me confortando e me fazendo acreditar que eu sou capaz. Eu só tenho a agradecer por você existir em minha vida. Amo-te, muito!

Ao meu filho **Isaac**, por me dar o melhor dos títulos, o de mãe.

Minha linda Família, Tias, Tios, Primos e em especial aos meus irmãos, **Lívia, Guilherme e Pedro Henrique**. Tia Bia, Dona Verônica e Tia Fátima que foram apoio moral, emocional e físico, me ajudando nos momentos que mais precisei.

À **UNIVASF** principalmente a Professora **Dra. Larissa Araújo Rolim**.

Aos Técnicos **Silvio Alan e Ana Paula**, pela ajuda e amizade.

À todos do **LAPRONAT** (Laboratório de Produtos Naturais), principalmente a **Bruno, Allan, Valerium e Tadeu**.

À todos do **NEPLAME** e em especial alguns alunos que me ajudaram ativamente **Juliane, Celuane, Cristiane, Raira, Michelle, Noely**.

Agradeço de todo coração as minhas amigas **Yeslândia, Rafaela, Mayara e Lets e Fernanda Granja** que me ajudaram bastante nos momentos em que mais precisei, não só ajuda em experimentos, escrita, mas, principalmente, aquela ajuda amiga de estar junto me ouvindo e incentivando em todos os momentos.

Aos colegas da UFPE da turma de farmácia 2009.1: **Princípios Ativos;**

À **comunidade dos vivos** e em especial ao meu vínculo e irmãos espirituais **Cláudio, Wagner Reis, Rayana, Caio, Juliane** pelas orações e apoio físico e espiritual concedido. Todos do vínculo de primeira etapa e segunda etapa. Ao padre Cleiton.

Às minhas amigas **Anne Caroline, Letícia (Lets), Herbene, Lair, Dona Nair e Pollyana Moura** pelo apoio e carinho incondicional.

Amigas que mesmo distante, sempre se fizeram presentes: **Jeanne, Natália, Pollyana, Katarina, Isabella, Mônica, Maralisa, Gláucia.**

Ana Lúcia, Fabíola, Danielle, Karol e Adcarla e todos os colegas de trabalho pelo apoio e compreensão concedida ao longo de todo processo.

Maria Jaide, Tatiana, Regina e Deise, pessoas que cuidam da nossa vida com muito amor!

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente com mais essa conquista.

Obrigada!

RESUMO

A Caatinga é um bioma rico em biodiversidade com vegetação adaptada ao clima semiárido, o qual devido a incidência solar elevada ocorre interferência sobre a morfologia e metabólitos secundários produzidos. Alguns destes compostos sintetizados servem de proteção contra a radiação ultravioleta. As duas espécies selecionadas, *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Sb) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (Pp) são plantas nativas da Caatinga que apresentam elevadas concentrações de compostos capazes de absorverem a luz ultravioleta, havendo, assim, possibilidade do uso dos extratos das referidas plantas para o desenvolvimento de filtros solares em preparações cosméticas. O objetivo do estudo foi avaliar as atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos de (Sb-EtOH) e Pp (Pp-EtOH), assim como, analisar quimicamente, e verificar o perfil de segurança das amostras para desenvolver uma formulação cosmética com propriedade fotoprotetora. Após coleta e o processamento dos materiais vegetais, estes passaram pelo controle de qualidade e produção dos extratos. Foram realizadas diversas atividades, tais como: triagem fitoquímica, análise por HPLC, avaliação da atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical DPPH, inibição da auto-oxidação do β -caroteno, determinação *in vitro* do fator de proteção solar, toxicidade aguda, desenvolvimento de uma formulação cosmética e estudo de estabilidade preliminar. As drogas vegetais de Sb e Pp estão de acordo com o controle de qualidade. Sb-EtOH apresentou maiores dosagens de fenóis totais, flavonoides e melhores atividades antioxidante e fotoprotetora. Ambos extratos apresentaram baixa toxicidade aguda. O resultado da análise comparativa selecionou o extrato de Sb. Quatro formulações bases foram obtidas, após testes duas foram escolhidas: emulsão Lanette® e gel de Carbopol®. Depois da incorporação dos extratos de Sb e filtros UVAB e controle de estabilidade, as formulações de Lanette® não foram estáveis. Sendo assim, os extratos de (Sb) apresentaram melhores resultados para as atividades antioxidantes, assim como, ação fotoprotetora. Para as formulações, o gel de Carbopol® apresentou melhores valores de FPS, assim como, mostrou-se estável no teste de estabilidade preliminar.

Palavras-chave: Protetores Solares. Flavonoides. Antioxidantes.

ABSTRACT

The Caatinga is a biome rich in biodiversity with vegetation adapted to the semi-arid climate, which due to high solar incidence interferes on the morphology and secondary metabolites produced. Some of these compounds synthesized serve as protection against ultraviolet radiation. The selected species, *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Sb) and *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz (Pp) are native plants of the Caatinga that have high concentrations of compounds capable of absorbing ultraviolet light, therefore, it is possible to use the extracts of these plants for the development of sunblockers in cosmetic preparations. The objective of the study was to evaluate the photoprotective and antioxidant activities of the extracts of (Sb-EtOH) and Pp (Pp-EtOH), as well as to chemically analyze and verify the safety profile of the samples to develop a cosmetic formulation with photoprotective properties. After gathering and processing the plant materials, they underwent a quality control and production of the extracts. Several activities were carried out, such as: phytochemical screening, HPLC analysis, evaluation of antioxidant activity by DPPH radical sequestration methods, inhibition of β -carotene auto-oxidation, in vitro determination of sun protection factor, acute toxicity, development of a cosmetic formulation and preliminary stability study. The vegetable drugs of Sb and Pp are in agreement with the quality control. Sb-EtOH presented higher dosages of total phenols, flavonoids and better antioxidant and photoprotective activities. Both extracts presented low acute toxicity. The result of the comparative analysis selected the extract of Sb. Four base formulations were obtained, after which two tests were chosen: Lanette[®] emulsion and Carbopol[®] gel. After the incorporation of Sb extracts and UVAB filters and stability control, the Lanette[®] formulations were not stable. Therefore, the extracts of (Sb) presented better results for the antioxidant activities, as well as, photoprotective action. For the formulations, the Carbopol[®] gel had better FPS values, as well as, it was stable in the preliminary stability test.

Keywords: Sunscreening Agents. Flavonoids. Antioxidants.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Diluição em série do extrato vegetal para a atividade hemolítica. | 42 |
| Tabela 2: Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar os principais metabólitos secundários..... | 43 |
| Tabela 3: Tabela do gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa na análise por CLAE de Sb-EtOH..... | 44 |
| Tabela 4: Tabela do gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa na análise por CLAE de Pp-EtOH..... | 45 |
| Tabela 5: Produto da função usada para calcular o FPS..... | 47 |
| Tabela 6: Caracterização fitoquímica de extratos de <i>S. brasiliensis</i> e <i>P. pyramidalis</i> | 58 |
| Tabela 7: Conteúdo de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e β -caroteno dos extratos de Sb-EtOH e de Pp-EtOH..... | 63 |
| Tabela 8: Valores do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> dos extratos de <i>S. brasiliensis</i> e <i>P. pyramidalis</i> | 71 |
| Tabela 9: Formulação padronizada da base gel Aristoflex [®] | 84 |
| Tabela 10: Formulação padronizada da base gel Carbopol [®] | 84 |
| Tabela 11: Formulação padronizada da base Polawax [®] | 85 |
| Tabela 12: Formulação padronizada da base Lanette [®] | 86 |
| Tabela 13: Composição das formulações fotoprotetoras..... | 89 |
| Tabela 14: Conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e β -caroteno..... | 95 |
| Tabela 15: Características iniciais das oito amostras desenvolvidas, antes e após o a avaliação da estabilidade..... | 105 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01: Locais identificados de ocorrência natural de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. no Brasil..... | 26 |
| Figura 02: Árvores e folhas da espécie <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl..... | 27 |
| Figura 03: Folhas, vagem e flores da espécie <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz..... | 29 |
| Figura 04: Distribuição geográfica no Brasil da espécie <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz..... | 29 |
| Figura 05: Incidência da radiação UVA e UVB sobre a pele..... | 31 |
| Figura 06: Fontes de espécies reativas na pele e mecanismo de defesa..... | 32 |
| Figura 07: Exsicata de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl..... | 38 |
| Figura 08: Exsicata de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz..... | 39 |
| Figura 09: Pó das cascas de <i>S. brasiliensis</i> | 50 |
| Figura 10: Pó das folhas de <i>P. pyramidalis</i> | 50 |
| Figura 11: Material estranho de droga vegetal de <i>S. brasiliensis</i> (Dv-Sb) | 52 |
| Figura 12: Histograma de distribuição granulométrica das cascas de <i>S. brasiliensis</i> | 52 |
| Figura 13: Histograma de distribuição granulométrica das folhas de <i>P. pyramidalis</i> | 53 |
| Figura 14: Volume ocupado por Dv-Sb e Dv-Pp acrescido da mucilagem..... | 55 |
| Figura 15: Espuma persistente produzida pela droga vegetal <i>S. brasiliensis</i> | 56 |
| Figura 16: Triagem para verificação da hemólise a partir das diluições o extrato vegetal de <i>S. Brasiliensis</i> | 57 |
| Figura 17: <i>Fingerprint</i> do extrato das cascas de <i>S. brasiliensis</i> | 59 |
| Figura 18: Estrutura química da catequina e epicatequina..... | 60 |
| Figura 19: Estrutura química da apigenina..... | 60 |
| Figura 20: Estrutura química do ácido gálico..... | 60 |
| Figura 21: <i>Fingerprint</i> do extrato das folhas de <i>P. pyramidalis</i> | 61 |
| Figura 22: Estrutura química da escopoletina..... | 62 |
| Figura 23: Estrutura química da rutina..... | 62 |
| Figura 24: Estrutura química da epigalocatequina..... | 63 |
| Figura 25: Perfil da absorção espectrofotométrica do extrato de <i>S. brasiliensis</i> | 66 |
| Figura 26: Perfil da absorção espectrofotométrica do extrato de <i>P. pyramidalis</i> | 67 |
| Figura 27: Perfil da absorção espectrofotométrica comparativa entre os extratos de <i>S. brasiliensis</i> e <i>P. pyramidalis</i> | 68 |

| | |
|--|-----|
| Figura 28: Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> de Sb-EtOH..... | 69 |
| Figura 29: Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> de Pp-EtOH..... | 70 |
| Figura 30: Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> dos extratos de <i>S. brasiliensis</i> e <i>P. pyramidalis</i> | 70 |
| Figura 31: Consumo de líquido pelos animais machos tratados com Sb- EtOH... | 73 |
| Figura 32: Consumo de líquido pelos animais fêmeas tratadas com Sb- EtOH. | 73 |
| Figura 33: Consumo de alimentos pelos machos tratados com Sb-EtOH..... | 74 |
| Figura 34: Consumo de alimentos pelas fêmeas tratadas com Sb-EtOH..... | 74 |
| Figura 35: Consumo de líquido pelos animais machos tratados com Pp-EtOH... | 75 |
| Figura 36: Consumo de líquido pelos animais fêmeas tratadas com Pp-EtOH.... | 75 |
| Figura 37: Consumo de alimentos pelos machos tratados com Pb-EtOH..... | 76 |
| Figura 38: Consumo de alimentos pelas fêmeas tratadas com Pb-EtOH..... | 76 |
| Figura 39: Ganho de peso dos machos tratados com Sb-EtOH..... | 77 |
| Figura 40: Ganho de peso das fêmeas tratadas com Sb-EtOH. | 77 |
| Figura 41: Ganho de peso dos machos tratados com Pp-EtOH..... | 78 |
| Figura 42: Ganho de peso das fêmeas tratadas com Pp-EtOH..... | 78 |
| Figura 43: Massa dos órgãos dos machos tratados com Sb-EtOH..... | 79 |
| Figura 44: Massa dos órgãos das fêmeas tratadas com Sb-EtOH..... | 79 |
| Figura 45: Massa dos órgãos dos machos tratados com Pp-EtOH..... | 80 |
| Figura 46: Massa dos órgãos das fêmeas tratadas com Pp-EtOH..... | 80 |
| Figura 47: Desenvolvimento farmacotécnico da base emulsão..... | 86 |
| Figura 48: Viscosímetro..... | 91 |
| Figura 49: Bases (veículos) utilizados para obter formulações fotoprotetoras... | 92 |
| Figura 50: Formulações: emulsões L0 e P0 e géis G0 e A0, após o teste de centrifugação..... | 92 |
| Figura 51: Incorporação do extrato fluido de <i>S. brasiliensis</i> em diversas bases... | 93 |
| Figura 52: Potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos fluidos de <i>S. brasiliensis</i> | 94 |
| Figura 53: Extratos fluidos de <i>S. brasiliensis</i> | 95 |
| Figura 54: Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> de extrato fluido de <i>S. brasiliensis</i> | 96 |
| Figura 55: Amostras das formulações de gel e emulsão..... | 98 |
| Figura 56: Gráfico do FPS das formulações de gel Carbopol®, antes da estabilidade..... | 99 |
| Figura 57: Gráfico do FPS das formulações de emulsão Lanette®, antes da estabilidade..... | 99 |
| Figura 58: Viscosidade das amostras do gel de Carbopol®..... | 100 |

| | |
|---|-----|
| Figura 59: Viscosidade das amostras da emulsão Lanette® | 101 |
| Figura 60: Espalhabilidade das amostras do gel de Carbopol® | 102 |
| Figura 61: Espalhabilidade das amostras de emulsão Lanette® | 102 |
| Figura 62: Alterações na coloração das formulações Lanettes® | 103 |
| Figura 63: Separação de fases das formulações Lanettes® | 104 |

SIGLAS

A0: Gel Aristoflex®
ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA: Butil Hidroxianisol
BHT: Butil Hidroxitolueno
CE₅₀: Concentração Eficiente
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CIE: Comissão Internacional de Radiação
CLAE: Cromatografia Líquido de Alta Eficiência
DAD: Detector de Arranjo de Diodos
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
Dv-Sb: Droga Vegetal de *S. brasiliensis*
Dv-Pp: Droga Vegetal de *P. pyramidalis*
DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
FPS: Fator de Proteção Solar
HVASF: Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco
IE: Índice de Espuma
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IV: Radiação Infravermelha
MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura
PABA: Ácido P-Amino Benzóico
PBS: Tampão de Fosfato de Sódio
Pp-EtOH: Extrato Etanólico Bruto de *P. pyramidalis*
Sb-EtOH: Extrato Etanólico Bruto de *S. brasiliensis*
Sb-FI: Extrato Fluido de *S. brasiliensis*
SOD: Superóxido Dismutase
UV: Radiação Ultravioleta
UVA: Radiação Ultravioleta tipo A
UVB: Radiação Ultravioleta tipo B
UVC: Radiação Ultravioleta tipo C
Vis: Luz Visível

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivos gerais..... | 24 |
| 2.1.1 Objetivos Específicos | 24 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 26 |
| 3.1 Considerações sobre as espécies de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. e <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz | 26 |
| 3.1.1 <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. (Anacardiaceae) | 26 |
| 3.1.2 <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae)..... | 28 |
| 3.2 Radiação solar e efeitos sobre a pele | 29 |
| 3.3 Fotoproteção | 33 |
| 3.4 Composição de fotoprotetores e forma farmacêutica | 35 |
| 3.4.1 Gel..... | 35 |
| 3.4.2 Emulsão | 36 |
| 4 CAPÍTULO I | 39 |
| 4.1 Parte Experimental I..... | 39 |
| 4.1.1 Coleta e identificação botânica..... | 39 |
| 4.1.2 Processamento do material vegetal | 40 |
| 4.1.3 Controle de qualidade da droga vegetal..... | 40 |
| 4.1.3.1 Determinação de matéria estranha | 41 |
| 4.1.3.2 Determinação de água em drogas vegetais (método gravimétrico) | 41 |
| 4.1.3.3 Determinação de cinzas totais | 41 |
| 4.1.3.4 Determinação de cinzas sulfatadas..... | 41 |
| 4.1.3.5 Determinação do índice de intumescência..... | 42 |
| 4.1.3.6 Determinação da granulometria | 42 |
| 4.1.3.7 Determinação do índice de espuma..... | 42 |
| 4.1.3.8 Atividade hemolítica | 43 |
| 4.1.3.9 Determinação do pH..... | 43 |
| 4.1.4 Obtenções dos extratos etanólicos brutos..... | 43 |
| 4.1.5 Avaliação fitoquímica preliminar | 44 |
| 4.1.6 Análise dos extratos por CLAE-DAD | 45 |
| 4.1.7 Métodos espectrofotométricos | 46 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 4.1.7.1 | Determinação do conteúdo fenólico total | 46 |
| 4.1.7.2 | Determinação do conteúdo de flavonoides | 46 |
| 4.1.7.3 | Avaliação da atividade antioxidante | 47 |
| 4.1.7.3.1 | Método do sequestro do radical DPPH | 47 |
| 4.1.7.3.2 | Método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno | 47 |
| 4.1.7.4 | Determinação in vitro do fator de proteção solar (FPS)..... | 48 |
| 4.1.8 | Avaliação da toxicidade aguda dos extratos | 49 |
| 4.1.8.1 | Animais..... | 49 |
| 4.1.8.2 | Toxicidade aguda | 49 |
| 4.1.9 | Análises estatísticas | 49 |
| 4.2 | RESULTADOS DA PARTE I | 51 |
| 4.2.1 | Materiais vegetais | 51 |
| 4.2.2 | Controle de qualidade da droga vegetal..... | 52 |
| 4.2.2.1 | Análise de matéria estranha..... | 52 |
| 4.2.2.2 | Determinação da distribuição granulométrica das drogas vegetais | 53 |
| 4.2.2.3 | Determinação de perda de água por dessecação..... | 54 |
| 4.2.2.4 | Determinação de cinzas totais e sulfatadas | 55 |
| 4.2.2.5 | Determinação do índice de intumescência..... | 55 |
| 4.2.2.6 | Determinação do índice de espuma (IE) | 56 |
| 4.2.2.7 | Atividade hemolítica | 57 |
| 4.2.2.8 | Determinação do pH..... | 58 |
| 4.2.3 | Triagem Fitoquímica..... | 59 |
| 4.2.4 | Análise dos extratos por CLAE-DAD..... | 60 |
| 4.2.5 | Métodos espectrofotométricos | 64 |
| 4.2.5.1 | Teores de fenóis totais, flavonoides, taninos e atividade antioxidante . | 64 |
| 4.2.5.2 | Fator de proteção solar (FPS)..... | 67 |
| 4.2.6 | Toxicidade aguda | 73 |
| 4.2.6.1 | Avaliação comportamental dos camundongos..... | 73 |
| 4.2.6.2 | Consumo de alimento e água..... | 73 |
| 4.2.6.3 | Variação da massa corporal..... | 78 |
| 4.2.6.4 | Análise macroscópica e massa dos órgãos | 80 |
| 5 | CAPÍTULO II | 85 |
| 5.1 | Parte Experimental II..... | 85 |
| 5.1.1 | Desenvolvimento das formulações..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| 5.1.1.1.1 Gel de Aristoflex® | 85 |
| 5.1.1.1.2 Gel de Carbopol® | 86 |
| 5.1.1.1.3 Emulsão de Polawax® | 87 |
| 5.1.1.1.4 Emulsão de Lanette® | 87 |
| 5.1.3 Preparo dos extratos para incorporação | 89 |
| 5.1.3.1 Preparo do extrato fluido | 89 |
| 5.1. 4 Métodos espectrofotométricos | 90 |
| 5.1.4.1 Determinação do conteúdo fenólico total de extratos hidroetanólicos.. | 90 |
| 5.1.4.2 Método do sequestro do radical DPPH de extratos hidroetanólicos..... | 90 |
| 5.1.4.3 Método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno de extratos hidroetanólicos | 90 |
| 5.1.4.4 Determinação in vitro do fator de proteção solar (FPS) de extratos hidroetanólicos | 90 |
| 5.1.5 Estudo preliminar de incorporação do extrato nas bases e análise de compatibilidade. | 90 |
| 5.1.6. Estudo de estabilidade preliminar | 91 |
| 5.1.6.1 Propriedades organolépticas | 91 |
| 5.1.6.2 Determinação do pH..... | 91 |
| 5.1.6.3 Determinação da espalhabilidade | 92 |
| 5.1.6.4 Teste de Congelamento e Descongelação | 92 |
| 5.1.6.5 Teste de resistência à centrifugação | 92 |
| 5.1.6.6 Viscosidade relativa..... | 92 |
| 5.2 RESULTADOS DA PARTE II | 93 |
| 5.2.1 Desenvolvimento das formulações, incorporação dos extratos e análise de compatibilidade | 93 |
| 5.2.2 Análises dos extratos fluidos de <i>S. brasiliensis</i> | 96 |
| 5.2.3 FPS, Teores de fenóis totais e atividade antioxidante | 97 |
| 5.2.4 Formulações fotoprotetoras e estudo de estabilidade preliminar | 99 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 109 |
| REFERÊNCIAS..... | 113 |
| APÊNDICE I | 125 |
| Aprovação do comitê de ética | 125 |
| APÊNDICE II | 126 |
| Artigo publicado - The Scientific World Journal, Impact Factor 1.219. | 126 |

| | |
|---|-----|
| APÊNDICE III..... | 127 |
| Declaração da Diretoria de Inovação: Patente depositada. | 127 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, é constituída por aproximadamente 844 mil quilômetros quadrados, o que corresponde a 11% do território nacional. É um bioma rico em biodiversidade e vegetação adaptada ao seu clima semiárido, com espécies endêmicas, na qual já foram registradas mais de 1500 espécies em sua flora (BRASIL, 2011). Devido a sua localização geográfica e, sua proximidade à linha do Equador, a região possui médias de temperaturas elevadas, além de um elevado número de horas de sol ao ano, cerca de 3.000 horas, e índices acentuados de evapotranspiração (SUASSUNA, 2002), a qual é justificada pela incidência perpendicular dos raios solares sobre a superfície do solo, entre outros fenômenos meteorológicos.

A incidência solar elevada neste bioma interfere diretamente sobre a morfologia da vegetação e, principalmente, sobre os constituintes químicos que a compõem, já que, de acordo com a literatura, o teor de flavonoides produzidos por uma planta é considerado um fator importante de proteção contra a radiação ultravioleta (MARKHAN, 1998).

O sol emite a radiação ultravioleta, a qual é dividida de acordo com os comprimentos de onda em: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC é absorvida pela camada de ozônio na estratosfera e representa baixa porcentagem da luz solar na superfície da Terra. As radiações UVB e UVA, por outro lado, são importantes do ponto de vista biológico, pois podem causar diversas alterações na pele, tais como: pigmentação irregular, telangiectasias, fotoenvelhecimento, lesões pré-malignas e malignas. A escolha de novos ativos fotoprotetores envolve, principalmente, a capacidade de absorção da luz ultravioleta pelos cromóforos de cada molécula.

De acordo com Flor, Davolos, Correa (2007), geralmente estruturas que contêm anéis aromáticos com substituinte doador de elétrons podem absorver a radiação UV, que ao absorvê-la excitam os elétrons das insaturações, os quais após retornarem para o estado fundamental - tendo em vista se tratar de um processo não permanente - liberam o excesso de energia absorvida em forma de calor. Dessa forma, há vários produtos naturais com estruturas contendo anéis aromáticos de

outras classes de metabólitos secundários, como, por exemplo, derivados do ácido cafeico, lignanas e flavonoides.

Várias espécies de plantas nativas da Caatinga apresentam elevadas concentrações de compostos fenólicos, tais como os flavonoides, os quais são substâncias capazes de absorverem a luz ultravioleta, e cujo espectro de absorção ocorre com dois picos máximos, um entre 240-280 nm e outro a 300-550 nm. Assim, há a possibilidade do uso dessas espécies vegetais para o desenvolvimento de filtros solares em preparações fotoprotetoras, já que em sua composição predominam tais compostos (BOBIN, RAYMOND; MARTINI, 1995). Desse modo, foram selecionadas as espécies: *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz, embora ambas espécies não sejam utilizadas como fotoprotetora, apresentam em sua composição metabólitos secundários potencialmente aplicáveis para este fim.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do estudo foi avaliar as atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz, assim como, analisar quimicamente, e verificar o perfil de segurança das amostras para desenvolver uma formulação cosmética com propriedade fotoprotetora.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Realizar o controle de qualidade das drogas vegetais;
- Obter extratos de cascas de *S. brasiliensis* (Sb-EtOH);
- Obter extratos de folhas de *P. pyramidalis* (Pp-EtOH);
- Realizar triagem fitoquímica;
- Identificar qualitativamente constituintes químicos presentes nos extratos de Sb-EtOH e Pp-EtOH através de métodos cromatográficos, CLAE-DAD;
- Avaliar atividade antioxidante de Sb-EtOH e Pp-EtOH;
- Avaliar atividade fotoprotetora *in vitro* de Sb-EtOH e Pp-EtOH;
- Avaliar estudo de toxicidade aguda de Sb-EtOH e Pp-EtOH;
- Selecionar entre Sb-EtOH e Pp-EtOH o extrato da espécie que apresentar melhores resultados;
- Realizar o estudo de pré-formulação para a obtenção das formulações;
- Incorporar o extrato nas formulações;
- Realizar as análises do FPS das formulações;
- Realizar teste de estabilidade preliminar (propriedades organolépticas, pH, viscosidade, resistência a centrifugação, espalhabilidade e teste de gelo e degelo).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre as espécies de *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz

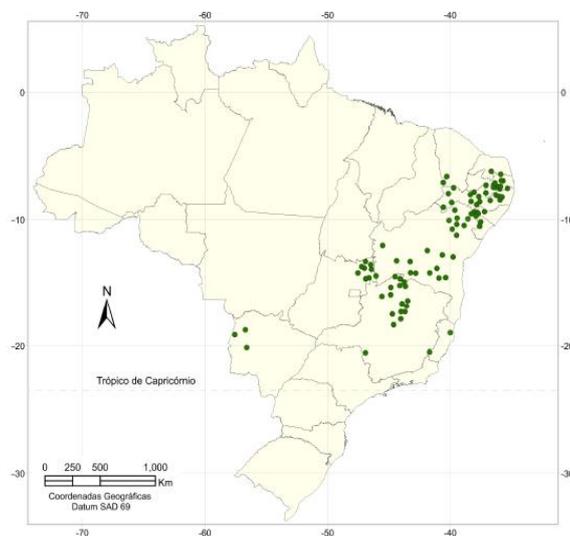
3.1.1 *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)

O gênero *Schinopsis* Engl. pertence à família Anacardiaceae, classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae, superordem: Rosanae e ordem Sapindales (PRADO et al., 1996), *S. brasiliensis* é uma árvore endêmica do Brasil (SARAIVA et al., 2013).

A etimologia do gênero *Schinopsis* significa “parecido com *Schinus*”, uma aroeira com ocorrência no Sul e no Sudeste do Brasil; o epíteto específico *brasiliensis* é devido ao material ter sido coletado no Brasil (CARVALHO, 2009).

No Brasil, essa espécie ocorre distribuídas geograficamente nas seguintes regiões: Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais) conforme representado na Figura 1.

Figura 1: Locais identificados de ocorrência natural de *Schinopsis brasiliensis* Engl. no Brasil.



Fonte: Carvalho, 2009.

A espécie em estudo, *S. brasiliensis* é popularmente conhecida como baraúna, braúna ou braúna-do-Sertão. O nome vulgar, braúna, vem do nome tupi *ibirá-uma* (madeira preta) ou *muira-uma* (*muira*= madeira; *uma*= preto) (CARVALHO, 2009).

É uma árvore típica da Caatinga, altura que varia de 10 a 12 m de altura, cerca de 60 cm de diâmetro e com ramos providos de espinhos fortes (ENGLER, 1879; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2008). As folhas são compostas, imparipinadas, de cor verde escuras na parte superior e pálidas na inferior (BRAGA, 1976), figura 2. Sua madeira é de grande valor econômico, apresenta cerne duro, resistência a fungos xilófagos (PAES; MORAIS; LIMA, 2004).

Figura 2: Árvores e folhas da espécie *Schinopsis brasiliensis* Engl.



Fonte: HVASF, 2017.

Do ponto de vista madeireiro é uma das espécies mais importantes da Caatinga. O emprego irracional para esses e outros fins fez com que o seu nome fosse incluído na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992).

S. brasiliensis se assemelha com a aroeira verdadeira, mas pode ser facilmente distinguida pelas folhas menores, menos pilosas e de menor odor de resina, e pelos frutos que têm uma asa e medem aproximadamente 3 cm, enquanto os da aroeira parecem pimenta-do-reino, dotados de cinco asas miúdas. Contudo,

na época seca, quando despidas de suas folhas, as duas espécies podem ser diferenciadas pela casca que, na aroeira, desprende-se em lâminas delgadas, alongadas e recurvadas de baixo para cima (DANTAS et al., 2008).

3.1.2 *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae)

Fabaceae, anteriormente Leguminosae, é considerada a família mais representativa do bioma Caatinga, compreendendo cerca de um terço das espécies catalogadas (CORDULA; MORIM; ALVES, 2014). Estudos realizados sobre a biodiversidade deste bioma demonstram diversas espécies vegetais endêmicas e ameaçadas. O gênero *Caesalpinia* é composto por árvores e arbustos tropicais ou subtropicais e compreende mais de 150 espécies no mundo.

Houve uma reclassificação taxonômica de várias espécies do gênero *Caesalpinia* reunindo *C. pyramidalis* no gênero *Poincianella* (QUEIROZ, 2009).

P. pyramidalis é popularmente conhecida como “catingueira-verdadeira”, “catingueira”, “pau-de-rato”. É uma árvore endêmica da região Nordeste que apresenta grande potencial econômico por causa da sua rusticidade e do seu aproveitamento madeireiro, do potencial para reflorestamento, do uso medicinal como diurético, digestivo e antipirético (BAHIA; JUCENI; DAVID, 2010) devido as suas propriedades extrativas (MAIA, 2004).

A catingueira é uma árvore que atinge até 4 metros, com folhas bipinadas, alternos, obtusos e oblongos, as flores são amarelas dispostas em racemos pouco maiores do que as folhas, sua vagem é achatada, conforme figura 03 (BRAGA, 1976).

As análises e fitoquímicas revelaram a presença de flavonoides, taninos, iridoides e triterpenos nos diferentes extratos, porém não foram detectados alcaloides e cumarinas. Já o levantamento bibliográfico da fitoquímica da espécie *P. pyramidalis* realizado por Bahia; Juceni; David (2010) foram assinaladas informações como o isolamento de vários metabólitos secundários, destacando-se polifenóis e terpenoides, bem como derivados antracênicos, flavonoides e monoterpenos. Na medicina popular as flores, folhas e cascas são usadas no tratamento de infecções, ainda apresentam ação antipirética e diurética (MENDES et al., 2000).

Figura 3: Folhas, vagem e flores da espécie *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.



Fonte: HVASF, 2017.

Figura 4: Distribuição geográfica no Brasil da espécie *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.



Fonte: Flora do Brasil, 2017.

3.2 Radiação solar e efeitos sobre a pele

As agressões provocadas pelo sol à pele não se limitam às queimaduras solares, cujas manifestações são (rubor, edema, formação de bolha), as agressões à pele são na verdade cumulativas e irreversíveis, e podem levar a alterações nas fibras de colágeno, elastina e até a fotocarcinogênese (PURIM, LEITE, 2010).

O espectro solar terrestre compreende três zonas de radiação: a luz visível (Vis), a ultravioleta (UV) e a infravermelha (IV). Segundo a Comissão Internacional de Radiação (CIE), este conjunto é denominado de radiação óptica (SLINEY, 2007).

Apesar das discrepâncias dos valores encontrados na literatura, os espectros solares nos proporcionam aproximadamente 10, 40 e 50% respectivamente, das radiações UV, Vis e IV (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

As radiações IV possuem comprimentos de onda superiores a 780 nm, sendo essencialmente calóricas e fortemente absorvidas pelo vapor de água e gás carbônico, além de estar intimamente ligadas às mudanças climáticas no planeta. A luz visível apresenta comprimentos de onda de 400 a 780 nm e possuem graus diversos de energia calórica, luminosas e químicas, é a radiação que menos sofre atenuação ao atravessar a atmosfera terrestre. Já a radiação UV são radiações extremamente energéticas e didaticamente são divididas em três UVA λ longas, UVB λ medianas e UVC λ curtas (SCHALKA et al., 2014).

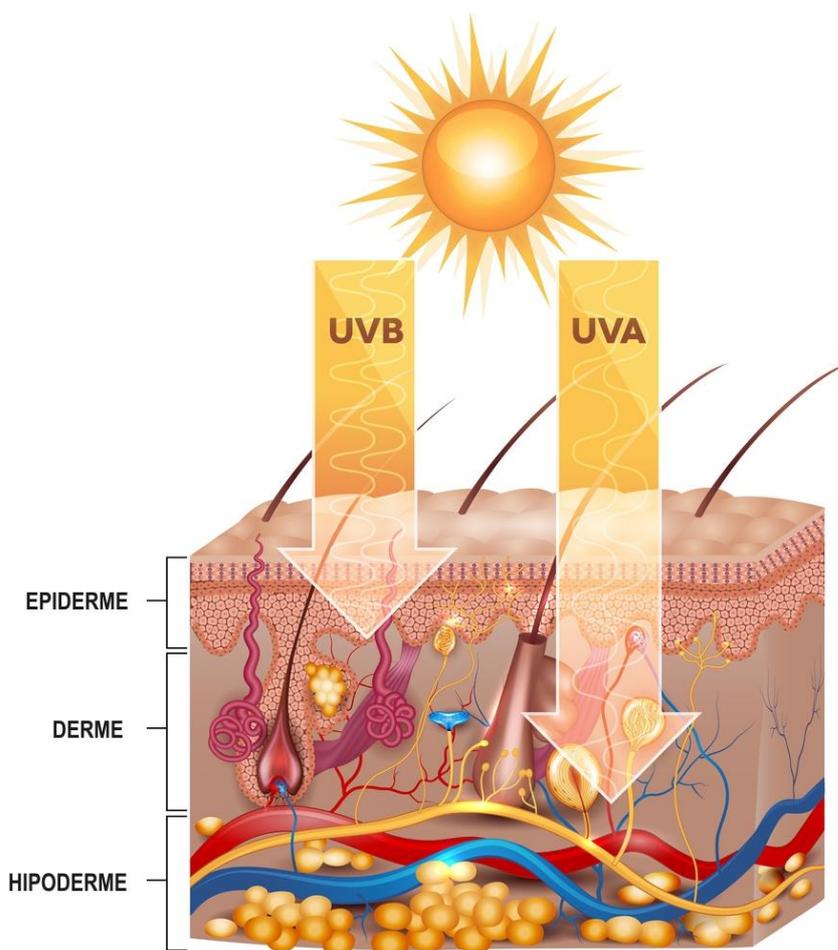
A radiação UVA (315- 400 nm) são ondas longas que penetram profundamente através da epiderme até atingir a derme, porém não produzem eritema, são pigmentogêneas, responsáveis pela pigmentação imediata de curta duração (bronzado) e caracterizam-se ainda por uma fraca ação bactericida. Outra divisão muito comum encontrada na literatura é a da banda UVA em duas partes: UVA1 (315-340 nm) e UVA2 (340-400 nm) essa divisão mostra formas diferentes de interação fotobiológica entre as bandas e o DNA, entretanto, a CIE não recomenda que a radiação UVA seja dividida em sub-bandas (SLINEY, 2007; SCHALKA et al., 2014).

A radiação UVB (290-320 nm) atua maioritariamente ao nível das células da epiderme, são radiações eritematógenas, porém responsáveis pelo bronzeamento indireto e tardio. Tem o potencial bactericida que aumenta com a diminuição do comprimento de onda, além disso o UVB transforma o ergosterol em vitamina (SCHALKA et al., 2014).

As radiações UVC (100-290 nm) são absorvidas pela atmosfera, são pouco eritematógenas e pigmentógenas, mas bastante bactericida (SCHALKA et al., 2014).

As radiações UVA e UVB são importantes do ponto de vista biológico, pois podem causar fotoenvelhecimento, pigmentações irregulares e lesões pré-malignas e malignas, as diferenças na capacidade de penetração através da pele definem, assim, os efeitos causados pelos raios UV (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

Figura 5: Incidência da radiação UVA e UVB sobre a pele.



Fonte: Guniita, 2017.

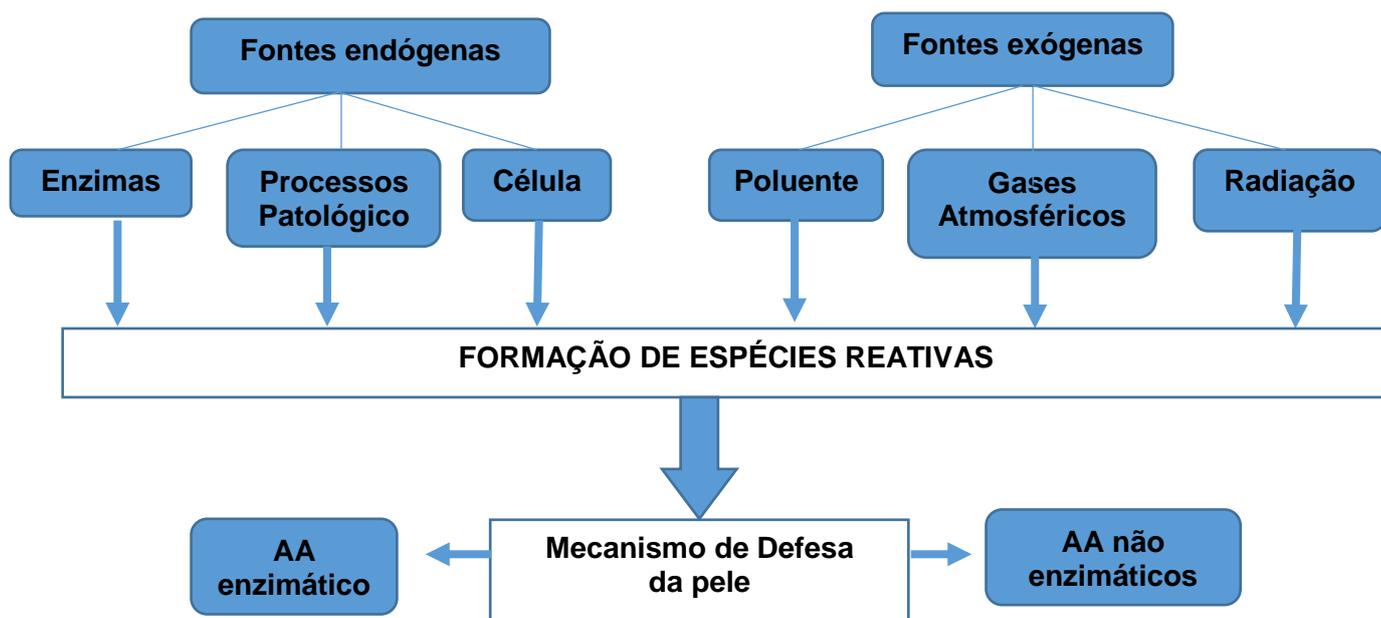
A atividade da radiação ultravioleta na pele é motivo de numerosas pesquisas, levando ao surgimento de eritema, câncer e fotoenvelhecimento, porém também demonstram seus efeitos benéficos contra patologias, como psoríase, vitiligo, micose fungóide e eczema atópico (SCOTTI; VELASCO, 2003).

A pele mais que qualquer outro tecido é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, que induzem à formação de radicais livres e

espécies reativas de oxigênio responsáveis por causar desequilíbrios diversos e processos fisiopatológicos (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

É no tecido cutâneo que há a primeira barreira de defesa contra os agentes danosos e, assim, existe um sistema na pele que controla as reações antes que provoquem danos celulares. Naturalmente, a pele possui uma proteção contra radiações que são: espessamento da camada córnea; produção do ácido urocânico, pigmentação, mecanismos de reparação do DNA e ativação de sistemas de antioxidantes existentes no próprio corpo. Tal sistema cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não enzimáticas, conforme pode ser vista na figura 6 (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Figura 6: Fontes de espécies reativas na pele e mecanismo de defesa.



Fonte: Adaptado de Guaratini; Medeiros; Colepico, 2007.

Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Os antioxidantes não-enzimáticos, incluem-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente. Entre as substâncias endógenas podemos destacar alguns hormônios, como estradiol e estrógeno, e a melatonina, bem como a melanina, um

pigmento formado pela oxidação e polimerização da tirosina, com papel protetor contra a radiação UV. Destaca-se também o ácido lipóico (SCHALKA et al., 2014).

Porém, quase sempre essas proteções naturais não são eficazes contra os malefícios causados pelas radiações solares, como o câncer de pele. Atualmente, devido ao número crescente de casos de carcinomas cutâneos, faz-se necessário alertar a população sobre a importância da fotoproteção, principalmente no que concerne às definições do benefício e da segurança para o consumidor (KOHEN, 1999).

Os antioxidantes referem-se às substâncias que possam diminuir ou bloquear as reações de oxidação induzidas pelos radicais livres, podendo agir no bloqueio da propagação desses radicais na cadeia ou na hidrólise enzimática do éster, desfazendo a peroxidação lipídica de ácidos graxos, capturas de íons metálicos de transição ou ainda através da catálise enzimática na redução de peróxidos (SCOTTI; VELASCO, 2003). A aplicação tópica de agentes antioxidantes, visa o fortalecimento das defesas na pele.

3.3 Fotoproteção

A fotoproteção é o conjunto de medidas direcionadas a reduzir a exposição ao sol e prevenir o desenvolvimento do eritema, câncer de pele não melanoma, melanoma cutâneo, fotoenvelhecimento e fotodermatoses (SCHALKA et al., 2014).

Essas medidas envolvem desde ações profiláticas e terapêuticas, como fotoeducação, fotoproteção tópica, oral e mecânica, mediante o uso de roupas e acessórios (SCHALKA et al., 2014).

Os fotoprotetores tópicos foram inicialmente produzidos em ampla escala somente na década de 70, porque historicamente os protetores solares foram idealizados para a prevenção de queimaduras e para permitir um certo bronzeamento.

Conceitualmente, fotoprotetores tópicos, também chamados de protetores solares (ou ainda filtros solares), são produtos de aplicação sobre a pele com substâncias ativas que interferem na ação da radiação UV (SCHALKA; REIS, 2011).

Os filtros UV são os elementos presentes dentro da formulação dos fotoprotetores que atuam por mecanismos de reflexão, dispersão ou absorção da

radiação que incide na pele. Podem ser divididos estruturalmente em filtros inorgânicos (ou físicos), que refletem a radiação; e orgânicos (ou químicos), cuja ação é a absorção da radiação (SHAAT, 2010).

Os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados, que absorvem a radiação UV e devolvem a energia em forma de maiores comprimentos de onda menos energéticos, como a luz visível e a radiação infravermelha (SHAAT, 2010; SCHALKA et al., 2014).

No Brasil, os protetores solares são classificados na categoria de cosméticos, como grau de risco 2, conforme Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, pois possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, quanto ao modo de usar e suas restrições (BRASIL, 2005).

Os filtros solares comercializados são feitos a partir do fator de proteção solar (FPS), que na verdade tem maior relação com a radiação UVB.

Os métodos de medida de FPS se baseiam no aparecimento de eritema na pele, dessa forma é necessário padronizá-lo. A dose eritematogênica mínima (DME) é determinada como a quantidade de energia requerida para produzir a primeira reação eritemática perceptível, que pode produzir desde uma dor aguda até a formação de bolhas, observadas entre 16-24 horas após à exposição da radiação UV (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002). O FPS é definido como sendo a relação entre a quantidade de energia ultravioleta requerida para produzir uma dose eritemática na pele protegida em relação à energia requerida para produzir uma dose eritemática na pele não protegida, que pode ser expressa a partir da relação matemática:

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

Dessa forma, um protetor FPS 30 permite que o usuário se exponha ao sol sem ser atingido por queimadura 30 vezes mais eficaz do que se ele estivesse sem o produto.

3.4 Composição de fotoprotetores e forma farmacêutica

Fórmula farmacêutica é composta por princípios ativos, veículos e excipientes. A substância designada a desenvolver a atividade terapêutica é chamada de princípio ativo. O veículo é composto por vários excipientes, mas não necessariamente apresenta um efeito específico, podendo interferir no resultado final da formulação e na atividade fotoprotetora (TEIXEIRA, 2012).

Os fotoprotetores tópicos podem ser veiculados em diferentes formas farmacêuticas: óleos, géis, emulsões, mousses, aerossóis, bastões, pós e bases. A seguir serão abordados os veículos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

3.4.1 Gel

Os géis são veículos compostos por uma fase líquida, normalmente água, e outra sólida representada por agentes gelificantes, normalmente substâncias poliméricas, interpenetrada pelo líquido que é capaz de modificar o seu estado físico, a reologia (TEIXEIRA, 2012).

Os géis cosméticos podem ser caracterizados pela sua transparência e comportamento reológico de diminuir a viscosidade pela força de cisalhamento, sendo tal característica benéfica aos cosméticos, uma vez que facilita a espalhabilidade do produto. Conforme a quantidade de agentes gelificantes podem ser obtidos diferentes tipos reológicos: *sérum*, depois fluido, em seguida o gel e, em quantidade superior, a goma (SCHALKA et al., 2014).

Aos géis fotoprotetores são incorporados ativos hidrossolúveis, para que essas formulações tenham uma aparência agradável, fácil aplicação e remoção, rápida secagem, suavidade e elasticidade. A sua indicação principal é para peles oleosas ou acneicas (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Sendo assim, foram escolhidos dois tipos de gel para o estudo de pré-formulação: o gel de Aristoflex® e o gel de Carbopol®.

Os dois géis escolhidos são hidrogéis e apresentam características de hidrofiliabilidade. Uma das grandes vantagens dos hidrogéis é o fato de não necessitar de solventes orgânicos, estes podem ser preparados à base de água em temperatura ambiente (DRESSLER, 2008; HORN, 2008). O gel à base de Aristoflex®

possui em sua composição o polímero sintético de ácido sulfônico acrilildimetiltaurato e vinilpirrolidona, já o gel Carbopol® é composto pelo ácido poliacrílico. O pH é outro fator bastante importante para os géis, sobretudo para o Gel de Carbopol® que na faixa de 2,8 a 3,2 sua capacidade espessante é limitada.

3.4.2 Emulsão

As emulsões são compostas de uma fase oleosa e outra aquosa, não miscíveis entre si, que pela ação do agente emulsionante, formam uma mistura homogênea. Esse veículo é cosmeticamente agradável e compatível com a incorporação de substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis, e devido a toda versatilidade as emulsões são os veículos tópicos mais prescritos (SCHALKA et al., 2014). As emulsões podem ser classificadas de acordo com a proporção entre a fase oleosa e a aquosa, ou seja, emulsões de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). As emulsões O/A apresentam baixa untuosidade, secam com rapidez e podem ser facilmente laváveis com água. Já as emulsões A/O apresentam maior quantidade de fase oleosa o que deixa a pele com mais brilho, repele água, protegendo-a do frio e umidade (TEIXEIRA, 2012).

Os emulsionantes são tensoativos capazes de reduzir a tensão superficial entre a água e o óleo de modo a facilitar a mistura. Quanto a natureza química dos emulsionantes, podem se dividir em: aniônicos (produzem carga negativa), catiônicos (produzem carga positiva) e não iônicos (que não apresentam cargas). Os mais utilizados nos preparos de cosméticos são os emulsionantes aniônicos e não iônicos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Os emulsionantes aniônicos são substâncias ionizáveis, sendo a parte tensoativa representada por um ânion. Os principais representantes das bases auto-emulsionáveis podem ser divididas em dois grupos, as ceras tipo Lanette® e as ceras tipo Tegin®.

Emulsionantes aniônicos são substâncias não dissociáveis, neutras e comportam-se como compostos apolares. Outro aspecto importante é o caráter hidrofílico ou lipofílico do emulsionante, de modo a evitar que sejam totalmente adsorvidos no interior de uma das fases (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Assim, foram escolhidos dois tipos de agentes emulsionantes para o preparo das emulsões do estudo: uma não iônica (Polawax[®]) e uma aniônica (Lanette[®]).

CAPÍTULO I

4 CAPÍTULO I

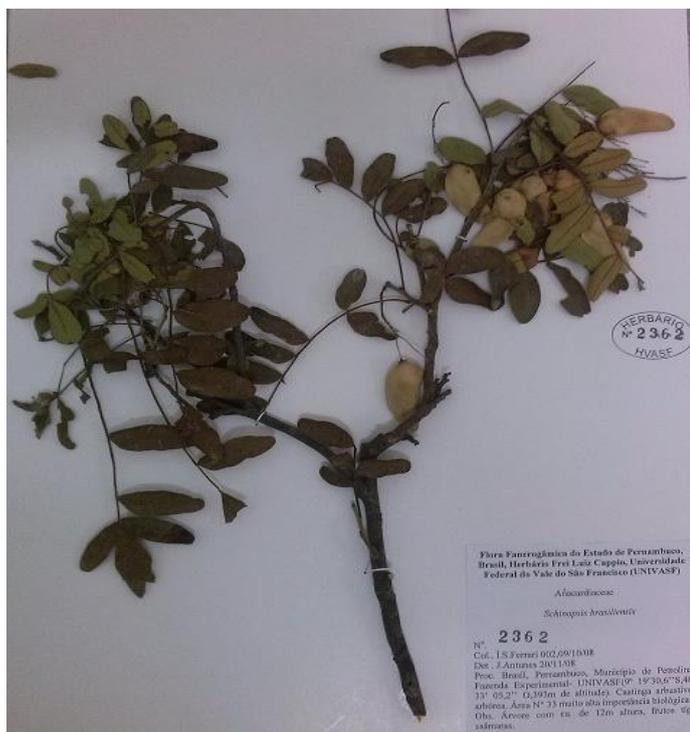
4.1 Parte Experimental I

Para o melhor entendimento, a parte experimental foi dividida em duas etapas, a primeira trata de experimentos realizados com os extratos brutos de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*. A segunda etapa, trata de experimentos realizados com o desenvolvimento das formulações.

4.1.1. Coleta e identificação botânica

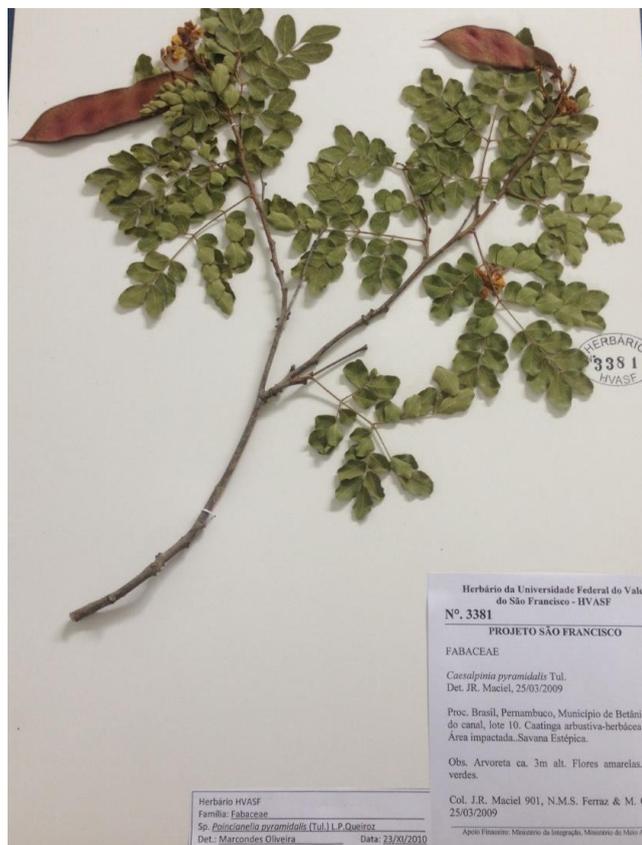
O material vegetal de *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi coletado na cidade de Petrolina, em maio de 2013. A exsicata nº 2362 da espécie está codificada e depositada no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF) conforme figura 5. O material vegetal de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz foi coletado em 19 de janeiro de 2016 no município de Lagoa Grande (PE), a exsicata nº 3381 da espécie está codificada e depositada no HVASF.

Figura 7: Exsicata de *Schinopsis brasiliensis* Engl.



Fonte: Herbário Univasf, 2013.

Figura 8: Exsicata de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.



Fonte: Herbário Univasf, 2017.

4.1.2 Processamento do material vegetal

Após coleta do material, as cascas de *S. brasiliensis* e as folhas de *P. pyramidalis* passaram por um processo de aspersão de álcool 70% e, após esse processo, o material vegetal foi seco em estufa de ar circulante por um período de 72 horas e pulverizado em moinho de facas e assim foram obtidas as drogas vegetais de *S. brasiliensis* (Dv-Sb) e *P. pyramidalis* (Dv-Pp).

4.1.3 Controle de qualidade da droga vegetal

Antes do preparo dos extratos e produtos, as drogas vegetais precisam passar por sucessivas análises de controle de qualidade, para que a qualidade do produto esteja assegurada, assim, as drogas de *S. brasiliensis* (Dv-Sb) e *P.*

pyramidalis (Dv-Pp) foram analisadas previamente, utilizando metodologias descritas na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

4.1.3.1 Determinação de matéria estranha

Para a determinação de material estranho na amostra, foi colhido, por quarteamento, 25g do pó das plantas Dv-Sb e Dv-Pp. As amostras foram dispostas em fina camada sobre a superfície plana e os materiais estranhos à droga separados, inicialmente a olho nu e, em seguida, com auxílio de lente de aumento. O material foi pesado e os resultados foram expressos em porcentagem de matéria estranha (BRASIL, 2010).

4.1.3.2 Determinação de água em drogas vegetais (método gravimétrico)

Após pesada, as amostras de Dv-Sb e Dv-Pp foram dessecadas a temperatura de 100-105 °C durante 5 horas, até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de água em relação à droga seca ao ar (BRASIL, 2010).

4.1.3.3 Determinação de cinzas totais

As amostras de Dv-Sb e Dv-Pp foram pesadas e transferidas para cadinhos previamente tarados. As incinerações ocorreram aumentando gradativamente a temperatura até, no máximo, 600 ± 25°C (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C), até que todo o carvão estivesse eliminado (BRASIL, 2010).

4.1.3.4 Determinação de cinzas sulfatadas

Os cadinhos previamente tarados, juntamente com as drogas vegetais de Dv-Sb e Dv-Pp umedecida com ácido sulfúrico concentrado foram carbonizados, inicialmente, em bico de Bunsen. Após o processo foi incinerado em murfla com aquecimento gradativo até 800 °C (BRASIL, 2010).

4.1.3.5 Determinação do índice de intumescência

As drogas vegetais de Dv-Sb e Dv-Pp (1g) foram colocadas em provetas com tampas esmerilhadas com 25 mL de água e agitado a cada 10 minutos, por uma hora. A mistura ficou em repouso por 3 horas, à temperatura ambiente. O volume ocupado pelo material vegetal foi medido, subtraído do volume inicial das drogas (BRASIL, 2010).

4.1.3.6 Determinação da granulometria

Para a determinação da granulometria, foram utilizados tamises com abertura com malha de 150, 250, 425, 600 e 850 µm, em um tamisador. O conjunto de tamis foi colocado, com 25g de amostras de Dv-Sb e Dv-Pp sobre o receptor de tamises, durante 15 minutos, com vibração 4. Após o término todas as amostras retidas na superfície foram retiradas e pesadas. O percentual retido em cada tamis foi calculado, utilizando o seguinte cálculo:

$$(Eq. 2) \quad \% \text{ retido pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2 \cdot 100}$$

onde:

P_1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P_2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100 = Fator de porcentagem

4.1.3.7 Determinação do índice de espuma

Foram preparados decoctos de forma a extrair as maiores quantidades de saponinas de acordo com a farmacopeia. Os decoctos obtidos, foram distribuídos em 10 tubos, em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL e, ajustado o volume com água até 10 mL. Foram agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo, após 15 minutos de repouso. As alturas das espumas foram medidas (BRASIL, 2010).

4.1.3.8 Atividade hemolítica

Para as amostras que apresentaram elevado índice de espuma, o teste de atividade hemolítica é necessário, assim, para a realização do teste foram utilizadas suspensão de sangue de carneiro a 2%, que foram preparadas utilizando o citrato de sódio, como anticoagulante e tampão fosfato pH 7,4 em quantidade suficiente de para completar 50 mL. Foram feitas diluições seriadas do decocto vegetal com a suspensão de sangue conforme tabela 1.

Tabela 1: Diluição em série do extrato vegetal para a atividade hemolítica.

| Tubo | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Extrato vegetal (mL) | 0,10 | 0,20 | 0,50 | 1,00 |
| Tampão fosfato pH 7,4 (mL) | 0,90 | 0,80 | 0,50 | - |
| Suspensão de sangue (2%) (mL) | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Fonte: Farmacopeia (BRASIL, 2010).

As amostras foram agitadas e descansaram por 6 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo os tubos foram analisados.

4.1.3.9 Determinação do pH

Realizou-se de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010) onde 10mL das soluções aquosas extrativas foram analisadas em potenciômetro calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0. As análises foram feitas em triplicata (BRASIL, 2010).

4.1.4 Obtenções dos extratos etanólicos brutos

Os materiais vegetais de Dv-Sb e Dv-Pp foram submetidos a maceração com etanol 95%, com 3 extrações em intervalos de 72 horas. As soluções foram concentradas em rotaevaporador, e assim, obtidos os extratos etanólicos brutos de *S. brasiliensis* (Sb-EtOH) e *P. pyramidalis* (Pp-EtOH).

4.1.5 Avaliação fitoquímica preliminar

Para rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem os extratos vegetais. Os extratos brutos de Sb-EtOH e Pp-EtOH foram avaliados através de métodos cromatográficos segundo Wagner & Bladt (1996), procurando-se evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários.

Tabela 2: Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar os principais metabólitos secundários.

| Classe química | Sistema eluente | Padrão | Revelador |
|--------------------------|--|------------------------------|---------------------------------|
| Flavonoides | Acetato de etila:ácido fórmico:ácido glacial:água (100:11:11:26) | Rutina Quercetina | NEU |
| Cumarinas | Tolueno:éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%) | Escopoletina | KOH etanólico 10% |
| Derivados antracênicos | Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10) | Aloína | KOH etanólico 10% |
| Lignananas | Clorofórmio:metanol:água (70:30:4) | Extrato de linhaça | Vanilina fosfórica |
| Naftoquinonas | Tolueno:ácido fórmico (99:1) | Biflorina Lapachol | KOH etanólico 10% |
| Taninos condensados | Acetato de etila:ácido acético glacial:ácido fórmico:água (100:11:11:26) | Catequina Epicatequina | Vanilina clorídrica |
| Taninos hidrolisáveis | n-Butanol:acetona:tampão fosfato (40:50:10) | Ácido gálico Ácido tânico | Sulfato de ferro amoniacal (1%) |
| Triterpenos e esteróides | Tolueno:clorofórmio:etanol (40:40:10) | Lupeol Sitosterol | Lieberman-Burchard |

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt, 1996.

4.1.6 Análise dos extratos por CLAE-DAD

Para determinações qualitativa de metabólitos secundários nas amostras foram utilizados um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® LC-20 com detector de arranjo de diodos (DAD), equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0.

Para análise de Sb-EtOH, foram utilizados como fase móvel 2 solventes: solvente A – 0,5% de ácido acético em água ultrapura (grau CLAE) e solvente B – 100% acetonitrila com fluxo de 1 mL/min, em gradiente de acordo com a tabela 3. A fase estacionária foi uma coluna Super-ODS (Supelco®) mantida a 30°C. O volume das amostras injetado foi de 20 µL, sendo monitoradas a 270 e 340 nm.

Tabela 3: Tabela do gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa na análise por CLAE de Sb-EtOH.

| Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|-------------|----------------|----------------|
| 0-40 min | 100-20 | 0 -80 |
| 40-50 min | 20 | 80 |
| 50-60 min | 20-100 | 80-0 |

Fonte: Autoria própria, 2014.

Para análise de Pp-EtOH, foram utilizados como fase móvel 2 solventes: solvente A – 0,01% solução de de ácido trifluoracético em água ultrapurificada e solvente B –100% acetonitrila com fluxo de 0,8 mL/min⁻¹, obedecendo ao gradiente descrito na Tabela 4. A fase estacionária usada foi uma coluna C18 Thermo Scientific® Hypersil, mantida a 30°C. nos quais foram injetados 50 µL das amostras e feito o monitoramento nos comprimentos de onda de 340 nm.

Tabela 4: Tabela do gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa na análise por CLAE de Pp-EtOH.

| Tempo | Solução A (%) | Solução B (%) |
|-----------|---------------|---------------|
| 0-40 min | 90 – 60 | 10 – 40 |
| 40-50 min | 60 | 40 |
| 50-60 min | 60 – 90 | 40 – 10 |

Fonte: Autoria própria, 2016.

Paralelamente, foram analisadas, individualmente, 24 substâncias químicas de referência (SQRs), Sigma[®], caracterizando-se pelo alto grau de pureza (pureza > 98%), que foram usados para investigar suas presenças nos extratos etanólicos de *S. brasiliensis*, bem como, *P. pyramidalis*.

4.1.7 Métodos espectrofotométricos

4.1.7.1 Determinação do conteúdo fenólico total

Para determinar o conteúdo fenólico total foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu. (AMORIM et al., 2008; FOLIN e CIOCALTEU, 1927).

Para quantificar o conteúdo fenólico total, alíquotas de 2,0 mL das amostras (1,0 mg/mL) foram misturadas com 5,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 10,0 mL de Na₂CO₃ (7,5%, p/v) e 84,0 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. A absorbância foi medida a 760 nm. A equação de correlação construída com ácido tânico foi $y = 0,0677x + 0,0125$ ($R^2 = 0,9981$). O conteúdo fenólico total foi expresso em miligramas equivalente de ácido tânico por g de extrato (mg EAT/g).

4.1.7.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides dos extratos foram estimados usando o método colorimétrico baseado na formação do complexo flavonoide-alumínio (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008). Alíquotas de 2,0 mL das amostras (1,0 mg/mL) foram

misturadas com 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de piridina (20,0%, v/v), 2,5 mL de cloreto de alumínio (5,0%, p/v) e 10,9 mL de água destilada.

As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. Em 420 a absorvância das soluções foram medidas. A equação de correlação construída com rotina foi $y = 0,0290x + 0,0022$ ($R^2 = 0,9997$). Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por g de extrato (mg RE/g).

4.1.7.3 Avaliação da atividade antioxidante

4.1.7.3.1 Método do sequestro do radical DPPH

O ensaio do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) foi realizado baseado no método previamente descrito por Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995) com modificações. Após o preparo das amostras [1mg/mL], em seguida, foram feitas diluições de 1, 3, 9, 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$. Foram retiradas alíquotas de 2,5mL, sendo adicionados 1mL de DPPH (50 $\mu\text{g/mL}$) em cubetas de vidro. As soluções repousaram por 30 minutos ao abrigo da luz.

As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 518 nm. Como padrões foram utilizados ácido ascórbico, BHA e BHT. Como controle negativo foi usado a solução de DPPH. As atividades antioxidantes foram calculadas a partir de uma curva de calibração obtida através do percentual de Atividade Antioxidante e expressa como concentração eficiente (CE_{50}), isto é, a concentração da amostra necessária para reduzir a absorvância do controle negativo a 50%.

$$(Eq.3) \quad AA (\%) = 1 - (Abs amostra / Abs controle negativo) \times 100$$

4.1.7.3.2 Método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno

Este método de avaliação é baseado na inibição da reação de auto-oxidação do β -caroteno, a qual é provocada pela adição de ácido linoléico e aeração do meio, levando à formação do agente oxidante radicalar.

A reação foi acompanhada por espectrofotometria em $\lambda = 470$ nm.

Nesse método, o ácido linoléico libera um radical livre que reage com o β -caroteno, levando-o a perder o seu cromóforo e sua coloração laranja original, com

diminuição da absorvância. Substâncias antioxidantes impedem essa reação por reagirem com o radical livre (CHEN et al., 2011). Os resultados obtidos foram comparados com os antioxidantes comerciais ácido ascórbico, BHA e BHT.

4.1.7.4 Determinação in vitro do fator de proteção solar (FPS)

As atividades fotoprotetoras dos extratos de Sb-EtOH e Pp-EtOH foram medidas por determinação do comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) e Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro*. Para isso, as amostras foram diluídas em etanol absoluto, obtendo-se concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L (em triplicata). Posteriormente, foram realizadas varreduras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda entre 260-400 nm, com intervalos de 5 nm.

As leituras foram realizadas utilizando cubetas de quartzo e o etanol usado como branco (VIOLANTE et al., 2009).

Cálculo de FPS foi obtido de acordo com a equação proposta por Mansur et al. (1986).

$$(Eq.4) \quad FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Onde: CF – fator de correção (= 10); EE (λ) – espectro do efeito eritematoso; I (λ) – espectro de intensidade solar; Abs (λ) – absorvância;

Os valores de EE x I são constantes. Eles foram determinados por Sayre et al. (1979) e são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Produto da função usada para calcular o FPS.

| Comprimento de onda (nm) | EE x I (λ) |
|--------------------------|----------------------|
| 290 | 0,0150 |
| 295 | 0,0817 |
| 300 | 0,2874 |
| 305 | 0,3278 |
| 310 | 0,1864 |
| 315 | 0,0839 |
| 320 | 0,0180 |
| Total | 1.0000 |

EE (λ) – espectro do efeito eritematoso; I (λ) – espectro de intensidade solar

Fonte: Sayre et al., 1979.

4.1.8 Avaliação da toxicidade aguda dos extratos

4.1.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos, pesando entre 30-40 g procedentes do Biotério Setorial da UNIVASF, Campus Petrolina. Antes dos experimentos, todos os animais foram randomicamente mantidos em gaiolas de polipropileno com ventilação e temperatura controladas (22 ± 2 °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com a fase de luz iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, com livre acesso à ração tipo “pellets” (Labina®) e água (disponível em frascos de plástico com bicos apropriados). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco número 0002/180714.

4.1.8.2 Toxicidade aguda

Os camundongos foram divididos em 2 grupos compostos por 5 machos e 5 fêmeas (n = 10). Os grupos controles receberam o veículo (solução salina: NaCl 0,9%) e os grupos experimentais receberam os extratos etanólicos brutos Sb-EtOH e Pp-EtOH nas doses de 2g/kg, todos por via oral. Posteriormente os animais foram observados durante 14 dias para verificar sinais de toxicidade e presença de morte. Diariamente foram medidos o consumo de alimento e água, além da alteração na massa corporal.

4.1.9 Análises estatísticas

Foram realizadas análises de variância ANOVA, um critério, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. As concentrações eficientes (CE₅₀) foram calculadas a partir de regressão obtida com as concentrações das amostras e das atividades antioxidantes. Foi utilizado o teste de correlação de Person para comparar o conteúdo fenólico total, flavonoides entre estes e as concentrações eficientes (CE₅₀) das amostras, o Fator de Proteção Solar e Atividade Antioxidante. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de $p < 0,05$. O programa

BioEstat 5.0 foi utilizado para realização das análises estatísticas (AYRES et al., 2007); e o GraphPad Prism 5.0 para análise regressão e construção dos gráficos do FPS, bem como, os gráficos de toxicidade aguda.

4.2 RESULTADOS DA PARTE I

4.2.1 Materiais vegetais

O pó das cascas de *S. brasiliensis* apresentaram cor marrom escura, áspera, desprendendo-se em porções irregularmente quadrangulares, figura 9. Após todo o processamento da amostra foi obtido 6,42 kg de droga vegetal (Dv-Sb).

Figura 9: Pó das cascas de *S. brasiliensis*.



Fonte: Autoria própria, 2014.

O pó das folhas de *P. pyramidalis* apresentou cor verde, aspecto macio, desprendendo-se em porções irregularmente finas, figura 10. Após todo o processamento da amostra foi obtido 2,10 kg de droga vegetal (Dv -Pp).

Figura 10: Pó das folhas de *P. pyramidalis*



Fonte: Autoria própria, 2016.

O termo “droga vegetal” foi utilizado, pois de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) toda planta ou parte da planta para fins medicinais após algum processamento ou secagem pode receber essa denominação (BRASIL, 2004).

4.2.2 Controle de qualidade da droga vegetal

A má qualidade de uma droga vegetal pode comprometer a eficácia de um produto podendo oferecer riscos à saúde do consumidor. Sendo assim, o controle de qualidade da droga vegetal é um dos parâmetros mais importantes antes de utilizar o material vegetal para qualquer finalidade.

Dentre as características necessárias para garantir a qualidade da matéria prima vegetal, a Farmacopeia recomenda análises de: material estranho, perda de água, granulometria, cinzas totais e sulfatadas, índice de espuma. Os resultados das análises realizadas com a droga vegetal de *S. Brasiliensis* (Dv-Sb) seguem a seguir (BRASIL, 2010).

4.2.2.1 Análise de matéria estranha

De 25g de Dv-Sb colhido por quarteamento, foram separados 0,31 g de material estranho (Figura 11), ou seja 1,2 %, tais sujidades, se classificam em impurezas da natureza, minerais ou orgânicas. Tal resultado está dentro dos limites especificados na Farmacopeia brasileira, já que, a porcentagem de elementos estranhos não deve ser superior a 2% m/m.

Não foi encontrado nenhum material estranho na droga vegetal de *P. pyramidalis* Tul. (Dv-Pp).

Figura 11: Material estranho de droga vegetal de *S. brasiliensis* (Dv-Sb).



Fonte: Autoria própria, 2014.

4.2.2.2 Determinação da distribuição granulométrica das drogas vegetais

Os resultados obtidos pelo histograma de distribuição granulométrica das cascas de *S. brasiliensis* (Figura 12) demonstram que as partículas do material vegetal se encontraram predominantemente retidas nos tamises com malhas de 600 e 450 μm representando 54% de todo material. Seguindo critérios farmacopeicos, Dv-Sb classificou-se como pó moderadamente grosso (BRASIL, 2010).

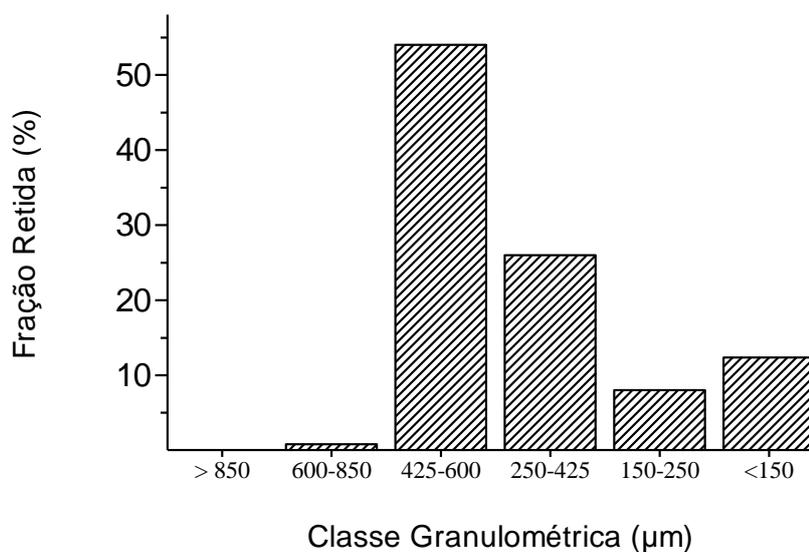


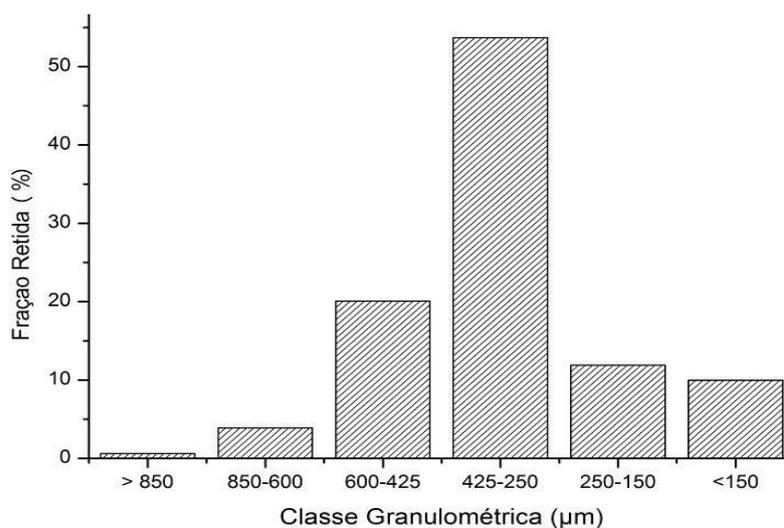
Figura 12: Histograma de distribuição granulométrica das cascas de *S. brasiliensis*.

Fonte: Autoria própria, 2014.

Quanto ao resultado da distribuição granulométrica para o pó de *P. pyramidalis*, após o processo de pesagem constatou-se que 53,66% do pó das folhas ficou retido nos tamises com malhas de 425 e 250 μm . Desse modo, o tamanho médio das partículas encontra-se neste intervalo conforme pode ser observado na figura 13. Assim, Dv-Pp foi classificado como pó moderadamente grosso (BRASIL, 2010).

Granulometria de tamanho maior, como os desta classificação, favorecem as extrações, pois partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e criando uma barreira que impeça a penetração de solventes (MARQUES et al., 2012).

Figura 13: Histograma de distribuição granulométrica das folhas de *P. pyramidalis*.



Fonte: Autoria própria, 2014.

O pó moderadamente grosso traz vantagens, considerando que o uso de pós dessa natureza é o recomendado para a maioria de drogas com perspectiva na produção de produtos (SHARAPIN, 2000).

4.2.2.3 Determinação de perda de água por dessecação

Empregando o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira, realizou-se a determinação de água nas drogas vegetais de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*. Os resultados demonstraram que a quantidade de água perdida por dessecação de Dv-Sb foi de $8,45 \pm 0,12\%$, já para Dv-Pp apresentou $6,37 \pm 0,34\%$ de água. Ainda não existem monografias específicas para as espécies de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*, entretanto, segundo Simões et al. (2007), para as drogas vegetais o limite máximo de umidade é de 14%, dessa forma, consideramos que Dv-Sb e Dv-Pp apresentaram resultados favoráveis, pois se fosse encontrado na amostra elevados teores de água, poderia inviabilizar a amostra, uma vez que pode favorecer o crescimento de microrganismos, além de favorecer reações enzimáticas que aceleram a degradação que leva a uma interferência direta na qualidade e inviabilidade da amostra (LOPES; NETTO JUNIOR, 2011).

4.2.2.4 Determinação de cinzas totais e sulfatadas

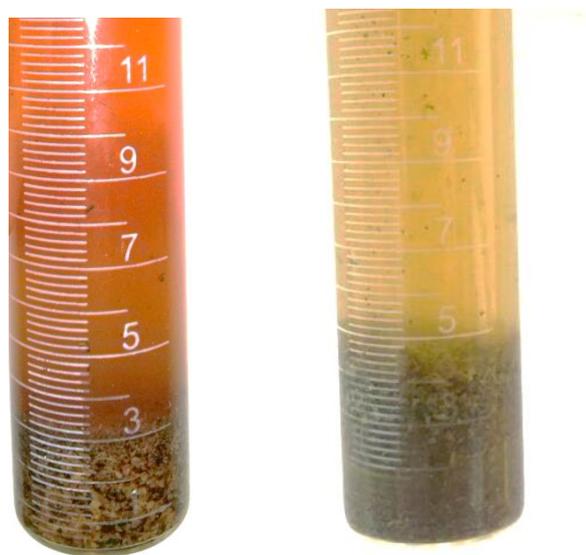
O ensaio visa determinar o teor de impurezas inorgânicas contido em substâncias orgânicas. O resultado do percentual de cinzas totais para Dv-Sb foi de $10,56 \pm 0,07\%$ e para cinzas sulfatadas foi de $14,50 \pm 0,08\%$. Já a determinação de cinzas totais para Dv-Pp foi de $3,1 \pm 0,71\%$ e para cinzas sulfatadas foi de $5,86 \pm 2,78\%$.

Em geral, as médias dos valores máximos para cinzas totais e sulfatadas variam bastante de acordo com as monografias das drogas descritas na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), exemplo, na monografia da espécie *E. folium* os limites máximos descritos para cinzas totais é de 11,0%, já para cinzas sulfatadas de 14,0%, tais valores foram compatíveis com os valores encontrados nas amostras. A literatura relata que esses parâmetros de qualidade podem indicar a presença de resíduos inorgânicos não voláteis como, areia, pedra e terra, encontradas naturalmente, uma vez que as amostras são materiais vegetais (SONAGLIO et al., 2003).

4.2.2.5 Determinação do índice de intumescência

No ensaio mediu-se o volume ocupado pela Dv-Sb, volume inicial $V_i= 2,0$; depois mediu-se o volume ocupado pelo material vegetal acrescido da mucilagem, volume final $V_f=3,0$, e apresentou como resultado um teor de mucilagem de 1,0. Para o volume ocupado pela Dv-Pp, volume inicial $V_i= 3,0$; depois mediu-se o volume ocupado pelo material vegetal acrescido da mucilagem, volume final $V_f=5,0$, e apresentou como resultado um teor de mucilagem de 2,0. (Figura 14). Outrossim, o índice de intumescência é importante para prever o volume de solvente extra que deve ser adicionado durante a produção dos extratos (COUTO et al., 2009).

Figura 14: Volume ocupado por Dv-Sb e Dv-Pp acrescido da mucilagem



Fonte: Autoria própria, 2017.

4.2.2.6 Determinação do índice de espuma (IE)

O índice de espuma permite avaliar qualitativamente a presença de saponinas nas amostras. Após 15 minutos o resultado foi positivo para a droga vegetal de *S. brasiliensis*, já que houve a presença de espuma persistente e abundante na amostra de Dv-Sb. De acordo com a Farmacopeia, quando há a formação de espuma com altura menor que 1 cm, como foi o caso da primeira diluição de DV-Sb o IE é menor que 100. A segunda e terceira diluições de Dv-Sb das amostras, apresentaram altura de espuma igual a 1cm, sendo assim, o IE foi calculado e é de

166. O resultado obtido para o índice de espuma nas demais diluições foram maiores do que 1000, conforme figura 15.

Figura 15: Espuma persistente produzida pela droga vegetal *S. brasiliensis*.



Fonte: Autoria própria, 2014

Para a solução aquosa de Dv-Pp, após 15 minutos não foi possível observar a presença de espuma na amostra, sendo, portanto, o resultado negativo para a presença de saponinas na droga vegetal de *P. pyramidalis*.

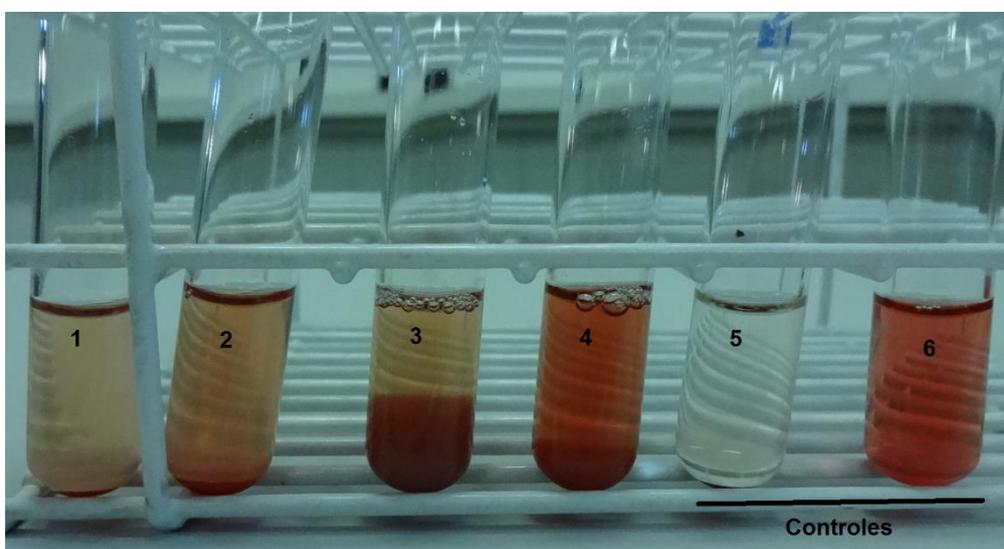
Vale ressaltar a ação das saponinas sobre as membranas celulares que podem alterar a permeabilidade ou até mesmo levar à destruição completa das células. A ação hemolítica das saponinas são fatores limitantes para o uso de determinadas drogas, pois tais metabólitos podem causar irritações nas mucosas o que pode impedir o desenvolvimento de aplicações práticas das drogas vegetais (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2001).

4.2.2.7 Atividade hemolítica

A droga vegetal de *Schinopsis brasiliensis* foi a espécie que apresentou resultado positivo no IE o que indica a presença de saponinas em Dv-Sb. As

saponinas são compostos conhecidos por apresentarem propriedade hemolítica *in vitro* (CAVALHEIRO et al., 2009; SIMÕES et al., 2007) e, por esse motivo, foi necessária a realização do teste de atividade hemolítica *in vitro* em Dv-Sb (BRASIL, 2010). Como resultado, foi observada a hemólise total apenas na diluição 4 (100% de Dv-Sb), concentração de 0,01g/mL de material vegetal, figura 16. Esse valor é considerado baixo, uma vez que somente a última concentração causou ruptura dos eritrócitos.

Figura 16: Triagem para verificação da hemólise a partir das diluições o extrato vegetal de *S. Brasiliensis*



Fonte: Autoria própria, 2014.

1: [10% Dv-Sb]; 2: [20% Dv-Sb]; 3: [50% Dv-Sb]; 4: [100% Dv-Sb]; 5: tampão fosfato pH 7,4; 6: solução referência de saponinas. Em todos os tubos foram utilizadas suspensão de eritrócitos a 2%.

4.2.2.8 Determinação do pH

Os valores do pH das soluções de Dv-Sb foi de $3,50 \pm 0,05$ e Dv-Pp foi de $3,97 \pm 0,07$ os quais conferem características ácidas para as drogas.

A determinação do pH da droga vegetal é importante pois alterações nesses valores podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise e decomposição (CUNHA; SILVA; CHORILLI, 2009).

O pH de um extrato influencia diretamente no preparo das amostras, sobretudo, de formulações a base de gel de Carbopol[®], pois alterações nos valores do pH podem modificar a viscosidade do gel.

4.2.3 Triagem Fitoquímica

As análises fitoquímicas dos extratos de Sb-EtOH e Pp-EtOH revelaram que entre todos os constituintes avaliados foram encontrados compostos fenólicos, sobretudo, flavonoides, os quais mostraram-se fortemente presentes e são os metabólitos secundários alvo do estudo (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização fitoquímica de extratos de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*.

| Classe Química | Sb-EtOH | Pp-EtOH |
|--------------------------|---------|---------|
| Taninos | +++ | +++ |
| Flavonoides | +++ | +++ |
| Cumarinas | - | +++ |
| Derivados antracênicos | +++ | - |
| Lignanas | +++ | - |
| Naftoquinonas | - | - |
| Saponinas | +++ | + |
| Triterpenos e esteroides | + | +++ |

Fonte: Autoria própria, 2014. Resultados: Ausente (-); Baixo (+); Moderado (++); Forte (+++)

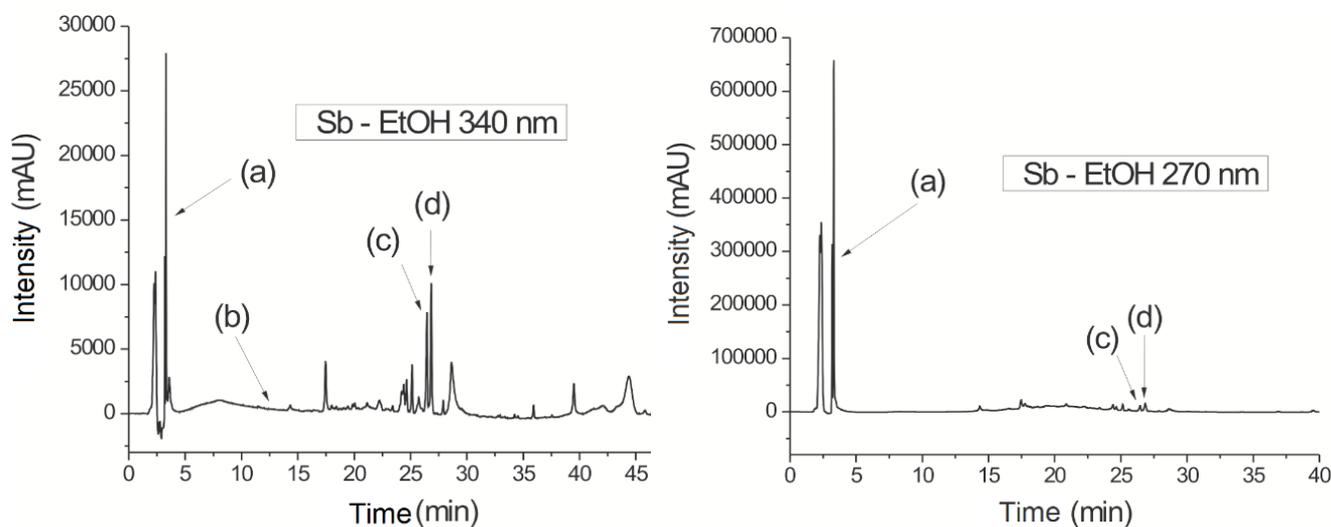
Moreira (2009) já havia relatado que existiam poucos relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e avaliação da atividade biológica realizados com espécies do gênero *Schinopsis*, principalmente com a espécie de *S. brasiliensis*, e mesmo após oito anos, os relatos sobre a espécie ainda são escassos, mas alguns dos relatos existentes confirmam a presença de compostos fenólicos, principalmente taninos e flavonoides (ROUX, EVELYN, 1960; ROUX, PAULUS, 1961; KING, WHITE, 1957; CARDOSO, DAVID, DAVID, 2006). Também foi relatado por Moreira (2009) a presença de compostos das classes dos triterpenos, esteroides e carotenoides.

Há relatos acerca da triagem fitoquímica de *P. pyramidalis*, tal como os resultados encontrados no estudo, a literatura corrobora a presença de compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, esteroides, taninos e triterpenos (MENDES et al., 2000; SANTOS et al., 2011).

4.2.4 Análise dos extratos por CLAE-DAD

De acordo com os resultados da análise em CLAE-DAD de Sb-EtOH foram possíveis identificar quatro padrões analíticos utilizados por meio da semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção em ultravioleta: (a) catequina em 4 min, (b) epicatequina em 3 min, (c) apigenina em 26 min e (d) ácido gálico em 27 min (Figura 17).

Figura 17: *Fingerprint* do extrato das cascas de *S. brasiliensis*.

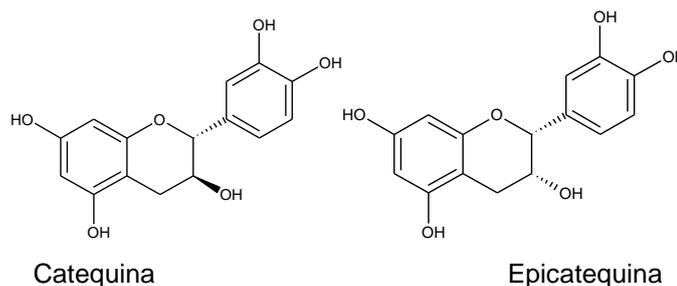


(a): catequina; **(b):** epicatequina; **(c):** apigenina; **(d):** ácido gálico.

Fonte: Autoria própria, 2013.

A (+)-catequina e (-) epicatequina são flavonoides pertencentes ao grupo dos flavonóis que possuem um grupo hidroxila na posição 3 (Figura 18). As propriedades das catequinas têm sido amplamente citadas na literatura e apresentam potente atividade sequestradora do radical peroxila cerca de dez vezes maior que o L-ascorbato (vitamina C) e β -caroteno (YILMAZ, 2006).

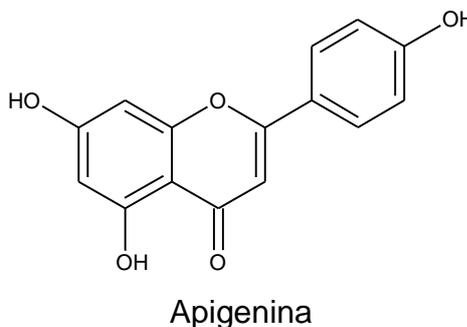
Figura 18: Estrutura química da catequina e epicatequina



Fonte: Aatoria própria, 2013.

A apigenina (Figura 19) é um flavonoide pertencente ao grupo das flavonas, possuem um grupo carbonilo na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2,3.

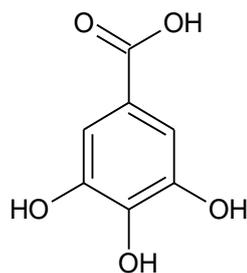
Figura 19: Estrutura química da apigenina



Fonte: Aatoria própria, 2013.

O ácido gálico (Figura 20) é um polifenol derivado da via do ácido chiquímico, um intermediário do metabolismo secundário, e é um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (GRUNDHOFER et al., 2001).

Figura 20: Estrutura química do ácido gálico.



Ácido gálico

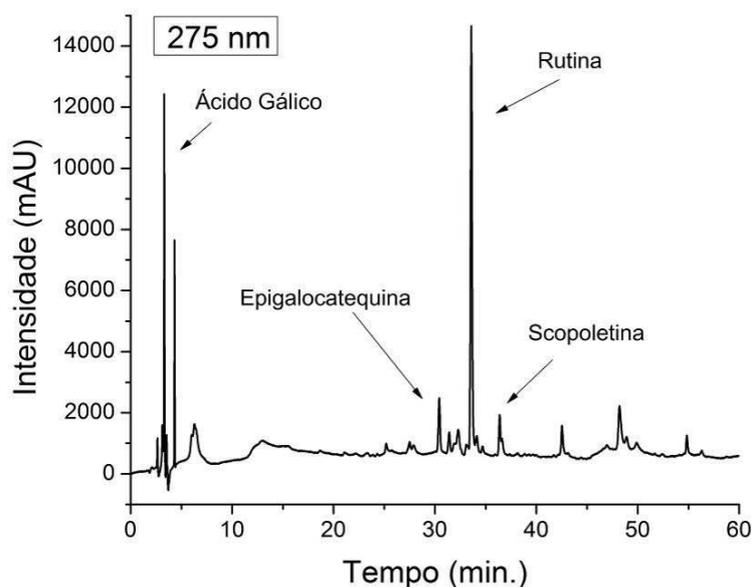
Fonte: Autoria própria, 2013.

O ácido gálico possui diversas propriedades comprovadas tais como, atividade antiinflamatória, atividade antimutagênica, antitumoral e antioxidante (SOONG; BARLOW, 2006).

Na literatura há relatos de que foram encontrados em outras espécies de *Schinopsis* ssp. compostos como: (+)-catequina e ácido gálico (ROUX; EVELYN, 1960; KING; WHITE, 1957).

Nos resultados da análise em CLAE-DAD de Pp-EtOH foram possíveis identificar quatro padrões analíticos utilizados por meio da semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção em ultravioleta: (a): ácido gálico, (b): epigalocatequina, (c): rutina e (d):escopoletina, conforme figura 21.

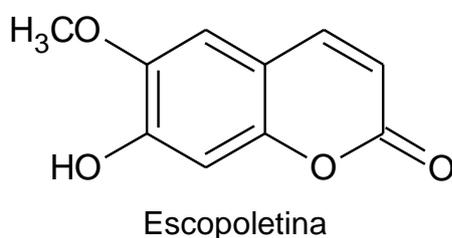
Figura 21: *Fingerprint* do extrato das folhas de *P. pyramidalis*.



Fonte: Autoria própria, 2016.

A escopoletina (Figura 22) é uma cumarina encontrada no extrato folhas de *P. pyramidalis*. Estudos realizados com a escopoletina demonstraram várias atividades biológicas associadas a escopoletina, tais como, anticolinestérica, antinociceptiva, anti-inflamatória, antitireoidal, antihiperlicêmica e antitumoral (CAPRA et al., 2010), bem como, antiarrítmicas, vasodilatadoras, hipotensoras, espasmolíticas e simpatolíticas (DI STASI, 1995).

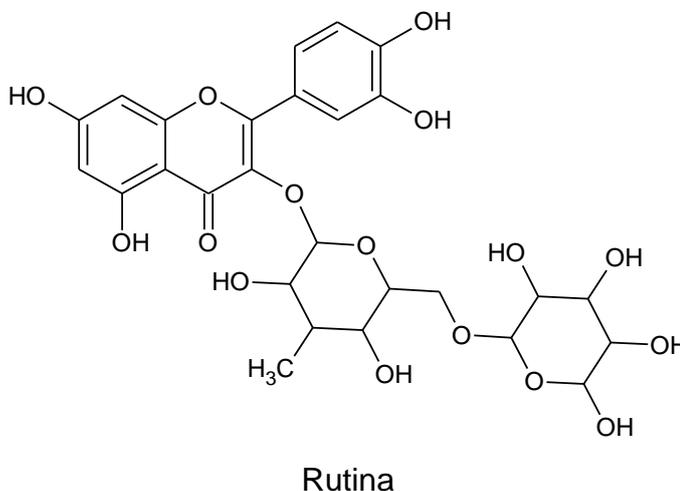
Figura 22: Estrutura química da escopoletina.



Fonte: Autoria própria, 2016.

A rutina (Figura 23), flavonoide da classe dos flavonóis, é tradicionalmente empregada como potente antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, e também na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta (BRUNETON, 1991; GUARDIA et al., 2001; VELASCO et al., 2008).

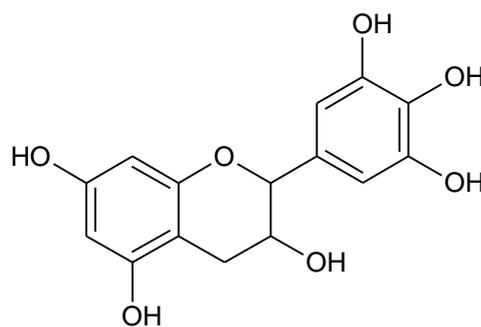
Figura 23: Estrutura química da rutina.



Fonte: Autoria própria, 2016.

A epigalocatequina (Figura 24) é a molécula de catequina com mais um grupo hidroxila no anel B, são flavonoides pertencentes ao grupo dos flavanóis. Esse grupo hidroxila é responsável pela maior atividade antioxidante em relação à catequina (RICE-EVANS et al., 1996).

Figura 24: Estrutura química da epigalocatequina.



Epigalocatequina

Fonte: Autoria própria, 2016.

4.2.5 Métodos espectrofotométricos

4.2.5.1 Teores de fenóis totais, flavonoides, taninos e atividade antioxidante

Os resultados dos teores de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante de Sb-EtOH e Pp-EtOH estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Conteúdo de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e β -caroteno dos extratos de Sb-EtOH e de Pp-EtOH.

| Amostras | Dosagens | | Atividade Antioxidante | |
|----------|--------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | FT (mg EAT /g) | F (mg RE/g) | DPPH (CE ₅₀) | β -caroteno (% AA) |
| Sb-EtOH | 624,6 \pm 0,42 ^a | 132,4 \pm 0,76 | 1,46 \pm 0,07 ^a | 60,81 \pm 0,67 ^a |
| Pp-EtOH | 358,46 \pm 0,05 ^b | 112,86 \pm 0,40 | 32,73 \pm 0,95 ^b | 22,86 \pm 0,27 ^b |
| Vit C | --- | --- | 0,64 \pm 0,22 | 7,50 \pm 2,12 |
| BHA | --- | --- | 1,22 \pm 0,43 | 97,49 \pm 0,76 |
| BHT | --- | --- | 8,16 \pm 7,06 | 99,10 \pm 1,14 |

Fonte: Autoria própria, 2014.

Fenóis totais (FT), Flavonoides Totais (F) e atividade antioxidante dos extratos brutos de Sb-EtOH e Pp-EtOH. EAT: equivalente de ácido tânico; RE: equivalente de rutina. BHA: Butil Hidroxianisol, BHT: Butil Hidroxitolueno. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão linear com 95% de intervalo de confiança. CE_{50} é definido como a concentração suficiente para obter 50% do efeito máximo estimado em 100%. Valores são expressos como média \pm SD (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.05$.

Os maiores conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides foram encontrados em Sb-EtOH com valores de $624,6 \pm 0,42$ (mg EAT/g); $132,4 \pm 0,76$ (mg RE/g), respectivamente.

Para Pp-EtOH os valores dos teores de fenóis: $358,46 \pm 0,05$ (mg EAT/g) e flavonoides: $112,86 \pm 0,40$ (mg RE/g).

Em dados encontrados sobre a espécie *S. brasiliensis*, no seu estudo Saraiva et al. (2013) realizou as dosagens de fenóis totais, flavonoides, bem como, atividade antioxidante, no entanto, foram utilizadas folhas e o solvente para extração foi o metanol, porém, alguns dados foram significantes para comparação.

Experimentos realizados por Silva et al. (2011) com o extrato das folhas de *P. pyramidalis* quantificaram $370,40 \pm 12,80$ mg equivalentes de rutina por grama de extrato. Nesse estudo o teor de flavonoides foi determinado diluindo alíquotas do extrato em metanol, acrescentando ácido acético glacial, solução metanólica de piridina e de cloreto de alumínio e água destilada, após 30 minutos de repouso no escuro foi medida a absorbância em 420 nm.

A diferença das metodologias e dos padrões para construção da curva de calibração do presente trabalho e do estudo realizado por Silva et al. (2011) provavelmente interferiram nos valores finais de quantificação dos flavonoides do extrato etanólico bruto das folhas da *P. pyramidalis*.

Sb-EtOH também obteve o melhor resultado de atividade antioxidante no método do sequestro do radical livre DPPH, pois apresentou menor CE_{50} de $1,46 \pm 0,07$, comparado com o Pp-EtOH que apresentou CE_{50} de $32,73 \pm 0,95$. Sb-EtOH só não apresentou melhores resultados do que os padrões BHA com CE_{50} de $1,22 \pm 0,43$, e vitamina C cujo CE_{50} foi de $0,64 \pm 0,22$. Vale ressaltar que quanto menor for os valores de CE_{50} , maior é a sua atividade antioxidante.

Alviano et al. (2008) realizou o teste de atividade antioxidante utilizando o ensaio do sequestro do DPPH com o extrato etanólico bruto das folhas de *P. pyramidalis*, com CE_{50} de $15,2 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado um bom resultado

quando comparado ao padrão do teste. Já Silva et al. (2011) traz que o extrato etanólico bruto das folhas *P. pyramidalis* no teste de DPPH não apresentou uma boa atividade antioxidante. A justificativa para as divergências de resultados encontradas nos estudos feitos por Alviano et al. (2008) e Silva et al. (2011) é que há vários fatores que interferem na composição final dos extratos de *P. pyramidalis*, como por exemplo, locais e épocas distintas de coleta do material vegetal, até mesmo, os solventes e métodos empregados.

No teste da oxidação do β -caroteno, Sb-EtOH também apresentou melhor atividade antioxidante, com $60,81 \pm 0,67\%$ de atividade, entretanto, Pp-EtOH com resultado de $22,86 \pm 0,27\%$ apresentou melhores resultados frente ao padrão vitamina C com apenas $7,50 \pm 2,12\%$ de atividade antioxidante.

A atividade antioxidante está intimamente ligada à presença de compostos fenólicos, pois estes apresentam em sua estrutura hidroxilas que podem funcionar como agentes doadores de elétrons. Outro determinante estrutural é a capacidade antioxidante de flavonoide atribuída às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (LIEN et al., 1999).

Sá et al. (2012) justificam que as capacidades antioxidantes dos compostos fenólicos são decorrentes da sua estrutura química e propriedade redutora, esses atributos são essenciais para sua ação sequestradora e neutralizadora dos radicais livres, agindo também na quelação de metais de transição, tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo, formando intermediários estáveis por ressonância.

Segundo Barreiros; David; David (2006), Sá et al. (2012) e Soares (2002), os flavonoides destacam-se dentre os compostos fenólicos presentes nos produtos naturais. Esses agem na neutralização dos radicais livres captando o elétron desemparelhado sem provocar danos às estruturas celulares.

Bahia et al. (2005) realizaram estudos do extrato clorofórmico das folhas de *P. pyramidalis* confirmando a presença de diversos biflavonoides, por outro lado nesse mesmo estudo a partir do extrato clorofórmico do caule não foram encontrados biflavonoides. É importante destacar que há evidências que alguns metabólitos são flutuantes nos órgãos dessa planta. Simões et al. (2007), explica que os biflavonoides são dímeros de flavonoides ligados por C-C ou C-O-C que desempenham diversas funções nas plantas como, por exemplo, alimento

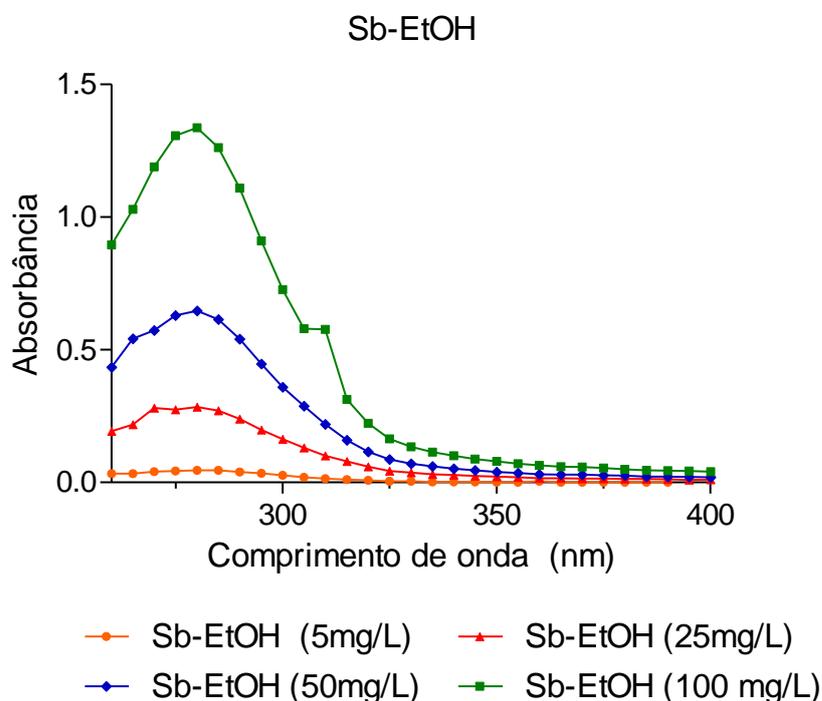
dissuasivo para insetos, antifúngico e ação protetora contra os raios UV que incidem principalmente sobre as folhas.

Diante dos resultados encontrados, podemos apontar que a espécie *S. brasiliensis* apresenta maior potencial antioxidante, bem como maiores teores de compostos fenólicos que a espécie *P. pyramidalis*, assim, Sb-EtOH apresenta potencial antioxidante promissor para ser utilizado no desenvolvimento do produto.

4.2.5.2 Fator de proteção solar (FPS)

De acordo com o espectro de varredura do extrato de *Schinopsis brasiliensis* (Figura 25) pode-se observar que as várias concentrações de Sb-EtOH, mostraram característica bandas de absorção em UV-B já que houve absorbância entre os comprimentos de onda de 290 e 320 nm.

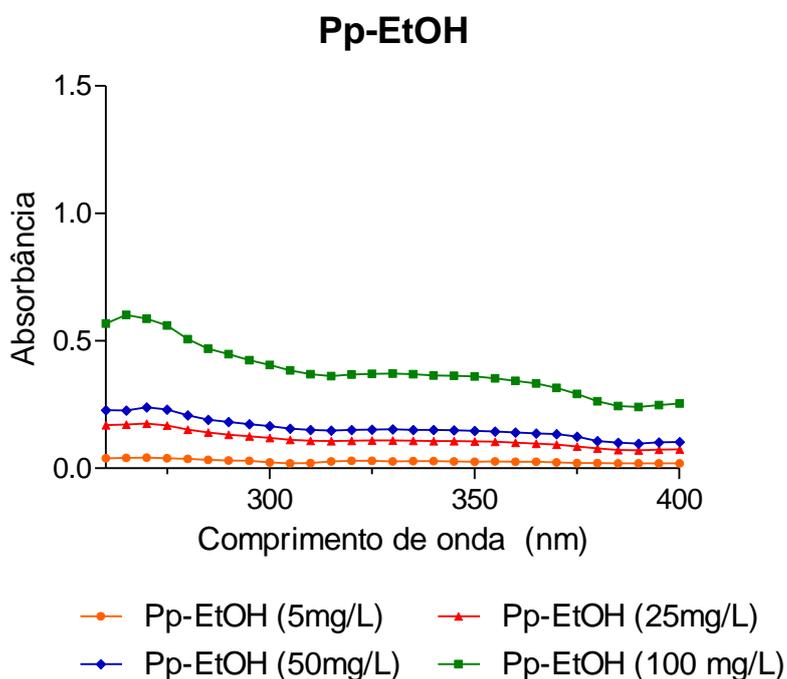
Figura 25: Perfil da absorção espectrofotométrica do extrato de *S. brasiliensis*.



Fonte: Autoria própria, 2014.

A figura 26 mostra o perfil de absorção espectrofotométrica do extrato etanólico bruto de *P. pyramidalis*.

Figura 26: Perfil da absorção espectrofotométrica de extratos de *P. pyramidalis*.

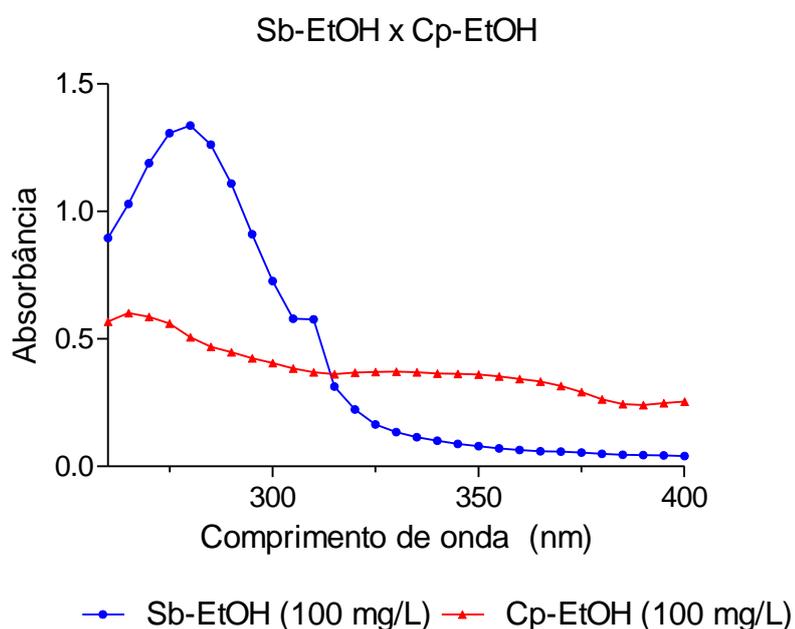


Fonte: Autoria própria, 2016.

Foi verificado que ocorreu um aumento na absorbância como aumento da concentração, sendo para todas as amostras os melhores resultados foram obtidos na concentração de 100mg/mL, tanto para Sb-EtOH, quanto para Pp-EtOH.

A figura 27 traz o gráfico comparativo entre as amostras de Sb-EtOH e Pp-EtOH utilizando a maior concentração [100mg/L] e, de acordo com o perfil de absorbância, Sb-EtOH apresentou maiores valores.

Figura 27: Perfil da absorção espectrofotométrica comparativa entre os extratos de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Dessa forma as amostras de *S. brasiliensis* apresentam-se com um possível potencial fotoprotetor.

Os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo em 240-285nm (banda II) e outro entre 300-400nm (banda I). Em geral, a banda II é considerada como devida a existência do anel A e a banda I devida ao anel B.

As características das bandas de absorção no ultravioleta são variadas para os flavonoides. As flavonas apresentam a banda I entre 304-350 nm, já nos flavonóis entre 352-385nm. Há alguns grupos de flavonoides, inclusive, que exibem uma banda I de baixa intensidade, frequentemente aparecendo como ombro da banda II (SIMÕES et al., 2007).

As flavonas como a apigenina foram descritas na literatura como sendo protetores químicos que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que os visíveis ao olho humano, protegendo as células vegetais dos danos causados pela fotoxidação. Essa classe de flavonoides age na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B (280-320 nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e caules e absorvem intensamente a luz nessa região do UV-B (FERREIRA, OLIVEIRA, SANTOS, 2008).

Além disso, foi demonstrado que o aumento da exposição de plantas à luz UV-B resulta na maior síntese de flavonas e flavonóis.

O cálculo do FPS *in vitro* foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986), consiste na medida da absorbância das amostras na região UV-B, tal método, é considerado eficaz, rápido e está amplamente descrito na literatura e possui boa correlação com os resultados dos métodos *in vivo* (REIS-MANSUR, 2011).

Na figura 28, pode-se observar os valores de FPS-UV-B encontrados para Sb-EtOH, nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L.

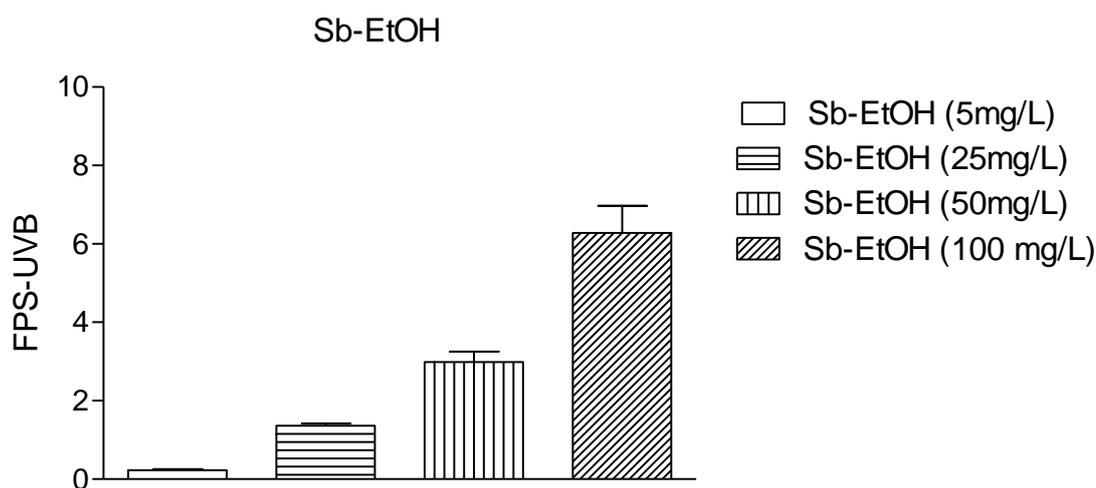


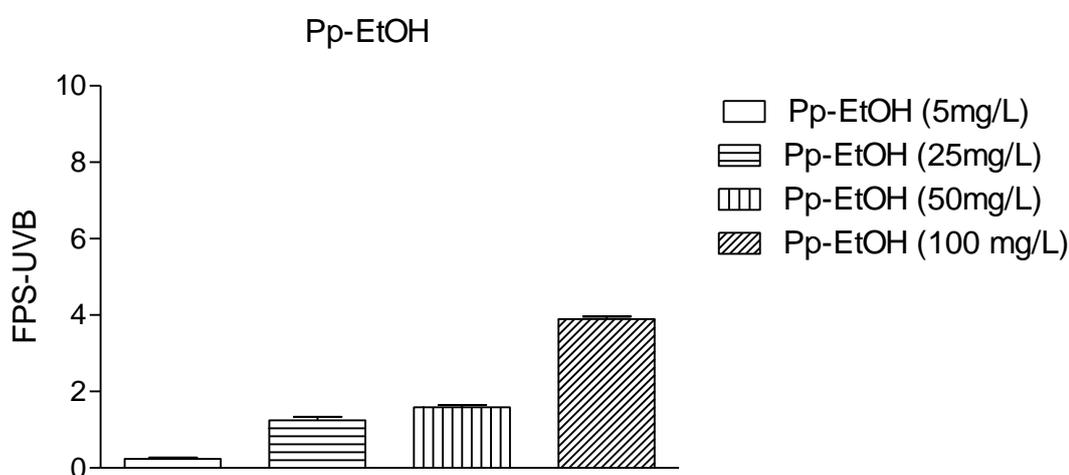
Figura 28: Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de Sb-EtOH, (290-320 nm).

Fonte: Autoria própria, 2014

Observa-se que as amostras de Sb-EtOH apresentaram os maiores valores de FPS, na concentração de 100mg.

Na figura 29, pode-se observar os valores de FPS-UVB encontrados para Pp-EtOH, nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L.

Figura 29: Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de Pp-EtOH.

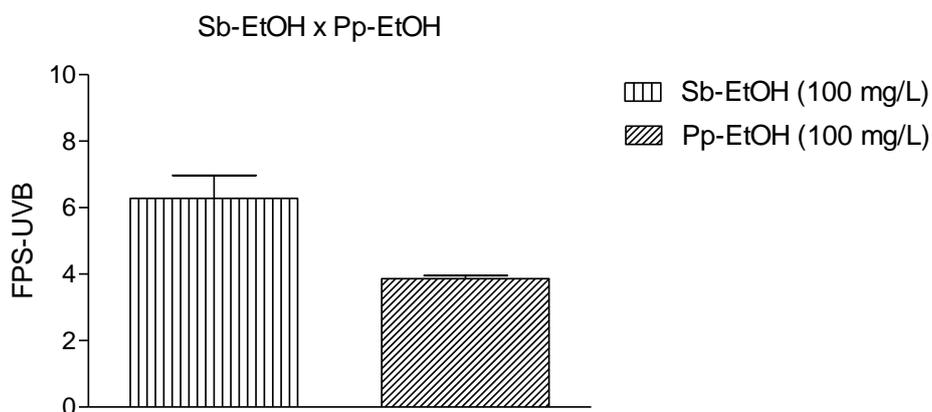


Fonte: Autoria própria, 2016.

As amostras Pp-EtOH, apresentaram aumento de FPS com o aumento da concentração, sendo a concentração de 100 mg/L a que apresentou um valor de FPS maior ($3,90 \pm 0,10$).

A figura 30 mostra os fatores de proteção solar comparativo de Sb-EtOH e Pp-EtOH com a maior concentração [100mg/L]. Os resultados de FPS para Sb-EtOH: $6,27 \pm 0,69$ e para Pp-EtOH: $3,90 \pm 0,10$.

Figura 30: Fator de Proteção Solar *in vitro* dos extratos de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*.



Fonte: Aatoria própria, 2016.

Para facilitar a análise comparativa entre os valores das amostras de FPS *in vitro* de Sb-EtOH e Pp-EtOH, segue tabela 8.

Tabela 8: Valores do Fator de Proteção Solar *in vitro* dos extratos de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*.

| Amostras | 5 mg/L | 25 mg/L | 50 mg/L | 100 mg/L |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sb-EtOH | 0,21 ± 0,01 ^a | 1,35 ± 0,05 ^a | 2,98 ± 0,27 ^a | 6,27 ± 0,69 ^a |
| Pp-EtOH | 0,23 ± 0,02 ^a | 1,24 ± 0,09 ^a | 1,59 ± 0,05 ^b | 3,89 ± 0,06 ^b |

Fonte: Aatoria própria, 2014.

FPS- Fator de Proteção Solar dos extratos brutos de Sb-EtOH e Pp-EtOH. Valores são expressos como média ± SD (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.05$.

De acordo com a resolução RDC 30/12 (BRASIL, 2012) publicada pela ANVISA, os produtos de proteção solar utilizados pela população brasileira ganharam novas regras para garantir a proteção da pele dos usuários. Uma das principais mudanças é que o valor mínimo do Fator de Proteção Solar (FPS) aumentou de 2 para 6 (BRASIL, 2006).

Várias pesquisas têm sido realizadas com objetivo de produzir protetores solares à base de produtos naturais, principalmente com extratos vegetais. Essas pesquisas têm se fundamentado no uso de espécies que possuam constituintes químicos contendo cromóforos e demais compostos com possível atividade antioxidante, que neutralizem os radicais livres produzidos na pele após a exposição excessiva à radiação UV destacando-se nesse sentido os compostos fenólicos e flavonoides (F'GUYER; AFAQ; MUKTHAR, 2003).

Dessa forma, extrato de *S. brasiliensis* (Sb-EtOH), assume o pré-requisito de valores mínimos para os valores de fotoproteção, e pode servir como uma alternativa em formulações farmacêuticas com ação fotoprotetora.

Embora o teste tenha sido realizado *in vitro*, este método se correlaciona bem com os testes *in vivo*, pois se refere a absorbância da substância com o efeito

eritematogênico da radiação e intensidade de luz em comprimentos de onda específicos entre 290 e 320 nm (região UVB).

4.2.6 Toxicidade aguda

Após pré-tratamento com doses únicas de 2000 mg/kg de Sb-EtOH e Pp-EtOH, por via oral, durante o período de observação de 14 dias, não foram observadas alterações comportamentais, fisiológicas, nem a morte dos animais, indicando, assim, baixa toxicidade dos extratos etanólicos brutos de *Schinopsis brasiliensis* e *P. pyramidalis*.

Neste experimento foi observado que Sb-EtOH e Pp-EtOH tem $DL_{50} > 2,0$ g/kg quando administrado por via oral.

4.2.6.1 Avaliação comportamental dos camundongos

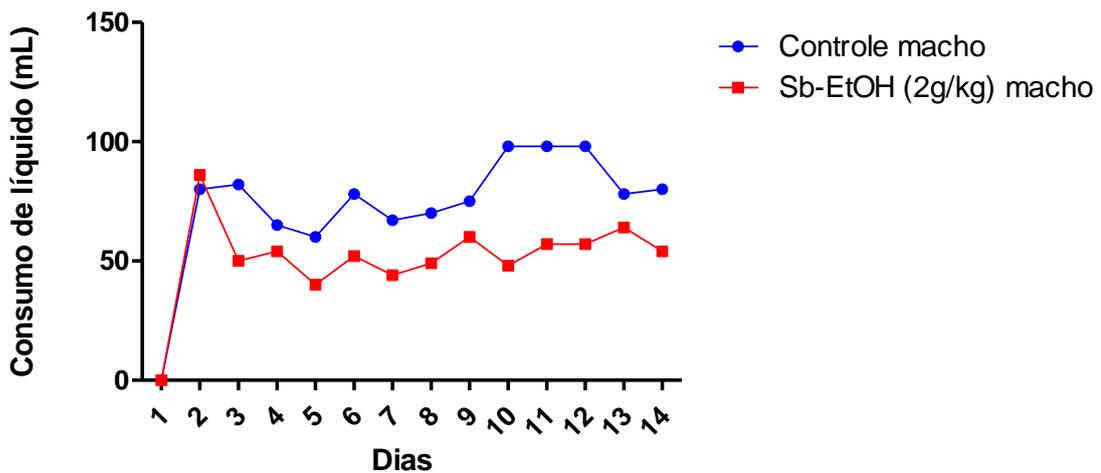
As triagens comportamentais dos animais foram realizadas em 0,5, 1, 2, 3 e 4 h após a administração de Sb-EtOH e Pp-EtOH na dose de 2,0 g/kg (peso corporal) por via oral e durante os 14 dias. Os animais não apresentaram mudanças significativas no comportamento, também não mostraram quaisquer sinais de toxicidade ou de outras atividades fisiológicas.

4.2.6.2 Consumo de alimento e água

Com relação ao consumo de água após o tratamento com Sb-EtOH, na dose de 2 g/kg via oral, verifica-se que os animais apresentaram alterações significativas no consumo de água, nos grupos dos machos e das fêmeas.

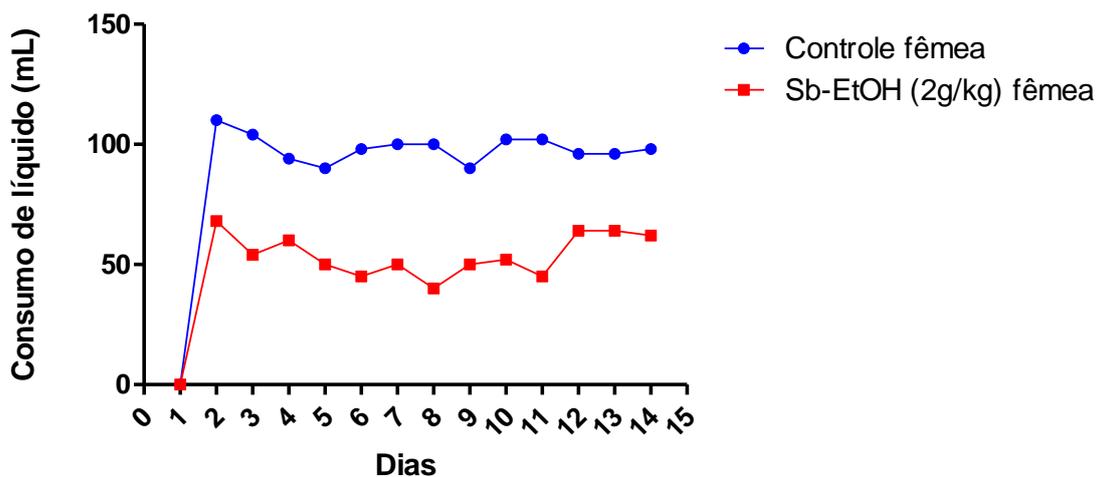
Os animais tratados diminuíram de forma significativa o consumo de água, conforme pode ser verificado na figura (31 e 32).

Figura 31: Consumo de líquido pelos animais machos tratados com Sb-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2013.

Figura 32: Consumo de líquido pelas fêmeas tratadas com Sb-EtOH.

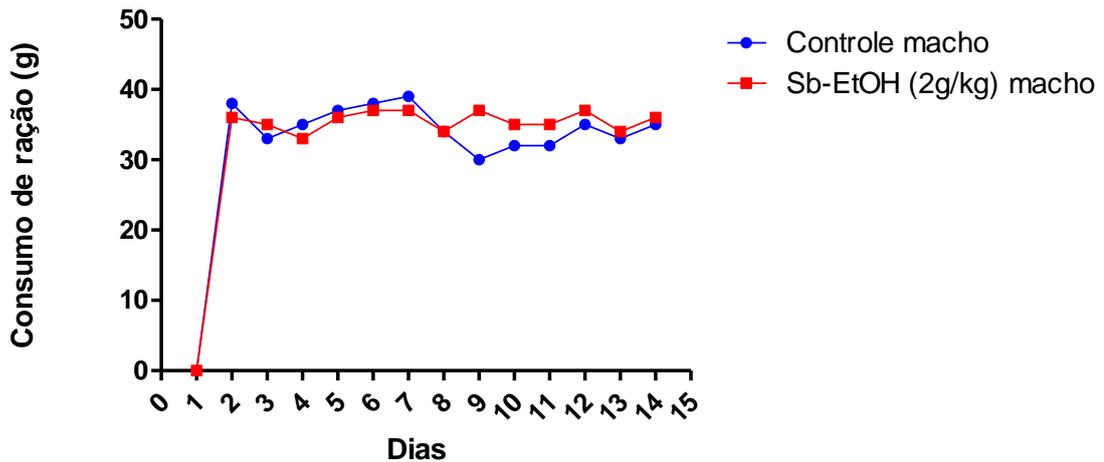


Fonte: Autoria própria, 2013.

Para o grupo tratado com Sb-EtOH 2 g/kg das fêmeas a média da quantidade de ração consumida no final do experimento foi de $25,64 \pm 2,09$ g, já para o grupo

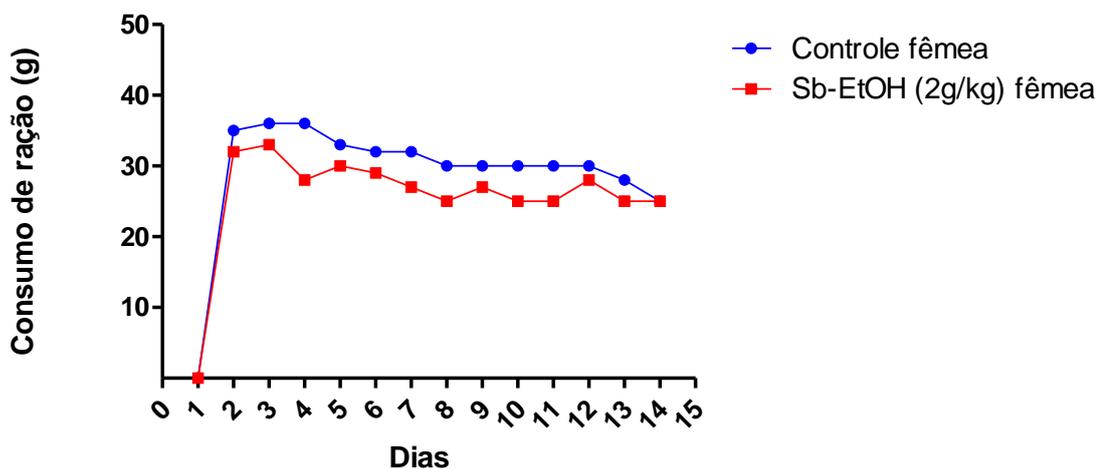
controle foi de $29,07 \pm 2,38$ g, essa variação foi considerada significativa. Para os machos, não houve diferença significativa no consumo de ração quando comparado o grupo tratado que consumiu $32,21 \pm 2,57$ g com o grupo controle que consumiu $33,00 \pm 2,56$ g (Figura 33 e 34).

Figura 33: Consumo de alimentos pelos machos tratados com Sb-EtOH



Fonte: Autoria própria, 2013.

Figura 34: Consumo de alimentos pelas fêmeas tratadas com Sb-EtOH.

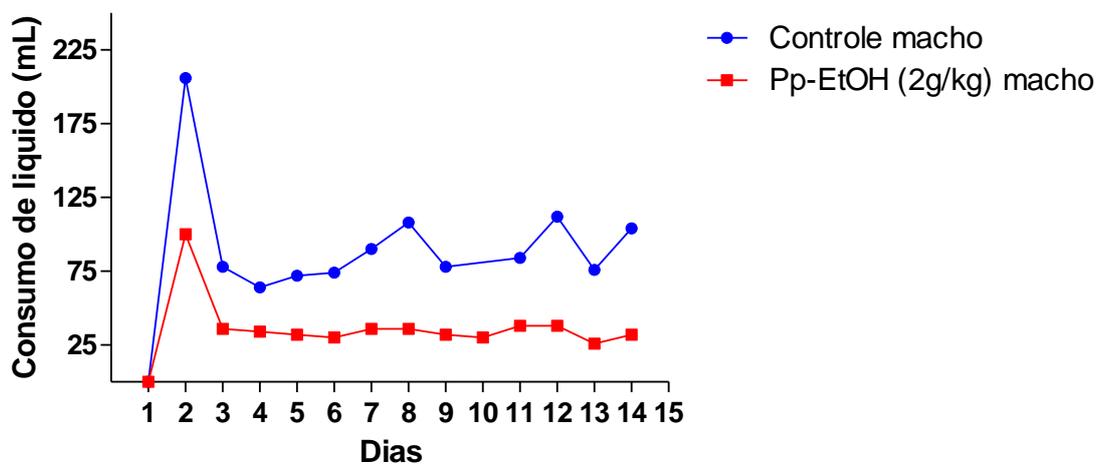


Fonte: Autoria própria, 2013.

O tratamento com Pp-EtOH, na dose de 2 g/kg via oral, com relação ao consumo de água mostraram alterações significativas, em ambos os grupos tratados, dos machos e das fêmeas, quando comparados ao grupo controle ($p <$

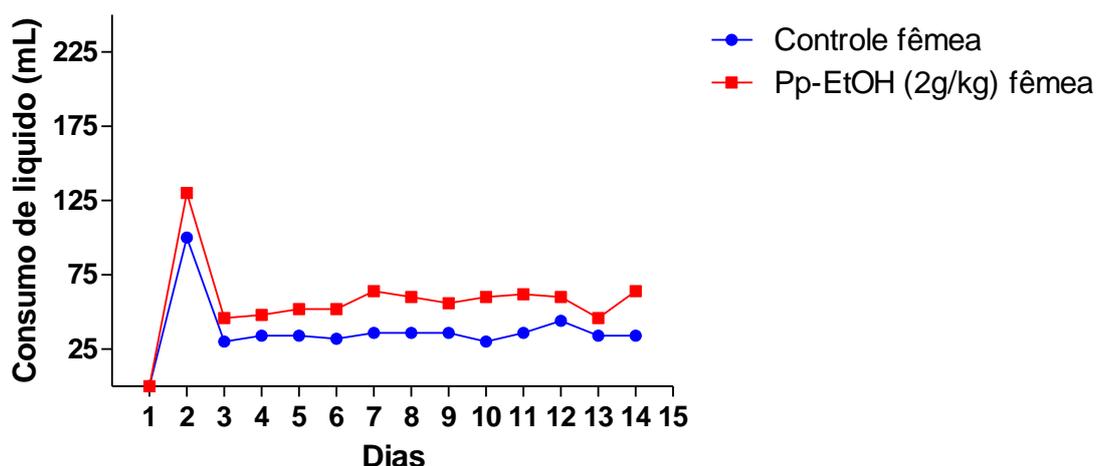
0,05). Após o tratamento houve redução significativa na ingesta hídrica, conforme pode ser verificado na figura (35 e 36).

Figura 35: Consumo de líquido pelos animais machos tratados com Pp-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura 36: Consumo de líquido pelas fêmeas tratadas com Pp-EtOH.

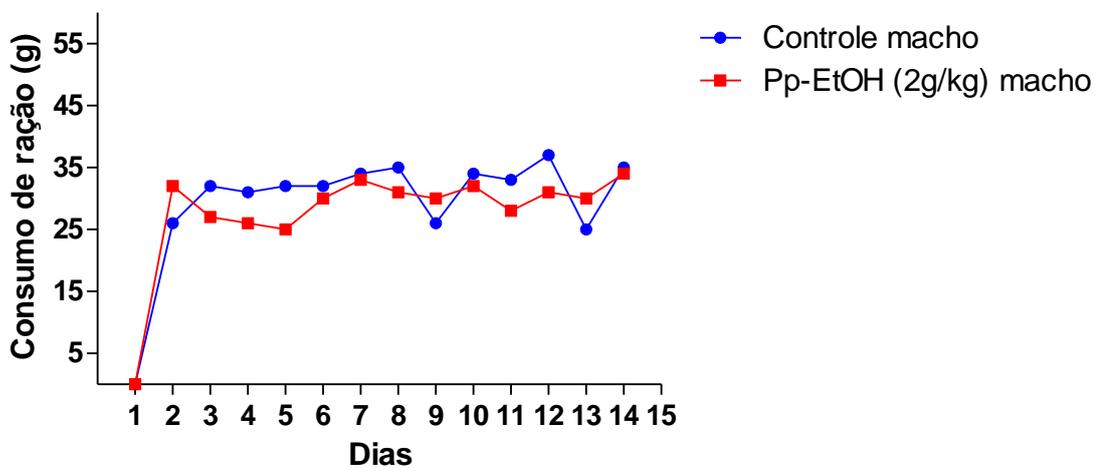


Fonte: Autoria própria, 2016.

Com relação ao consumo de alimentos após o tratamento com Pp-EtOH não houve diferenças significativas na quantidade de ração consumida, nem para o

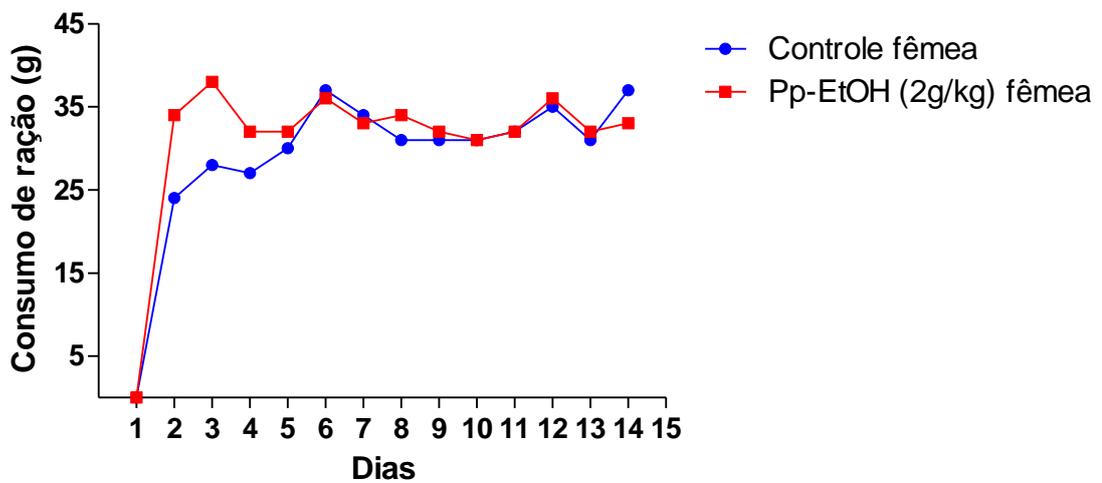
grupo dos machos, nem das fêmeas, quando comparados aos grupos controles, conforme figuras (37 e 38).

Figura 37: Consumo de alimentos pelos machos tratados com Pb-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura 38: Consumo de alimentos pelas fêmeas tratadas com Pp-EtOH.

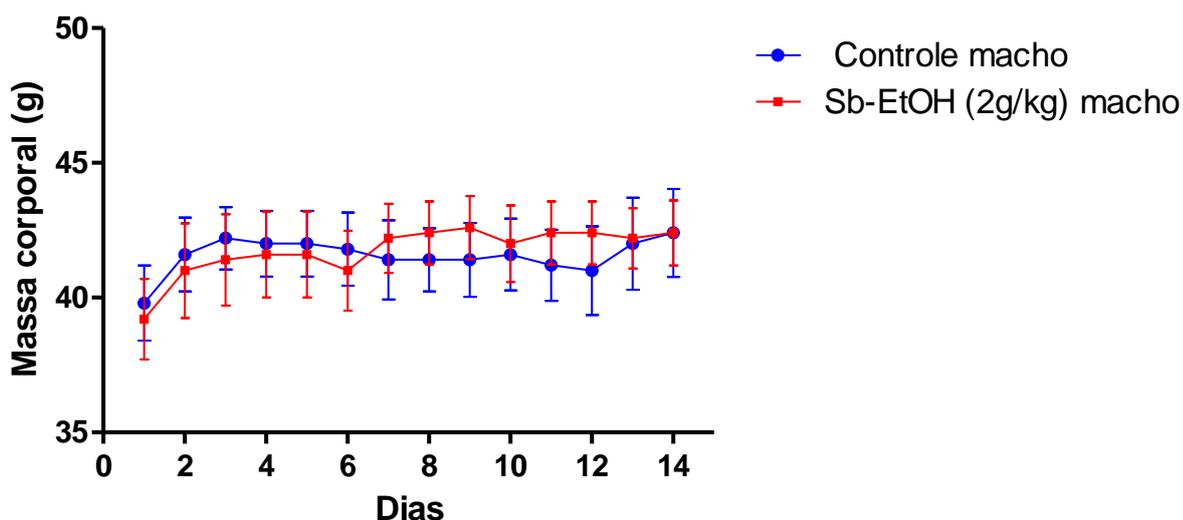


Fonte: Autoria própria, 2016.

4.2.6.3 Variação da massa corporal

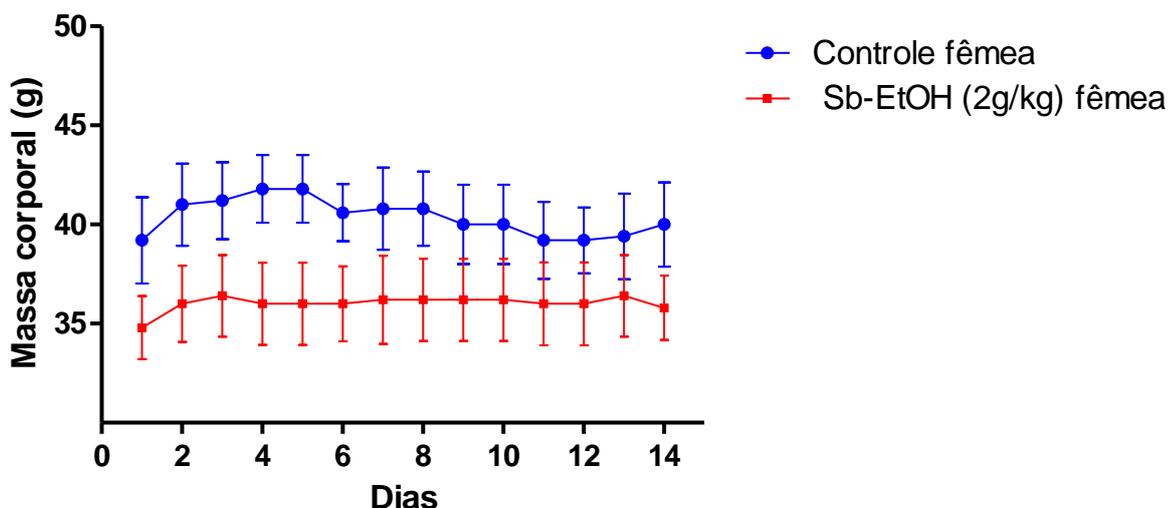
Houve mudanças significativas ($p < 0,05$) no peso corporal dos camundongos do dia 1 ao dia 14 no grupo tratado com o extrato de Sb-EtOH na dose de 2 g/kg v.o, para as fêmeas. No final do experimento, a média do grupo controle para os machos foi de $41,56 \pm 0,17$ g, enquanto a do grupo tratado com dose de 2 g/kg foi de $41,74 \pm 0,24$ g. Para o grupo das fêmeas a média do grupo controle foi de $40,36 \pm 0,24$ g enquanto a do grupo tratado com a dose de 2 g/kg foi de $36,01 \pm 0,10$ g. A variação de peso ao longo do experimento pode ser vista nas figuras 39 e 40.

Figura 39: Ganho de peso dos machos tratados com Sb-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2013.

Figura 40: Ganho de peso das fêmeas tratadas com Sb-EtOH.

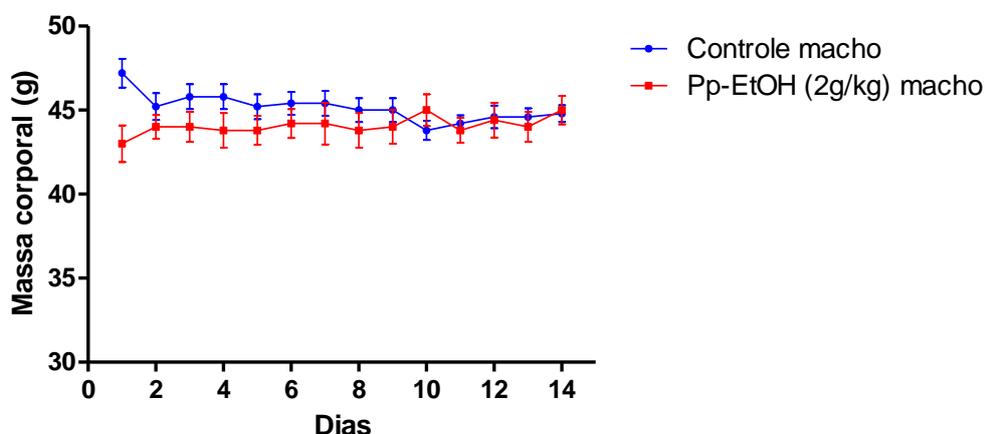


Fonte: Autoria própria, 2013.

Com relação a massa corporal do grupo tratado com o extrato de Pp-EtOH na dose de 2 g/kg v.o, não houve diferença estatística na média dos pesos do grupo dos machos tratados $45,14 \pm 0,21$ g, com relação ao controle $44,07 \pm 0,13$ g.

Para o grupo das fêmeas a média do grupo controle foi de $41,69 \pm 0,12$ g enquanto a do grupo tratado com Pp-EtOH na dose de 2 g/kg foi de $44,99 \pm 0,12$ g, sendo considerado estatisticamente diferente. A variação de peso ao longo do experimento pode ser vista nas figuras 41 e 42.

Figura 41: Ganho de peso dos machos tratados com Pp-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2016.

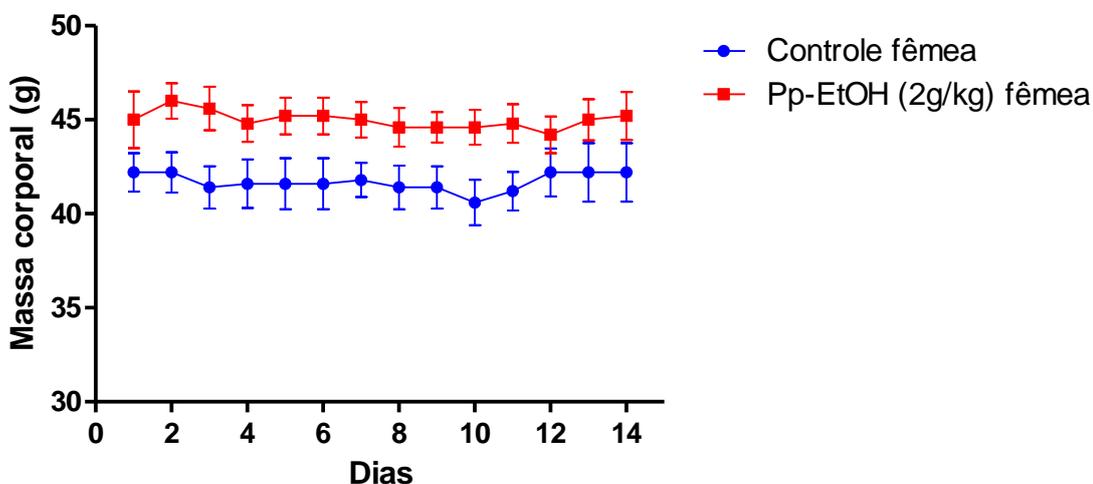


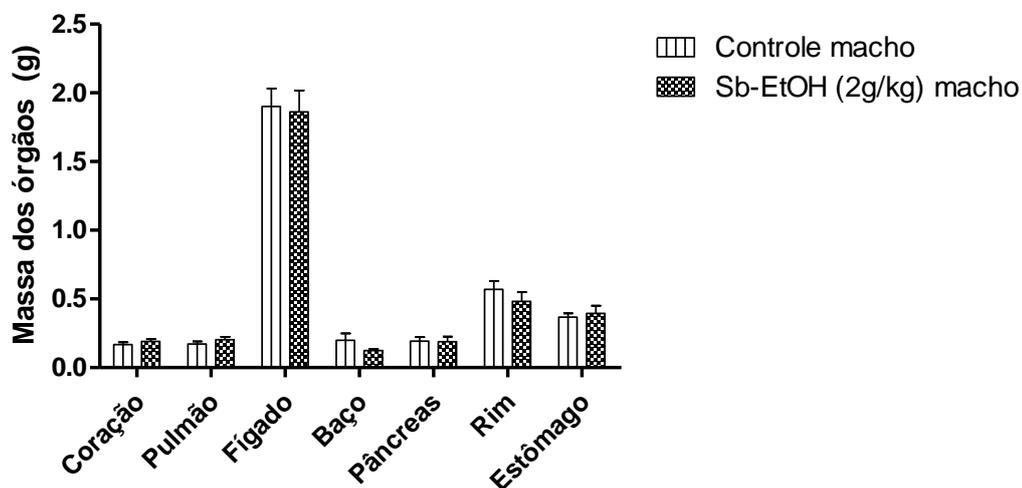
Figura 42: Ganho de peso das fêmeas tratadas com Pp-EtOH.

Fonte: Autoria própria, 2016.

4.2.6.4 Análise macroscópica e massa dos órgãos

Os órgãos dos animais tratados com extrato etanólico bruto de Sb-EtOH, não exibiram macroscopicamente alterações na forma, coloração e dimensões quando comparados aos órgãos do grupo controle. Com relação a massa dos órgãos só houve diferença estatística na massa do fígado das fêmeas tratadas com Sb-EtOH na dose de 2g/kg, conforme figuras 43 e 44.

Figura 43: Massa dos órgãos dos machos tratados com Sb-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2013.

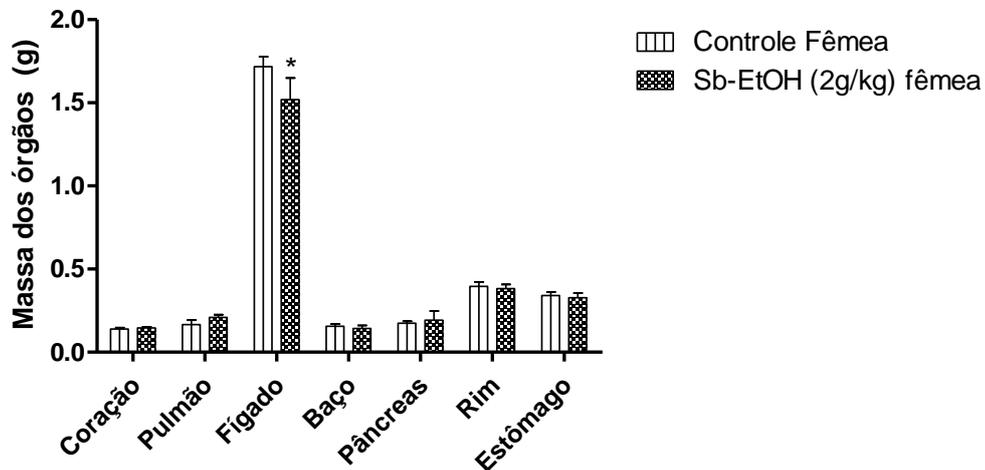
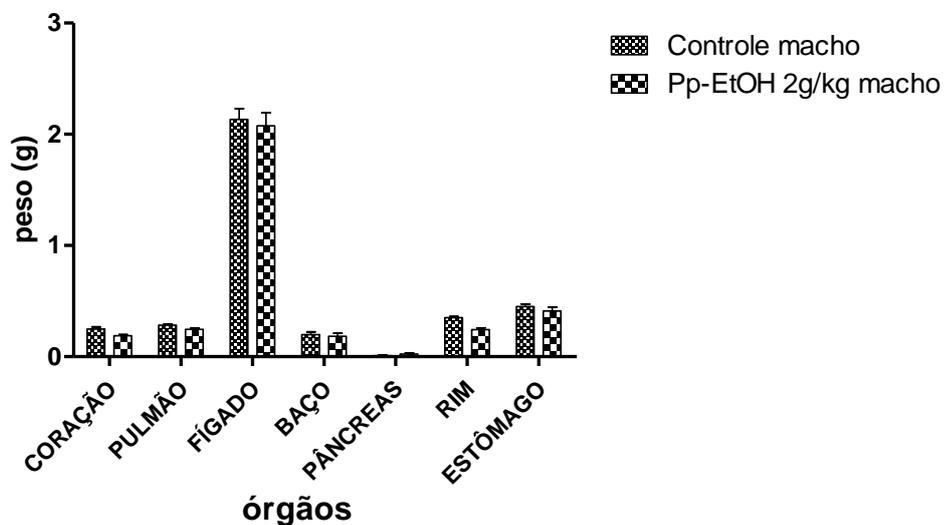


Figura 44: Massa dos órgãos das fêmeas tratadas com Sb-EtOH.

Fonte: Autoria própria, 2013.

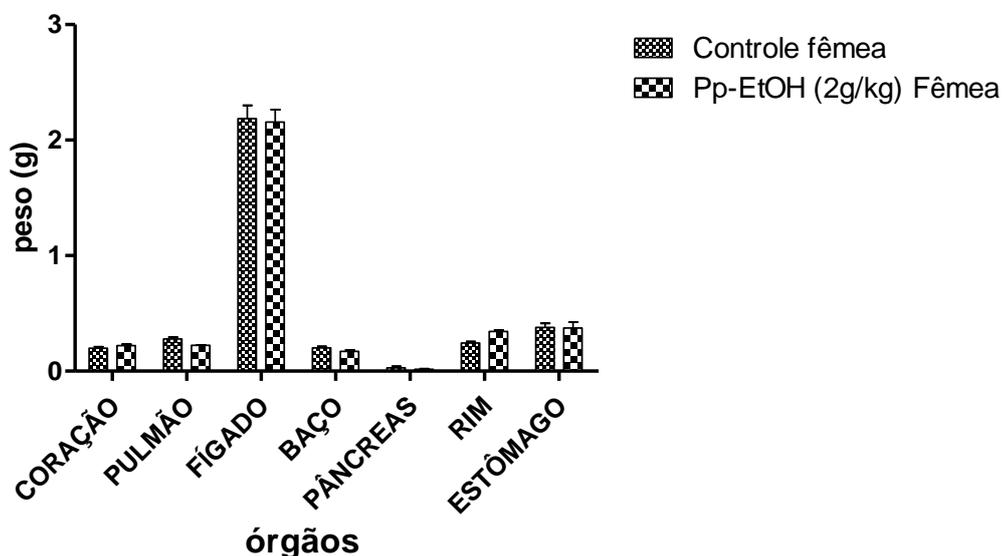
Com relação aos órgãos dos animais tratados com extrato etanólico bruto de Pp-EtOH não exibiram macroscopicamente alterações na forma, coloração e dimensões, nem apresentaram alterações nas massas dos órgãos quando comparados aos órgãos do grupo controle, nem nas fêmeas, nem nos machos conforme figuras 45 e 46.

Figura 45: Massa dos órgãos dos machos tratados com Pp-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura 46: Massa dos órgãos das fêmeas tratadas com Pp-EtOH.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Os resultados da toxicidade aguda dos extratos etanólicos brutos de *S. brasiliensis*, bem como, *P. pyramidalis*, podem ser considerados de baixa toxicidade no teste de toxicidade aguda, pois em doses elevadas de 2 g/kg por v.o. não causou morte, alterações comportamentais nos animais. Entretanto, outros estudos toxicológicos devem ser feitos, tais como, toxicidade sub-crônica e crônica a fim de determinar o perfil de segurança de Sb-EtOH e Pp-EtOH.

Esse resultado de baixa toxicidade aguda é um parâmetro bastante importante, uma vez que, há registro na literatura do potencial tóxico-irritante das plantas da família Anacardiaceae e isso tem sido atribuído, principalmente, à presença de derivados fenólicos encontrados em suas espécies tais como taninos, saponinas, terpenos e alcaloides (PELL, 2004).

Assim, diante de tantos resultados dessa primeira parte experimental, foi verificado que entre as duas espécies estudadas, o extrato etanólico bruto de *S. brasiliensis* apresentou os melhores resultados nos experimentos realizados, apresentando maiores valores de dosagens de compostos fenólicos, flavonoides, maiores valores de FPS, além de apresentar melhor atividade antioxidante, portanto, a espécie *S. brasiliensis*, foi a espécie selecionada para dar andamento ao desenvolvimentos de uma formulação cosmética com efeito fotoprotetor e antioxidante.

CAPÍTULO II

5 CAPÍTULO II

O capítulo II traz toda parte metodológica e os resultados do desenvolvimento magistral das formulações.

5.1 Parte Experimental II

5.1.1 Desenvolvimento das formulações

Foram realizados estudos com o objetivo de selecionar adequadamente excipientes para o desenvolvimento das bases utilizadas como veículos para as formulações.

5.1.1.1 Desenvolvimento das bases do tipo gel

5.1.1.1.1 Gel de Aristoflex®

Sob agitação foi adicionado o Aristoflex® AVC® lentamente em água a temperatura ambiente (25°C), para hidratação do polímero. Após a obtenção da base gelificada, foram adicionados os conservantes: metilparabeno e propilparabeno dispersos em propilenoglicol, e o Imidazolidinil Ureia pré-solubilizado em água. O agente gelificante já se apresenta na dispersão pré-neutralizado, desconsiderando a necessidade de uma neutralização após a hidratação do polímero. Essa característica facilita o manuseio do produto e agiliza a preparação das formulações. Posteriormente, foi incorporada a formulação o extrato em diferentes concentrações e o filtro UVA-B químico hidrossolúvel visando potencializar o FPS das formulações. As concentrações das matérias primas para a obtenção da formulação padronizada da base gel de Aristoflex® podem ser descritas na tabela 9.

Tabela 9: Formulação padronizada da base gel Aristoflex®

| Matérias primas | Concentração | Ação |
|---------------------------|---------------------|--------------------|
| Aristoflex® | 1,5% | Agente gelificante |
| Metilparabeno | 0,15% | Conservante |
| Imidazolidil Uréia | 0,10% | Conservante |
| Propilenoglicol | 3% | Umectante |
| Propilparabeno | 0,1% | Conservante |
| Água | q.s.p | Veículo |

Fonte: Aatoria própria, 2014.

5.1.1.1.2 Gel de Carbopol®

O gel base utilizado foi composto por Carbopol® na concentração de 1%, imidazolidiniluréia, metilparabeno, propilparabeno, trietanolamina e água destilada. Todos os produtos foram adquiridos comercialmente de diferentes fornecedores.

Esta base foi preparada dispersando o agente gelificante (Carbopol®) em água com conservante Metilparabeno (Nipagin) juntamente com umectante (Propilenoglicol). Em seguida, deixou-se em repouso inicial por 24 horas, para facilitar a preparação do gel na dispersão do Carbopol® na água. Posteriormente foi misturado e adicionado o agente alcalinizante (trietanolamina) até atingir uma faixa de pH entre 5,0 e 5,5 obtendo-se um gel transparente. Na tabela 10 podemos verificar a composição da formulação padronizada da base gel de Carbopol®.

Tabela 10: Formulação padronizada da base gel Carbopol®.

| Matérias primas | Concentração | Ação |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| Carbopol® | 1% | Agente gelificante |
| Metilparabeno | 0,1% | Conservante |
| Propilenoglicol | 7% | Umectante |
| EDTA | 0,1% | Agente quelante |
| Trietanolamina | q.s (pH=5,0 a 5,5) | Agente alcalinizante |
| Água purificada | q.s.p. | Veículo |

Fonte: Aatoria própria, 2014.

5.1.1.2 Desenvolvimento das bases do tipo emulsão

5.1.1.1.3 Emulsão de Polawax®

A emulsão de Polawax® foi obtida pela técnica usual de emulsificação por inversão de fases no seguinte procedimento de preparo: aquece separadamente a fase 1 (fase oleosa) a 75°C e a fase 2 (fase aquosa) a 80°C e, em seguida, verter lentamente, com agitação mecânica vigorosa e constante, a fase 2 sobre a fase 1, agitando lentamente, ocorrerá o resfriamento e agitar até alcançar a temperatura ambiente. Após 24 horas da produção da base, foi realizado o controle de qualidade, analisando principalmente pH, viscosidade, teste de resistência à centrifugação, características organolépticas e aspectos macroscópicos.

Na tabela 11 podemos verificar a composição da formulação padronizada da base emulsão Polawax®.

Tabela 11: Formulação padronizada da base Polawax® (Emulsão O/A)

| Matérias primas | Concentração | Ação | 1- F |
|--------------------------|--------------|-----------------|------|
| 1- Polawax® | 6% | Emulsionante | a |
| 1- Propilparabeno | 0,05% | Conservante | s |
| 2- Metilparabeno | 0,15% | Conservante | e |
| 2- Glicerina bidestilada | 5% | Umectante | o |
| 2- Propilenoglicol | 3% | Umectante | l |
| 1- Oleato de isodecila | 5% | Emoliente | e |
| 1- BHT | 0,05% | Antioxidante | o |
| 2- EDTA | 0,05% | Agente quelante | s |
| 2- Água purificada | q.s.p. | Veículo | a |

2- Fase aquosa

Fonte: Autoria própria, 2014.

5.1.1.1.4 Emulsão de Lanette®

No desenvolvimento da formulação da base Lanette® foi utilizada a mesma técnica descrita conforme item 5.1.1.1.3, apenas foi modificada a cera auto-emulsionante para a Lanette®, nas mesmas concentrações e condições de

temperatura e levando em consideração o planejamento experimental da pesagem e separação dos excipientes nas concentrações adequadas para aplicação da técnica do desenvolvimento da emulsão, demonstrado na figura 47.

Na tabela 12 podemos verificar a composição da formulação padronizada da base emulsão Polawax®.

Figura 47: Desenvolvimento farmacotécnico da base emulsão.



Fonte: Autoria própria, 2014.

Tabela 12: Formulação padronizada da base Lanette®.

| Matérias primas | Concentração | Ação |
|--------------------------|--------------|-----------------|
| 1- Lanette® | 6% | Emulsionante |
| 1- Propilparabeno | 0,05% | Conservante |
| 2- Metilparabeno | 0,15% | Conservante |
| 2- Glicerina bidestilada | 5% | Umectante |
| 2- Propilenoglicol | 3% | Umectante |
| 1- Oleato de isodecila | 5% | Emoliente |
| 1- BHT | 0,05% | Antioxidante |
| 2- EDTA | 0,05% | Agente quelante |
| 2- Água purificada | q.s.p | Veículo |

1- Fase oleosa; 2- Fase aquosa;

Fonte: Autoria própria, 2014.

5.1.3 Preparo dos extratos para incorporação

A espécie *S. brasiliensis* foi a selecionada para dar seguimento ao desenvolvimento da formulação, pois apresentou melhores resultados do que a espécie *P. pyramidalis*. Na primeira parte do desenvolvimento metodológico foi utilizado o extrato de Sb-EtOH nas atividades testadas e o ideal seria seguir todo o processo com o mesmo extrato, entretanto, quando chegou na etapa da produção galênica, Sb-EtOH apresentou incompatibilidade farmacotécnica com as bases, dificuldade de incorporação do extrato etanólico bruto de *S. brasiliensis* nos veículos, o que impossibilitou a continuação do estudo com Sb-EtOH. Assim, foi necessário a obtenção de extratos fluidos para facilitar o processo de incorporação.

5.1.3.1 Preparo do extrato fluido

Para obtenção do extrato fluido (Sb-FI) hidroalcoólico foram utilizados 200 g do material vegetal em pó, submetido à maceração com uma solução hidroalcoólica de 50, 60, 70, 80 e 90% (1000 mL).

Após 72 horas, os primeiros 150 mL foram coletados e armazenados em recipiente âmbar, sob refrigeração, enquanto que o restante do material foi extraído sucessivamente com a mesma solução de solvente. Posteriormente, o restante da solução extrativa foi concentrado em rotaevaporador, a temperatura máxima de 55 °C, até o volume de 50 mL, o qual foi adicionado aos primeiros 150 mL extraídos, obtendo-se 200 mL de extratos fluidos da planta.

O extrato fluido foi considerado 1:1, pois 200 g do material vegetal processado foi utilizado para obter 200 mL de extrato concentrado (BRASIL, 1998). Foram obtidos no total 5 extratos hidroalcoólicos: (Sb-fl 50) Extrato hidroetanólico 50% de Dv-Sb; (Sb-fl 60): Extrato hidroetanólico 60% de Dv-Sb; (Sb-fl 70): Extrato hidroetanólico 70% de Dv-Sb; (Sb-fl 80): Extrato hidroetanólico 80% de Dv-Sb; (Sb-fl 90): Extrato hidroetanólico 90% de Dv-Sb.

Após obtenção dos extratos fluidos, foram realizadas novas análises com tais extratos para saber se os teores alcoólicos das soluções iriam influenciar no

processo extrativo, dosagens de fenóis, bem como nas atividades antioxidante e fotoprotetora.

5.1. 4 Métodos espectrofotométricos

5.1.4.1 Determinação do conteúdo fenólico total de extratos hidroetanólicos

A metodologia foi realizada conforme descrito no item 4.1.7.1 (pág. 48). A equação de correlação foi construída com ácido gálico foi $y = 0,0677x + 0,0125$ ($R^2 = 0,9981$). Os conteúdos fenólicos totais foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g).

5.1.4.2 Método do sequestro do radical DPPH de extratos hidroetanólicos

A metodologia foi realizada conforme descrito no item 4.1.7.3.1 (pág. 48).

5.1.4.3 Método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno de extratos hidroetanólicos

A metodologia foi realizada conforme descrito no item 4.1.7.3.2 (pág 49).

5.1.4.4 Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS) de extratos hidroetanólicos

A metodologia foi realizada conforme descrito no item 4.1.7.4 (pág 50).

5.1.5 Estudo preliminar de incorporação do extrato nas bases e análise de compatibilidade.

Foi realizado um teste de incorporação dos extratos fluido com os veículos. Aos veículos foram adicionados extrato fluido na concentração de 10% (p/v).

5.1.5.1 Desenvolvimento das formulações fotoprotetoras

A partir das bases desenvolvidas, foram incorporados os filtros químicos e extrato fluido de Sb-fl, em diferentes concentrações nas formulações com veículos, como mostra na tabela abaixo.

Tabela 13: Composição das formulações fotoprotetoras.

| Componentes | Função | F1 | F2 | F3 | F4 |
|--------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| *Filtro químico | Filtro UVAB | 10% | 0% | 5% | 10% |
| Extrato Sb-fl | Filtro teste | 0% | 10% | 5% | 10% |
| Base | Veículo | q.s.p | q.s.p | q.s.p | q.s.p |

*Filtro químico é uma mistura obtida comercialmente composta por: 18% de fenilbenzimidazol na forma ácida + 15% de hidroxí-4-metoxibenzofenona na forma ácida.

Fonte: Aatoria própria, 2014.

5.1.6. Estudo de estabilidade preliminar

As amostras foram submetidas a estudos de estabilidade preliminar de acordo com os procedimentos descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos.

O teste de estabilidade preliminar durou 15 dias. Alguns parâmetros foram analisados tais como: aspecto, cor, odor, pH, viscosidade, espalhabilidade e teste da resistência centrifugação. Os testes foram realizados no primeiro e no último dia. As amostras foram avaliadas em triplicata, sendo a primeira avaliação 24 horas após a manipulação (BRASIL, 2004).

5.1.6.1 Propriedades organolépticas

As propriedades organolépticas foram analisadas macroscopicamente. As cores foram comparadas visualmente entre os produtos testados com a cor do padrão. Com relação ao odor, foram comparados o odor do produto teste com o odor do padrão. As amostras foram classificadas, como: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada.

5.1.6.2 Determinação do pH

Para a determinação do pH foi realizada em uma dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra em água destilada, usando pHmetro digital. O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa (BRASIL, 2001) e valores mantidos entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo, devem ser usados como critério de estabilidade.

5.1.6.3 Determinação da espalhabilidade

A determinação da consistência por extensibilidade foi realizada como proposto por Isaac; Uchiyama (1998), adaptado de Bueno (1984). A amostra de produto 0,3 g foi colocada entre duas placas de vidro, com 10 x 20 cm e 0,5cm de espessura, sendo uma delas disposta sobre um papel milimetrado, colado em uma placa de madeira. A adição de pesos de 250, 500, 750 e 1000g, a cada três minutos, na placa superior, promove o espalhamento do produto, que pode ser medido como extensibilidade, em centímetros.

5.1.6.4 Teste de congelamento e descongelamento

Em embalagem adequada, as amostras foram submetidas a condições extremas de temperaturas. Os ciclos de congelamento e descongelamento alternam 24 horas em temperaturas elevadas e 24 horas em temperaturas baixas, sendo recomendados os seguintes conjuntos: Temperaturas de $-5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.6.5 Teste de resistência à centrifugação

Em tubo para centrífuga, cônico, graduado, foram pesados 5 g da amostra a ser analisada, os quais foram submetidos a rotações crescentes de 980, 1800 e 3000 rpm, em centrífuga, durante quinze minutos em cada rotação, à temperatura ambiente.

5.1.6.6 Viscosidade relativa

A viscosidade foi determinada em viscosímetro. Cerca de 15g de amostra com o sensor imerso possibilita, sob velocidades crescentes, a leitura das viscosidades. Curvas ascendente e descendente foram feitas correspondentes a velocidades crescentes e decrescentes, a fim de serem classificados os sistemas em Newtonianos ou não-Newtonianos.

Figura 48: Viscosímetro Quimis®



Fonte: Autoria própria, 2013.

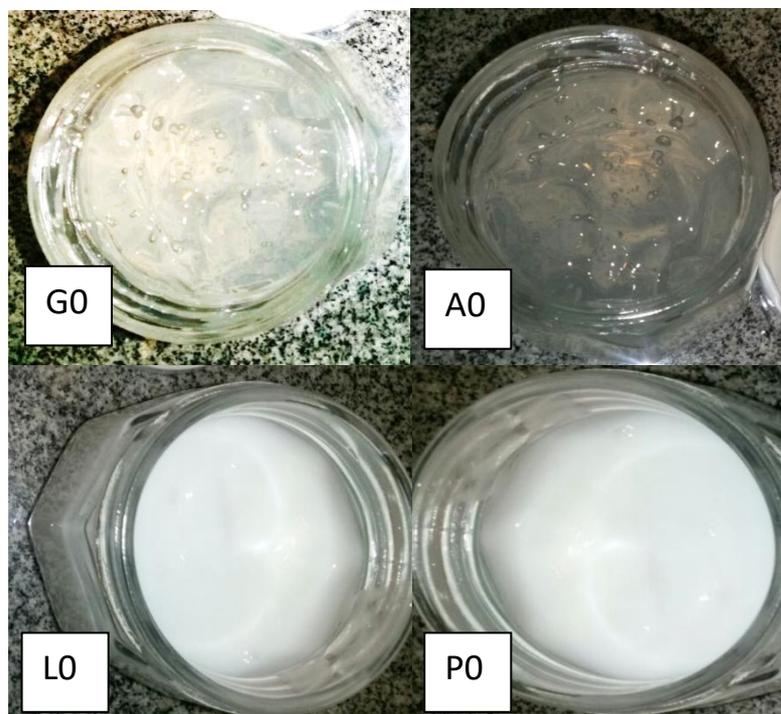
5.2 RESULTADOS DA PARTE II

5.2.1 Desenvolvimento das formulações, incorporação dos extratos e análise de compatibilidade

De acordo com os resultados da produção das bases desenvolvidas, foram obtidas quatro formulações bases: emulsão Lanette® (L0); emulsão Polawax® (P0); gel Carbopol® (G0) e gel Aristoflex®(A0), conforme figura 49.

As amostras dos veículos apresentaram-se macroscopicamente estáveis, odor característicos, aspecto homogêneo, a cor das emulsões L0 e P0 branco leitoso, e a cor do gel G0 transparente, brilhoso e límpido e A0 transparente e límpido, após o teste de centrifugação as amostras permaneceram homogêneas, conforme figura 50.

Figura 49: Bases (veículos) utilizados para obter formulações fotoprotetoras.



Emulsão Lanette® (L0); emulsão Polawax® (P0); gel Carbopol® (G0) e gel Aristoflex® (A0)

Fonte: Autoria própria, 2014.

Figura 50: formulações: emulsões L0 e P0 e géis G0 e A0, após o teste de centrifugação.



Emulsão Lanette® (L0); emulsão Polawax® (P0); gel Carbopol® (G0) e gel Aristoflex® (A0).

Fonte: Autoria própria, 2014.

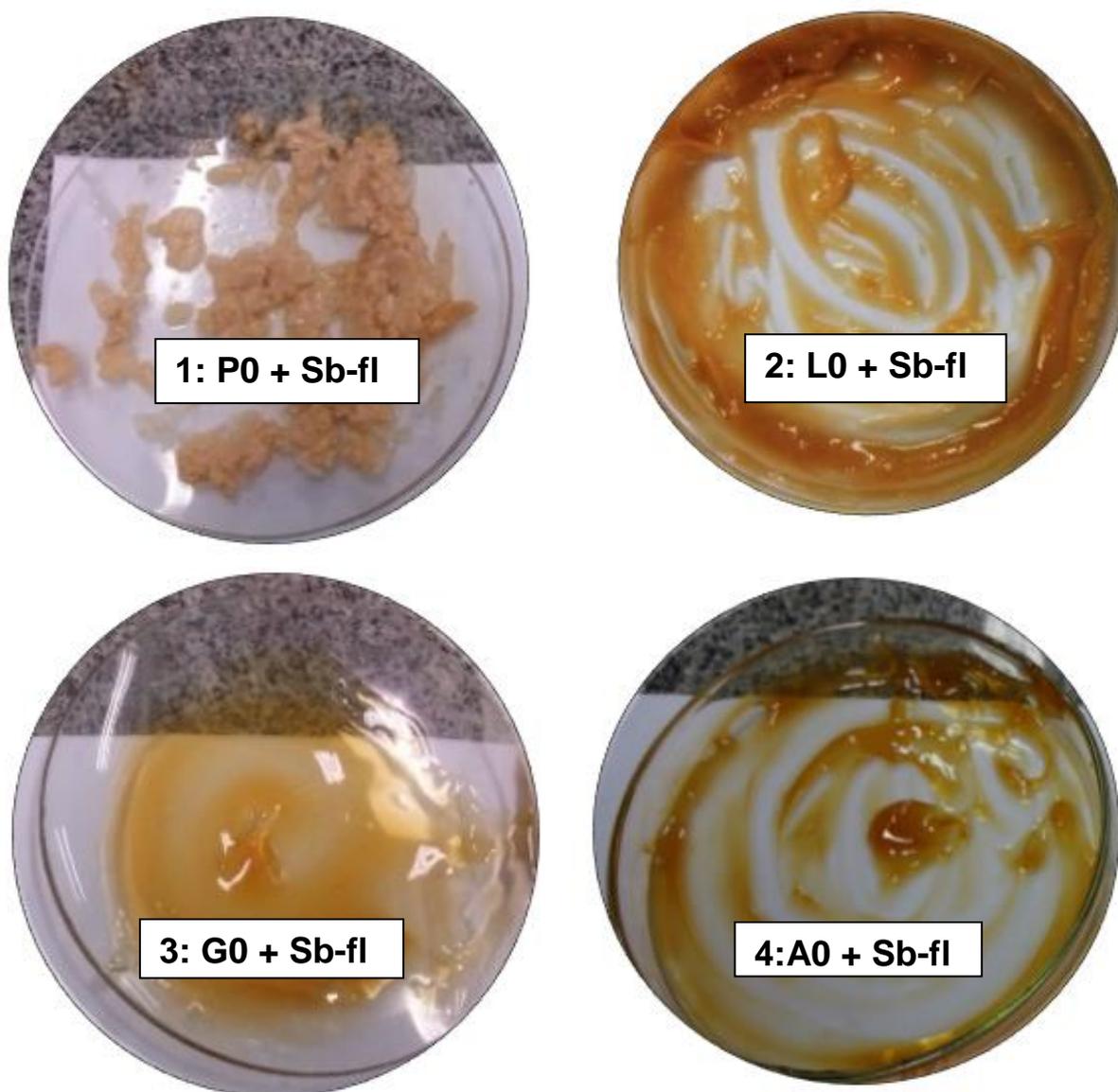
Uma vez que as bases e os extratos estavam desenvolvidos, foi feita a etapa da incorporação da droga vegetal nos veículos.

A etapa do teste de incorporação dos extratos vegetais em bases para fins cosméticos é uma prática bastante difundida, sendo de fundamental importância à escolha adequada da base à qual os princípios ativos de uso tópico serão

incorporados, garantindo, assim, sua estabilidade e absorção e, conseqüentemente, obtenção de seus efeitos farmacodinâmicos esperados.

Na triagem da incorporação do extrato fluido com os veículos, como resultado, o único veículo que não incorporou com nenhum dos extratos foi a loção de Polawax® O/A, como mostra a figura 51.

Figura 51: Incorporação do extrato fluido de *S. brasiliensis* em diversas bases.



1: P0 + Sb-fl: Emulsão Polawax® + Sb-fl 10%; 2: L0 + Sb-fl: Emulsão Lanette® + Sb-fl 10%; 3: G0+ Sb-fl: Gel Carbopol®+ Sb-fl 10% e 4: A0 + Sb-EtOH: Gel Aristoflex® + Sb-fl 10%

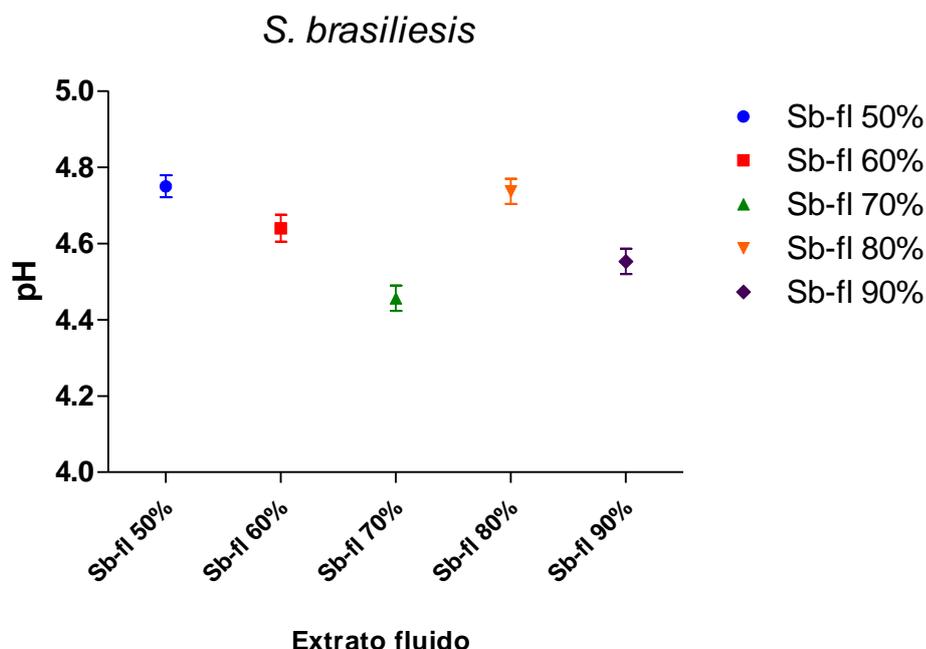
Fonte: Autoria própria, 2014.

A emulsão escolhida para dar seguimento ao estudo foi a emulsão Lanette® (L0), já que P0 foi incompatível com Sb-fl. Com relação ao gel, foi escolhido o de Carbopol® (G0), uma vez que é mais disponível e mais usado na rotina laboratorial, além de apresentar um valor mais baixo para a fabricação, o que evidencia um melhor custo benefício.

5.2.2 Análises dos extratos fluidos de *S. brasiliensis*

Os extratos hidroalcoólicos se mostraram com excelentes características macroscópicas, pH é ácido, o menor pH foi obtido do Sb-fl 70% $4,45 \pm 0,03$ e o maior pH foi do Sb-fl 50%: $4,75 \pm 0,02$, conforme figura 52. Os extratos fluidos apresentaram boa solubilidade nas bases testadas. Esta última característica, de extrema importância, pois representa facilidade de incorporação em diversos meios, não indo de encontro a dificuldade inicial relatada com o extrato bruto de *S. brasiliensis* (Sb-EtOH).

Figura 52: Potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos fluidos de *S. brasiliensis*



Valores são expressos como média \pm SD (n=3). Fonte: Autoria própria, 2014.

Figura 53: Extratos fluidos de *S. brasiliensis*.



Fonte: Autoria própria, 2014.

O espectro de absorção UV de componentes ácidos e básicos pode ser afetado pelo pH.

5.2.3 FPS, Teores de fenóis totais e atividade antioxidante

Os resultados das análises espectrofotométricas (FPS, teor de fenóis totais, atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e do β -caroteno) feitas com os extratos fluidos de *S. brasiliensis* estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e β -caroteno.

| Amostras | Dosagens | | Atividade Antioxidante | |
|-----------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | FPS | TP (mg EAG /g) | DPPH (CE ₅₀) | β -caroteno (% AA) |
| Sb-fl 50% | 7,27 \pm 0,11 ^a | 939,60 \pm 6,87 ^a | 7,81 \pm 0,67 ^{a,d} | 59,05 \pm 2,92 ^a |
| Sb-fl 60% | 6,69 \pm 0,06 ^b | 676,60 \pm 16,14 ^c | 6,19 \pm 0,43 ^{a,b} | 67,31 \pm 6,65 ^{a,b} |
| Sb-fl 70% | 7,70 \pm 0,08 ^a | 869,25 \pm 10,76 ^b | 5,33 \pm 0,26 ^b | 63,20 \pm 2,96 ^a |
| Sb-fl 80% | 3,29 \pm 0,12 ^c | 969,25 \pm 14,55 ^a | 10,73 \pm 0,92 ^c | 79,07 \pm 4,37 ^b |
| Sb-fl 90% | 5,49 \pm 0,16 ^d | 861,85 \pm 9,26 ^b | 8,15 \pm 0,39 ^d | 63,87 \pm 3,52 ^a |

Fonte: Autoria própria, 2014.

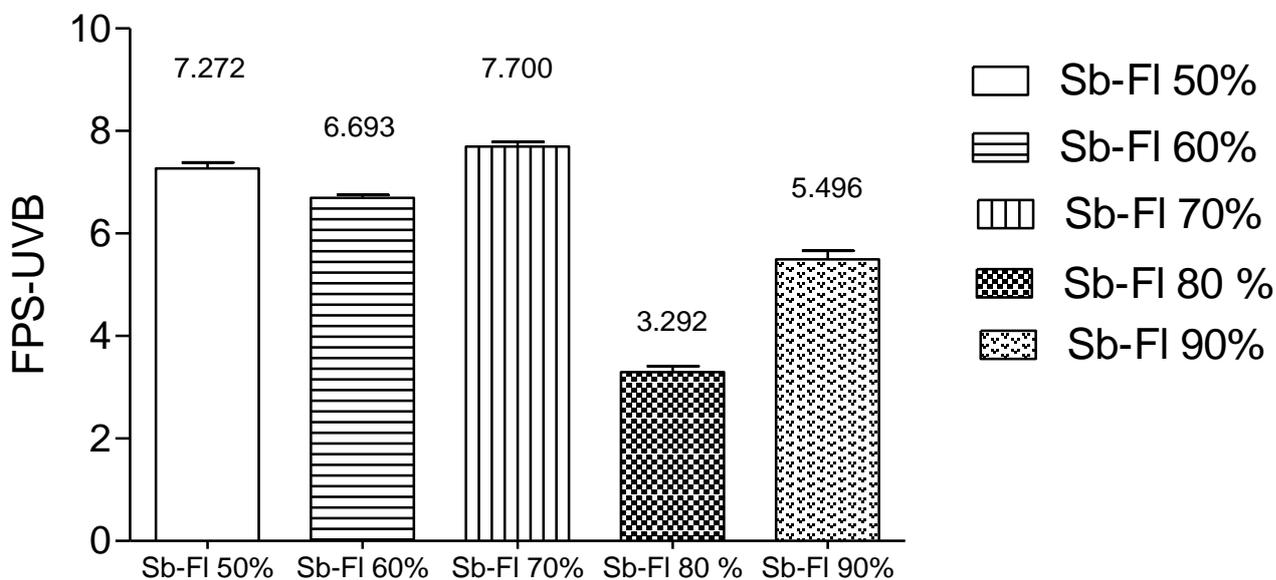
Fator de Proteção Solar (FPS); Fenóis totais (TP), e atividade antioxidante dos extratos fluidos de *S. brasiliensis*. EAG: equivalente de ácido gálico. Os valores de CE₅₀ foram obtidos por regressão linear com 95% de intervalo de confiança. CE₅₀ é definido como a concentração suficiente para obter 50% do efeito máximo estimado em 100%. Valores são expressos como média ± SD (n=3). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), p < 0.05.

Com relação aos conteúdos de compostos fenólicos totais nos extratos fluidos Sb-fl 50%; Sb-fl 70%; Sb-fl 80% e Sb-fl 90%, não apresentaram diferenças significativas.

Apenas Sb-fl 60% apresentou valores significativamente diferente dos demais com teor de TP de 676,6 ± 16,14 (mg EAG/g).

Para o método do sequestro do radical livre DPPH, a amostra que exibiu o menor valor de CE₅₀ foi Sb-fl 70%: 5,33 ± 0,26 e, também, apresentou o maior Fator de Proteção Solar de 7,70 ± 0,08, conforme figura 54. Para o β-caroteno a mostra que apresentou melhor valor foi o Sb-fl 80% que apresentou 79,07 ± 4,37%.

Figura 54: Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de extrato fluido de *S. brasiliensis*.



Valores são expressos como média ± SD (n=3).

Fonte: Autoria própria, 2014.

A partir das análises da correlação de Pearson, foram verificadas que as dosagens de fenóis totais não apresentam correlação com nenhuma das atividades realizadas, tal resultado, mostra uma discrepância com relatos encontrados na literatura, como Vieira et al. (2011) que mostrou relação direta entre o conteúdo de fenólicos totais e a capacidade antioxidante, substâncias fenólicas também vêm sendo descritas associadas na proteção contra radiação UV (SALGADO et al., 2007), diferente do que foi encontrado na correlação.

Há outros compostos responsáveis por apresentarem atividade antioxidante, tais como, os carotenoides, que apresentam sistemas conjugados e rico em elétrons do polieno são responsáveis pela atividade antioxidante dos carotenoides, tanto na absorção do oxigênio singlet, quanto de radicais livres. A presença dessas ligações também facilita a oxidação dos carotenoides. É por serem facilmente oxidados, que apresentam atividade antioxidante. Estudos também sugerem que os carotenoides protegem a pele dos danos causados por radiação UV (MARINOVA; RIBAVORA, 2007).

5.2.4 Formulações fotoprotetoras e estudo de estabilidade preliminar

Duas formulações bases foram utilizadas para dar continuidade ao estudo: Emulsão L0- (Lanette[®]) e o gel G0-(Carbopol[®]). De acordo com os resultados das análises realizadas com os extratos fluidos, o extrato fluido Sb-fl 70% foi o escolhido para dar continuidade ao processo de fabricação das formulações fotoprotetoras.

Para cada tipo de bases foram propostos quatro tipos diferentes de amostras, sendo para o Gel de Carbopol[®]:

G01 (Gel de Carbopol[®] + Filtro químico UVAB 10%);

G02 (Gel de Carbopol[®] + Sb-fluido 10%);

G03 (Gel de Carbopol[®] + Sb-fluido 5% + Filtro químico UVAB 5%);

G04 (Gel de Carbopol[®] + Sb-fluido 10% + Filtro químico UVAB 10%).

Para emulsão Lanette[®]:

L01 (Emulsão Lanette[®] + Filtro químico UVAB 10%);

L02 (Emulsão Lanette[®] + Sb-fluido 10%);

L03 (Emulsão Lanette[®] + Sb-fluido 5% + Filtro químico UVAB 5%);

L04 (Emulsão Lanette[®] + Sb-fluido 10% + Filtro químico UVAB 10%),

Após incorporação foram obtidas 08 formulações, conforme figura 55.

Figura 55: Amostras das formulações de gel Carbopol® e emulsão Lanette®.



Fonte: Autoria própria, 2013.

Foram propostas oito diferentes formulações contendo filtros solares e extratos conforme descrito anteriormente. No início do teste de estabilidade no primeiro dia ($t=1$), após 24 horas do preparo e, no final no 15º dia ($t=15$) com as amostras (G01, G02, G03, G04 e L01, L02, L03, L04). Antes dos testes este intervalo é necessário já que as formulações não adquirem o equilíbrio perfeito imediatamente após o preparo, e esse tempo de espera é necessário para que haja a estabilização, sendo usualmente preconizado 24-48 horas após o preparo (MORAIS, 2007). Os parâmetros analisados foram: aspecto, cor, odor, pH, FPS, viscosidade, espalhabilidade e teste de resistência à centrifugação.

As bases Lanettes® e os géis de Carbopol® em $t=1$ apresentaram aspectos de homogeneidade, brilho, odor e coloração de acordo com as qualidades desejáveis e pré-estabelecidas para os produtos.

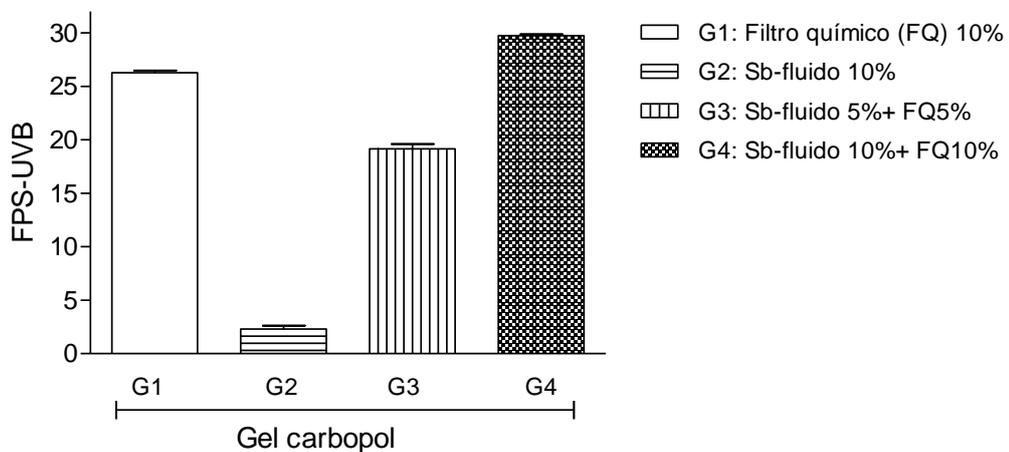
Com relação ao pH das formulações, para as amostras do gel, apenas a amostra G02, $pH=4,8$ ficou abaixo das especificações desejadas para o pH. Para as amostras de Lanette®, L01 apresentou $pH=6,7$, ou seja, acima do pH ideal. Entretanto esse parâmetro pode ser facilmente ajustado com o uso de um corretor de pH. As outras amostras apresentaram pH desejável para produtos tópicos, uma vez que devem estar entre 5,5 e 6,5, de acordo com a farmacopeia.

O pH de uma formulação é um parâmetro bastante importante, uma vez que, pode modificar as características físico-químicas da formulação, influenciando,

inclusive, na solubilidade e na estabilidade do produto. Valores baixos de pH podem estar relacionados ao aparecimento de irritação dérmica (LEONARDI, 2002).

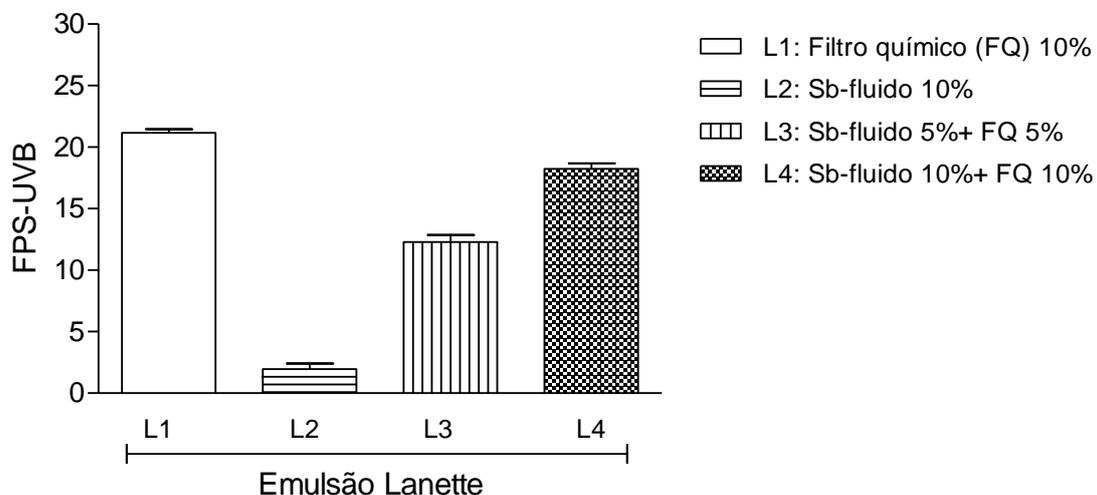
O FPS de todas as amostras foi determinado segundo metodologia descrita por Mansur et al. (1986). Com relação ao FPS para as amostras da formulação Lanette® L01 apresentou o valor de 21,49, L02: 1,94, L03: 12,29 e L04: 18,53. Já para as formulações do gel, o FPS de G01 foi de 26,28, para G02 foi de 2,30 para o G03 de 19,13 e para o G04 de 30,0, figuras 56 e 57.

Figura 56: Gráfico do FPS das formulações de gel Carbopol®, antes da estabilidade.



Fonte: Autoria própria, 2014.

Figura 57: Gráfico do FPS das formulações de emulsão Lanette®, antes da



estabilidade.

Fonte: Autoria própria, 2014.

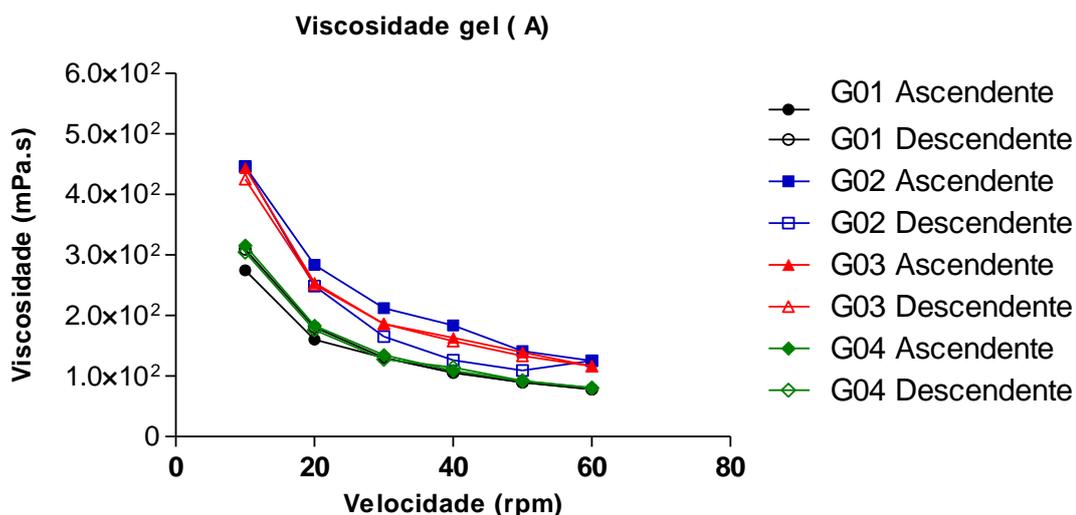
Esses resultados mostraram que as formulações contendo o Sb-fl e o filtro químico proporcionaram um aumento dos valores de FPS de forma significativa.

Entretanto, a formulação contendo apenas o extrato apresentou valores de FPS menores do que 6,0 que é o valor mínimo preconizados pela ANVISA (BRASIL, 2012). Vale ressaltar que houve divergência dos valores encontrados para o FPS de Sb-EtOH com os encontrados nos lotes das formulações. Tal fato pode ser justificado pelos valores ácidos de pH encontrados nas amostras (G02 e L02), pois o pH ácido pode modificar a deslocalização dos elétrons na molécula dos filtros solares e o produto passa a absorver radiação solar num comprimento de onda fora do desejado, o que prejudica a sua eficácia (RIBEIRO; OHARA, 2003; RIBEIRO, 2006).

A tendência para o desenvolvimento de fotoprotetores atual é a redução na quantidade de filtros químicos, devido a eventos adversos ocasionados pelo uso tópico de substâncias nas formulações, o que compromete a eficácia fotoprotetora (VELASCO et al., 2008). O fato de atuar sinergicamente com os filtros químicos amplamente empregados, é uma alternativa para aumentar a segurança e a eficiência dos fotoprotetores.

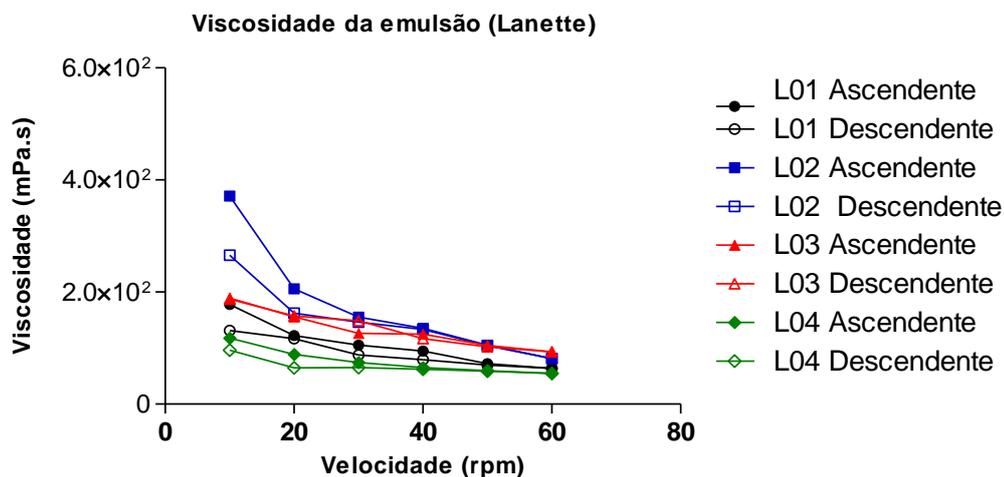
A determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo, sendo assim, a viscosidade é uma propriedade relacionada com a resistência ao fluxo. Dessa forma, quanto maior a viscosidade, maior a resistência do fluido ao fluxo. Os resultados da viscosidade (t=1) podem ser visualizados na figura 58 e 59.

Figura 58: Viscosidade das amostras do gel de Carbopol®.



Fonte: Autoria própria, 2014.

Figura 59: Viscosidade das amostras da emulsão Lanette®.



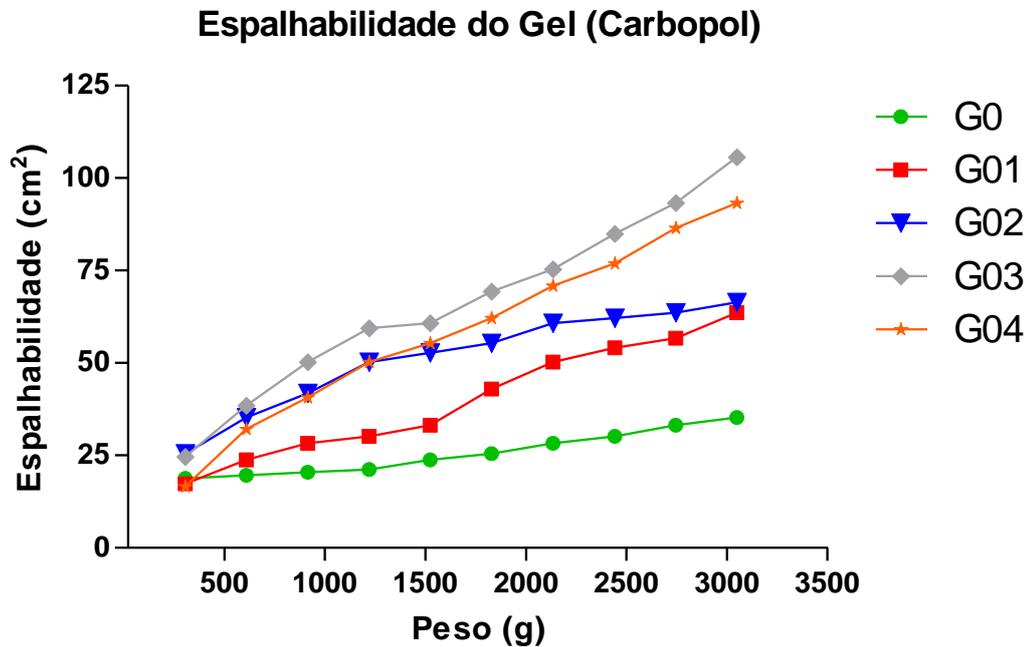
Fonte: Autoria própria, 2014.

Normalmente, a maioria dos produtos cosméticos, apresentam fluxo não newtoniano, que podem ser do tipo: plástico, pseudoplástico e dilatante (LEONARDI, 1997).

Para as formulações dermocosméticas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente (independentemente do tempo), à medida que aumenta a velocidade de cisalhamento (MARTIN, 1993). Sendo assim, todas as formulações foram consideradas pseudoplásticas.

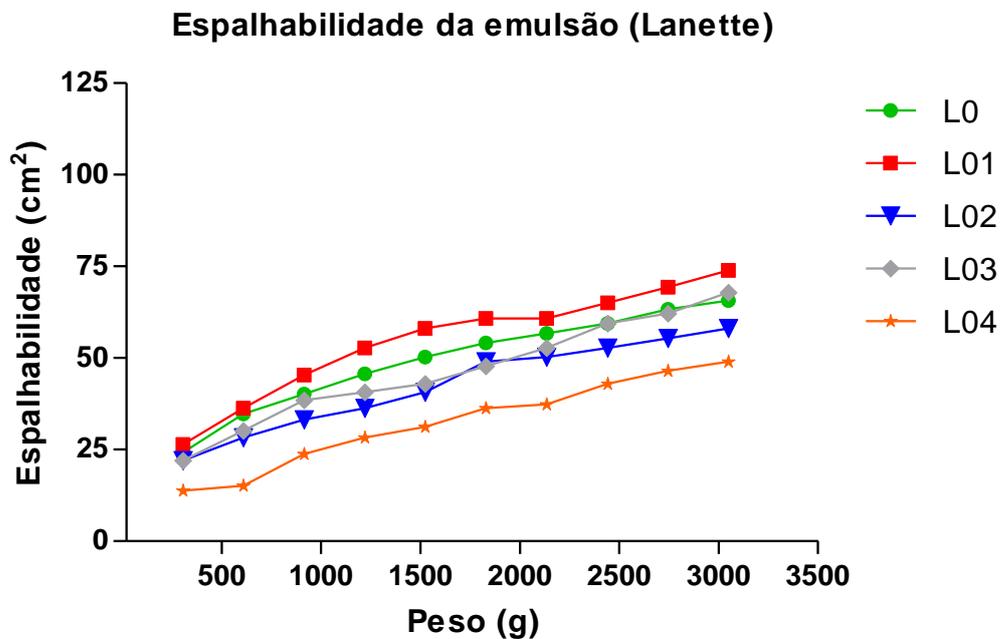
Com relação a espalhabilidade, os valores obtidos mostraram que houve aumento deste parâmetro à medida em que ocorreu o aumento do peso (Figura 60 e 61). Este dado mostra que as amostras apresentaram comportamento esperado. Os dados referentes à espalhabilidade são importantes, pois se a formulação produzida apresentar características reológicas adequadas, a aplicação do produto será mais agradável no momento de sua aplicação sobre a pele e em menor quantidade, proporcionando a formação do filme protetor.

Figura 60: Espalhabilidade das amostras do gel de Carbopol®.



Fonte: Autoria própria, 2014.

Figura 61: Espalhabilidade das amostras de emulsão Lanette®.



Fonte: Autoria própria, 2014.

Os resultados iniciais (t=1) para teste de resistência à centrifugação não demonstraram alterações do tipo separação de fases, coalescência ou formação de

precipitados em todas as amostras. Este teste produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, fazendo com que haja uma maior mobilidade das partículas e antecipa possíveis instabilidades que poderão ser observadas (BRASIL, 2004). Dentre as características físicas a não separação das fases é fundamental, pois se isto ocorrer todas as demais especificações de uma emulsão serão afetadas (SANCTIS, 1999).

Decorridos 15 dias de intenso estresse das formulações, devido ao ciclo gelo-degelo, não houve alteração na viscosidade, nem na espalhabilidade, entretanto, algumas das amostras da emulsão Lanette® apresentaram modificações de outros parâmetros analisados.

Houve alteração na coloração, escurecimento na cor, além de separação de fases após realizar o teste da centrifúga para as amostras L02, L03 e L04. Um dos fatores que pode ocasionar a instabilidade de uma formulação é a reação de oxidação e variações da temperatura. Na figura 62 pode ser observado em (A): a coloração inicial das formulações latente, em (B) o escurecimento da coloração das amostras.

Figura 62: Alterações na coloração das formulações Lanettes®

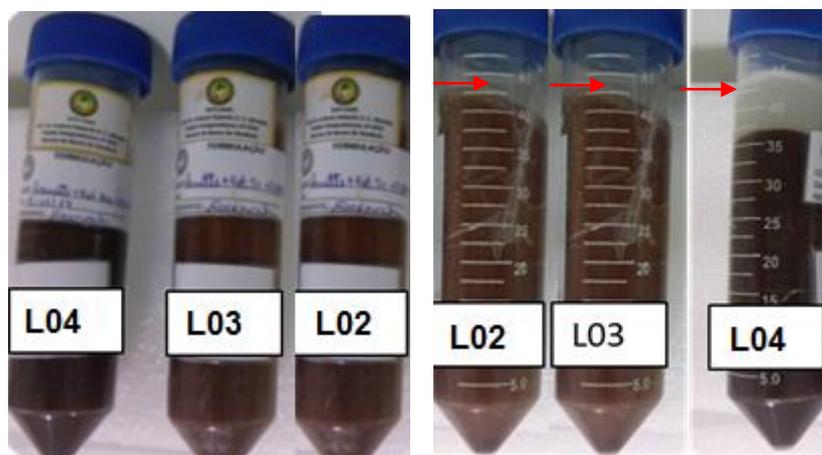


Fonte: Autoria própria, 2014.

(A): antes da estabilidade; (B) após a estabilidade.

Na figura 63 pode ser visualizada a separação de fases das amostras L02, L03 e L04.

Figura 63: Separação de fases das formulações Lanettes®.



Fonte: Autoria própria, 2014.

Dessa maneira, as amostras das bases Lanettes® foram reprovadas.

Para as amostras dos géis foram mantidas as mesmas características antes, durante todo o ciclo e após os 15 dias, sendo, portanto, um indicativo de estabilidade do produto.

Na tabela 15 estão apresentados os resultados do estudo de estabilidade preliminar com as formulações obtidas.

Tabela 15: Características iniciais das oito amostras desenvolvidas, antes e após o a avaliação da estabilidade.

| Parâmetros | Amostras do Gel Carbopol® | | | | | | | | Amostra emulsão Lanette® | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|--------------------------|----|------|----|------|----|------|----|
| | G01 | | G02 | | G03 | | G04 | | L01 | | L02 | | L03 | | L04 | |
| | 1° | 15° | 01 | 15 | 01 | 15 | 01 | 15 | 01 | 15 | 01 | 15 | 01 | 15 | 01 | 15 |
| Aspecto | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| Cor | T | T | MA | MA | MA | MA | ME | ME | T | T | MA | MA | MA | ME | MA | ME |
| Odor | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG | SG |
| Centrifugação | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | SF | N | SF | N | SF |
| Ph | 5,66 | 6,04 | 4,77 | 5,98 | 5,51 | 6,40 | 6,58 | 6,70 | 6,73 | - | 5,41 | - | 6,06 | - | 6,27 | - |

Fonte: Autoria própria, 2014.

T= cor transparente; A=cor amarelo; MA= cor marrom avermelhado; ME= cor marrom escuro; SG= indica odor Sui generis, característico; N= indica normal, sem alterações. SF= separação de fases. G01 (Gel de Carbopol® + Filtro químico UVAB 10%); G02 (Gel de Carbopol® + Sb-fluido 10%); G03 (Gel de Carbopol® + Sb-fluido 5% + Filtro químico UVAB 5%); G04 (Gel de Carbopol® + Sb-fluido 10% + Filtro químico UVAB 10%). L01 (Emulsão Lanette® + Filtro químico UVAB 10%); L02 (Emulsão Lanette® + Sb-fluido 10%); L03 (Emulsão Lanette® + Sb-fluido 5% + Filtro químico UVAB 5%); L04 (Emulsão Lanette® + Sb-fluido 10% + Filtro químico UVAB 10%), todas realizadas em triplicata.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou dados inéditos que engrandecem os estudos das espécies de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis*.

A avaliação farmacognóstica de Dv-Sb e Dv-Pp demonstraram que as drogas vegetais estão de acordo com as especificações farmacopeicas. A partir das análises realizadas com os extratos de *S. brasiliensis* e *P. pyramidalis* conclui-se que o Sb-EtOH apresentou os melhores resultados para as dosagens de fenóis totais, flavonoides, bem como, apresentou melhor atividade antioxidante pelo método do DPPH, assim como para a ação fotoprotetora.

Foram identificados por CLAE-DAD quatro compostos fenólicos, em Sb-EtOH: catequina, epicatequina, ácido gálico e apigenina, e para Pp-EtOH: ácido gálico, epigallocatequina, rutina e escopoletina, que podem justificar as ações encontradas.

Os extratos Sb-EtOH e Pp-EtOH foram considerados de baixa toxicidade, embora novos estudos sejam necessários para uma avaliação mais profunda do perfil toxicológico.

Assim, de acordo com a análise comparativa entre Sb-EtOH e Pp-EtOH, a espécie de *S. brasiliensis* foi a selecionada para o desenvolvimento das formulações. Entretanto, Sb-EtOH apresentou dificuldade de incorporação nos veículos e foram obtidos extratos fluidos hidroalcoólicos de Sb-FI 50, 60, 70, 80 e 90% para facilitar o processo de incorporação. De acordo com as análises realizadas com Sb-fl 70% apresentou o maior Fator de Proteção Solar, bem como melhor atividade antioxidante no método do DPPH, motivo pelo qual fez com que tal concentração fosse escolhida para a produção do fotoprotetor.

Quatro formulações bases foram obtidas L0, P0, G0 e A0 e todas passaram por testes de controles de qualidades, entretanto no teste de incorporação P0 não foi compatível e foi retirada do processo. A0 também excluída devido ao custo-benefício comparada a G0. Sendo assim, L0 e G0 foram as bases escolhidas. Para cada tipo de bases foram propostos quatro tipos diferentes de amostras Gel: G01, G02, G03 e G04; Emulsão: L01, L02, L03 e L04.

As amostras seguiram para os testes de estabilidade preliminar e, decorridos 15 dias, não houve alterações nos parâmetros da viscosidade e espalhabilidade para todas as amostras, mas, L02, L03 e L04 apresentaram mudanças de coloração e separação de fases.

Assim, as amostras de Gel foram as estáveis e G04 foi a melhor formulação uma vez que potencializou a ação do FPS.

O desenvolvimento de um cosmético com efeito fotoprotetor com a espécie de *S. brasiliensis* nativa da caatinga é algo inédito, não havendo qualquer registro na literatura. Portanto, em decorrência dos resultados obtidos maximiza a sua relevância, estimulando uma melhor preservação da espécie envolvida e analisada no estudo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLEN, L.V; POPOVICH, N.G; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Artmed, Porto Alegre, 2013.

ALVIANO, W.S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, n.53, p. 545-552, 2008.

AMORIM, E. L. C. et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n.1, p. 88-94, 2008.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, 2007.

BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6b, p.1402-1405, 2005.

BAHIA, M. V; JUCENI, D. P.; DAVID, J. M.; Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1297-1300, 2010.

BARREIROS, S. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. D. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics & Toiletries**, v. 7, p. 44-50, 1994.

BUENO, J. H. F. et al. Óleo das sementes de tangerina ponkan – *Citrus reticulata* Blanco. Possibilidades do emprego na estruturação de cremes A/O (cold cream). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, 1984; 6:29-37.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3.ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. 540p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Portaria nº 37-N/1992, de 3 de abril de 1992. IBAMA (Ministério do Meio Ambiente). **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 de abril 1992. Seção 3, p.204.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 4 ed. São Paulo: Atheneu. v. 1, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 2004, p. 52. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 211, de 14 de julho de 2005**. Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

BRASIL. **Plano de Divulgação do Bioma Caatinga**, Ministério do Meio Ambiente, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 30, de 1º de junho de 2012**. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 47, de 16 de março de 2006**.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**, Zaragoza, Acribia, 1991.

CARVALHO, P. E. Braúna-do-Sertão *Schinopsis brasiliensis*. **Embrapa Informação Tecnológica**, Colombo, p.1-9, 2009.

CAVALHEIRO, M. G. et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 586-591, 2009.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v.643, n.3, p. 232-238, 2010.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural Product Research**. v. 19, n. 5, p. 431–433, 2006.

CHEN, Y. et al. In vitro and *in vivo* antioxidant effects of the ethanolic extract of *Swertia chirayita*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 309-315, 2011.

CORDULA, E.; MORIM, M. P.; ALVES M. Morfologia de frutos e sementes de Fabaceae ocorrentes em uma área prioritária para a conservação da Caatinga em Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia** [online], Rio de Janeiro, v.65, n.2, p. 505-516, 2014.

COUTO, R. O. et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p.59 – 69, 2009.

CUNHA, A. R.; SILVA R. S.; CHORILLI, M. Development and evaluation of physical stability of antidandruff shampoo formulations containing or not aqueous extracts of hyper, fennel and ginger. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 190-195, 2009.

DANTAS, B. F. et al. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista brasileira de sementes**, v. 30, n.2, p. 214-219, 2008.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**: Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 125. São Paulo, 1995.

DRESSLER, A. C. **Propriedade reológicas compósitos sol-gel de quitosana/ glicerol/ nanoelementos**. 2008, 58f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ENGLER, A. Anacardiaceae. **Flora brasilienses**, v.12, n.2, p.367-418, 1879.

FLORA DO BRASIL. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB109818>>. Acesso em: 19 Out. 2017.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavones and flavonols: new insights into their chemical structure and biological function. **Revista Agroambiente**, v. 2, n. 2, p. 57-60, 2008.

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

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. **Química Nova**, v. 30, p. 153-8, 2007.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, v.73, p.627-650, 1927.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICCOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GRUNDHÖFERA, P. et al. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry** v. 57, p. 915-927, 2001.

GUNIITA. UVB and UVA radiation penetrate into skin. Detailed skin. **Dreamstime**. Disponível em: <<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-uvb-uva-radiation-penetrate-skin-detailed-skin-anatomy-image49785994#tab2>> Acesso em: 15 Nov. 2017.

HORN, M. M. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico**. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

HVASF. **Herbário Vale do São Francisco**. Disponível em: <http://www.univasf.edu.br/~hvasf/> Acesso em: 10 Junh. 2017.

ISAAC, V. L. B.; UCHIYAMA, C. L. Influência da combinação de tensoativos associada a agentes espessantes na viscosidade de xampus. In: Jornada Farmacêutica da UNESP, 45., 1998, Araraquara, SP. Araraquara, 1998. p.11.

KING, H. G. C.; WHITE, T. Polyphenols and tannins of *Schinopsis* (quebracho) spp. **Proceedings of the Chemical Society**. v. dez., p.341-342, 1957b.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging in oxidative stress-new approaches for their evaluation. **Biomed pharmacotherapy**, v. 53, p. 181-192, 1999.

LEONARDI, G.R. **Influência do ácido glicólico na penetração cutânea da vitamina A palmitato e na estabilidade física de formulações dermocosméticas**. 1997. 114p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LEONARDI, G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v.5. p. 77, 2002.

LIEN, E. J. et al. Quantitative structure- activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 285-94, 1999.

LOPES, T. R. F.; NETTO JUNIOR, N. L. Análise da qualidade farmacognóstica de amostras comerciais de *Paullinia cupana* (guaraná) do Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, n. 4, p.1-12, maio 2011. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-2-4.pdf>>. Acesso em: 07 setembro 2017.

MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. D&Z Computação Gráfica e Editora, São Paulo. p.159-169, 2004.

MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, p. 121-124, 1986.

MARKHAN, K. R et al. An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UVB enhancement. **Phytochemistry**, v. 48, p. 791-94, 1998.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 5, p. 370-374, 2007.

MARQUES, G. S. et al. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p.57-62, 2012

MARTIN, A. **Physical pharmacy**. 4^a.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MATHEUS, L. G.; KUREBAYASHI, A. K. Fotoproteção: A radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos. In: Fotoproteção: **A radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos**. São Paulo: AVC, 2002.

MENDES, C.C. et al. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, v. 71, p.205-207, 2000.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões com cristais líquidos acrescido de xantina para tratamento da lipodistrofia ginóide (celulite)**. p. 153, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOREIRA, B.O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)- Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

OLIVEIRA, M. C. P.; OLIVEIRA, G. J. Superação da dormência de sementes de *Schinopsis brasiliensis*. **II Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.1, p.251-254, 2008.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semiárido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. **Revista Árvore**, v. 28 n. 2. p. 275-282, 2004.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 683-689, 2008.

PELL, S. K. **Molecular systematics of the cashew family (anacardiaceae)**. Dissertation in Doctor of Philosophy Biological Sciences, Faculty of the Louisiana State University, 2004.

PRADO, M. C.G do et al. Aspectos morfo-estruturais da unidade de dispersão de *Schinopsis brasiliensis* Engl. “Baraúna” (Anacardiaceae). **Boletim da Sociedade Broteriana**, v.67, p.187-197, 1996.

PURIM, K. S. M.; LEITE, N. Fotoproteção e Exercício Físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 16, n. 3, p. 224–229, 2010.

QUEIROZ, L. P.; **Leguminosas da Caatinga**, 1ª ed.; Editora Universitária da UEFS: Feira de Santana, 2009.

REIS-MANSUR, M. C. P. P. **Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar.** Dissertação. Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.

RIBEIRO, C.; OHARA, M. T. Entendendo Fotoproteção e Fotoprotetores. **Revista Racine.** São Paulo, v. 13, n. 75, p. 34-46, jul./ago., 2003.

RIBEIRO, C. Fotoproteção e fotoprotetores. **Cosmetologia aplicada à Dermoestética.** São Paulo: Pharmabooks, cap. 6, p. 77-115, 2006.

RICE-EVANS, C. et al. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine.** v.20, p.933-956, 1996.

ROUX, D. G. EVELYN, S. R. Condensed tannins IV: The distribution and deposition of tannins in the heartwoods of *Acacia mollissima* and *Schinopsis* species. **Biochemical Journal.** v. 76, n.1, p.17-23, 1960.

ROUX, D. G.; PAULUS, E. Condensed tannins. VIII. The isolation and distribution of interrelated heartwood components of *Schinopsis* species. **Biochemical Journal.** v. 78, n.4, p.785-789, 1961.

SA, P. G. S. et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 33, p. 561-566, 2012.

SALGADO, L.T. et al. The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption *in vitro*. **Brazilian Journal of Oceanography,** n. 55, v. 2, p.145-154, 2007.

SANCTIS, D. S. Emulsões para uso externo. **Revista Racine,** São Paulo, n. 53, p. 53 – 62, nov./dez. 1999.

SANTOS, C.A et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.21, n.6, p. 1077-1083, 2011.

SARAIVA, A. et al. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, p. 99-207, 2013.

SAYRE, R. M. et al. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 559-566, 1979.

SCHALKA, S. et al. Consenso Brasileiro de Fotoproteção. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.89, p.1-76, 2014.

SCHALKA, S.; REIS, V. M.S. Fator de proteção solar: significado e controvérsia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, p. 507-515, 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; ATHAYDE,M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap. 27, p.597-619, 2001.

SCOTTI, L.; VELASCO, M. R. **Envelhecimento cutâneo à Luz da cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. 1 ed Colômbia: CAB e CYTED, 2000.

SHAAT, N. A. The chemistry of ultraviolet filters. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p.464-469, 2010.

SILVA, C. H. T. P. S. et al. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium Glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**. v.16, p. 4728-4739, 2011.

SIMÕES, C. M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Universidade de Porto Alegre, 2007.

SLINEY, D. H. International Commission Illumination. Radiometric Quantities and Units Used in Photobiology and Photochemistry (International Commission on Illumination), **Photochem Photobiology**, v. 83, p. 425- 432, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SONAGLIO D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 289-326, 2003.

SOONG, Y.; BARLOW, J. Quantifion of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 97, p. 524-530, 2006.

SOUZA, O.N. **Chemical constituents of the leaves of *Schinopsis brasiliensis*** Engl. 1990. 207f. Tese (Doctor of Philosophy) – Politechnic of North, London.

SOUZA-MOREIRA, T.; SALGADO, H.; PIETRO, R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435-40, 2010.

SUASSUNA, J. **SEMI-ÁRIDO: proposta de convivência com a seca**. Fundação Joaquim Nabuco, 2002. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br>, acesso em 10 de dezembro de 2012.

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

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELASCO, M.V.R. et al. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação *In vitro* da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy** v. 27, n.1, p. 23-27, 2008.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.3, p. 888-897, 2011.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 452-457, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlim Heidelberg: Springer Verlag, 1996.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1362- 1370, 2010.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 64-71, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Aprovação do comitê de ética



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento e avaliação das atividades fotoprotetora, antioxidante e conservante de uma emulsão cosmética contendo extratos de plantas nativas da caatinga", Protocolo nº 0002/180714, que utilizam 180 animais da espécie *Mus musculus*, sob a responsabilidade de Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled "Development and evaluation of photoprotective activity, antioxidant and preservative in cosmetic emulsion containing extracts of plants native to caatinga", protocol number 0002/180714, utilizing 180 animals species *Mus musculus*, under the responsibility Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 27 de agosto de 2014.

Prof. Márcia Bento Moreira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF

Prof. Alexandre H. Reis
Coordenador do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF

APÊNDICE II

Artigo publicado - The Scientific World Journal, Impact Factor 1.219.

Hindawi
e Scientific World Journal
Volume 2017, Article ID 1713921, 10 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/1713921>



Research Article

Chemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Photoprotective Activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)

Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva,^{1,2} Fernanda Granja da Silva Oliveira,¹

Raimundo Gonçalves de Oliveira Junior,¹ Camila de Souza Araújo,¹

Ana Paula de Oliveira,¹ Alessandra Gomes Marques Pacheco,¹

Larissa Araújo Rolim,¹ Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim,²

Francine Celise Siqueira César,³ and Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida¹

¹Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of Vale do São Francisco, 56304-205 Petrolina, PE, Brazil; ²Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil; ³University of São Paulo, 14040-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida; jackson.guedes@univasf.edu.br

Received 13 April 2017; Revised 16 August 2017; Accepted 5 September 2017; Published 15 October 2017

Copyright © 2017 Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Schinopsis brasiliensis Engl. is a native plant of Caatinga which has high concentrations of compounds capable of absorbing ultraviolet light, suggesting its potential application for the development of sunscreen preparations. After its identification and collection, this vegetable drug was submitted to a physicochemical analysis through the preparation of ethanolic extract. The phytochemical screening and analysis of extracts were carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) evaluation. The antioxidant activity of the extract was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and β -carotene bleaching test. Inhibitory hemolytic activity and morphological deformation of erythrocytes induced by H₂O₂ were also demonstrated and the antimicrobial activity was analyzed by the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) method. For the *in vitro* determination of the sun protection factor (SPF), the spectrophotometric method was used. From the analyses carried out with this species, this plant showed significant results for the antioxidant and antimicrobial activities, as well as sunscreen action. Important flavonoids were identified. These data are an important step for the development of new photoprotective cosmetic with Caatinga species, revealing importance and representing another incentive for the preservation of the species involved and analyzed in the study.

APÊNDICE III

Declaração da Diretoria de Inovação: Patente depositada.



Universidade Federal de Pernambuco
Diretoria de Inovação - Gabinete do Reitor

Recife, 27 de outubro de 2017

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que Sarah Raquel Gomes de Lima Saraiva, portadora do RG 6.381.940 SDS/PE e do CPF 049.395.624-76, brasileira, casada, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, protocolou, em 23/05/2017, nesta Diretoria, o pedido de depósito do trabalho intitulado "Preparação farmacêutica contendo extrato de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae)", o qual recebeu a numeração provisória "COA 190" (Controle de Ordem de Atendimento, nº 190). Declaro, ainda, ciência de que este trabalho será apresentado como tese de doutorado em 27/11/2017, motivo pelo qual esta Diretoria diligenciará providências no sentido de ter a numeração definitiva da pesquisa supracitada antes da referida data. Em tempo, declaro que este pedido de patente apresenta, como co-inventores, Elba Lúcia Cavalcante de Amorim, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Fernanda Granja da Silva Oliveira, Juliane Cabral Silva, Larissa Araújo Rolim, Dinalva Brito de Queiroz e Marco Antônio Botelho Soares.

Atenciosamente,



 Siddartha Gautamma
Assistente em Administração
Diretoria de Inovação/GR
SIAPE 1733458

REPARAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO EXTRATO DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS* (ANACARDIACEAE)

Campo da Invenção

01. A presente invenção trata do desenvolvimento de um produto cosmético e/ou farmacêutico com propriedades fotoprotetora e antioxidante, a partir de extratos de cascas e folhas de *Schinopsis brasiliensis*, uma vez que tais extratos são ricos em compostos fenólicos e flavonoides capazes de absorverem a radiação ultravioleta, além de reduzirem os danos causados pela incidência dos raios ultravioleta sobre a pele.

Antecedentes da Invenção

02. Atualmente existem diversos tipos de formulações fotoprotetoras e antioxidantes em forma de cremes ou géis para aplicação na área cosmética e/ou farmacêutica, mas nenhuma fazendo uso da espécie *Schinopsis brasiliensis*.

03. Existem numerosos depósitos de patentes de invenção com finalidade fotoprotetora, tais como a patente WO 1987004923, EP2014277, US20120039828, US 20140322307, WO 2009064480. Dentre essas patentes observa-se alguns fotoprotetores à base de drogas vegetais, como a patente intitulada FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DA ESPÉCIE VEGETAL ARRABIDAEA CHICA PARA FOTOPROTEÇÃO E PIGMENTAÇÃO, cujo registro é PI 0703095-9.

04. No banco Nacional de Patentes do INPI, foram encontradas patentes contendo a família Anacardiaceae, porém, sem uso fotoprotetor, o depósito está relacionado com a profilaxia e/ou tratamento de desordens ao trato digestivo terapêutico (PI 1002720-3) ou se refere a uma composição de tratamento e condições relacionadas à AIDS (PI 0314104-7). Nos bancos internacionais de patentes, foram encontrados registros de patentes utilizando Anacardiaceae, bem

como uso farmacológico, tais como: prevenção e tratamento de dermatite (WO2016160090, US 20140271910); profilaxia e /ou tratamento de desordens associadas ao sistema digestivo (US2013302419).

05. Embora exista patentes com a espécie *Schinopsis brasiliensis* (US20140141108; US20160106796; US20100267823), nenhum documento foi encontrado, até o presente momento, envolvendo fotoprotetores com esta espécie de interesse da presente invenção.

06. Na literatura há trabalhos utilizando folhas e cascas de *Schinopsis brasiliensis*, vários relatam sobre a atividade de antimicrobiana (CHAVES et al., 2011; CHAVES et al., 2013; SARAIVA et al., 2011; SILVA et al., 2012, FORMIGA FILHO, 2015).

07. Vários compostos já foram encontrados em cascas e folhas da referida planta, nos quais, inclui a presença de taninos e polifenóis: como Metil Galato, ácido gálico, ácido elágico, hexahidroxi-flavonol encontrados nas folhas de *Schinopsis brasiliensis* (SARAIVA et al., 2011).

08. Novos Alquilfenóis (methyl 6-eicosanoyl-2-hydroxy-4-methoxybenzoate e steroid $5\alpha,8\alpha$ -epidioxy ergosta-6,22-dien-3 β -ol), ambos isolados das cascas de *Schinopsis brasiliensis* (CARDOSO et al., 2005). Também foram extraídos óleo essencial das folhas de *Schinopsis brasiliensis*, mirceno e outros compostos tais como β -caryophylleno, eucaliptol e guaiol (DONATI et al., 2014).

09. Embora existam artigos científicos com a espécie *Schinopsis brasiliensis* nenhum foi encontrado, até o presente momento, envolvendo fotoprotetores.

010. Dessa forma, a busca na literatura científica e patentária apontou que não existe nenhum trabalho com características semelhantes ao invento proposto.

Fundamentos da Invenção

011. A escolha de novos ativos fotoprotetores envolve, principalmente, a capacidade de absorção da luz ultravioleta pelos cromóforos de cada molécula.

012. De acordo com Flor et al. (2007), geralmente estruturas que contêm anéis aromáticos com substituinte doador de elétrons podem absorver a radiação UV, que ao absorvê-la excitam os elétrons das insaturações, os quais após retornarem para o estado fundamental - tendo em vista se tratar de um processo não permanente - liberam o excesso de energia absorvida em forma de calor.

013. A espécie *Schinopsis brasiliensis*, apresenta elevadas concentrações de compostos fenólicos, tais como os flavonoides, os quais são substâncias capazes de absorverem a luz ultravioleta, e cujo espectro de absorção ocorre com dois picos máximos, um entre 240-280 nm e outro em 300-550 nm.

014. Assim, há a possibilidade do uso dessa espécie vegetal para o desenvolvimento de filtros solares em preparações cosméticas e/ou farmacêutica, já que em sua composição predominam tais compostos (BOBIN et al., 1995).

Breve Descrição da Invenção

015. A presente invenção resultou em inéditas formulações cosméticas e/ou farmacêuticas com propriedades fotoprotetora e antioxidante utilizando extrato de *Schinopsis brasiliensis*.

Descrição Detalhada da Invenção

016. Após coleta do material, as cascas de *Schinopsis brasiliensis* foram secas em estufa com ar circulante a 45 °C e, depois desse processo, foram

pulverizadas em moinho de facas. O material vegetal foi tamisado, a fim de obter a matéria prima padronizada.

017. O material vegetal padronizado foi submetido à maceração exaustiva com solvente polar, com várias extrações em intervalos de 72 horas até completo esgotamento. A solução foi concentrada, e assim, obtido o Extrato Bruto (EB-Sb).

018. Para a determinação quali-quantitativa de metabólitos secundários na amostra foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® LC-20 com detector de arranjo de diodos (DAD), equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0 (Japão).

019. A fase móvel utilizada foi composta de 2 solventes: solvente A – 0,5% de ácido acético em água ultrapura (grau CLAE) e solvente B 100% acetonitrila com fluxo de 1 mL/min, em gradiente, inicialmente, 100% de solvente A e 0% de B, em 40 min 20% de A e 80% de solvente B, e em 50 min 100% de solvente A e 0% de solvente B. A fase estacionária foi uma coluna Super-ODS (Supelco®) mantida a 30 °C. O volume das amostras injetado foi de 20 µL, sendo monitoradas em 270 e 340 nm.

020. A partir da análise do extrato de *Schinopsis brasiliensis* foi possível identificar quatro padrões analíticos, por meio da semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção em ultravioleta, bem como, quantificá-los. Catequina em 4 min [110,82 µg/mL], epicatequina em 3 min [0,42 µg/mL], apigenina em 26 min [3,7 µg/mL] e ácido gálico em 27 min [8,33 µg/mL]. Todos esses

compostos encontrados possuem anéis aromáticos com substituinte doador de elétrons que podem absorver a radiação UV.

021. O composto majoritário encontrado, a (+)-catequina é um flavonoide pertencente ao grupo dos flavanóis que possuem um grupo hidroxila na posição 3. As propriedades das catequinas têm sido amplamente citadas na literatura e apresentam potente atividade sequestradora do radical peroxila cerca de dez vezes maior que o L-ascorbato (vitamina C) e β -caroteno (YILMAZ, 2006).

022. Para quantificar o conteúdo fenólico total, alíquotas de 2,0 mL das amostras (1,0 mg/mL) foram misturadas com 5,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 10,0 mL de Na_2CO_3 (7,5%, p/v) e 84,0 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. A absorbância foi medida em 760 nm (AMORIM et al., 2008; FOLIN e CIOCALTEU, 1927).

023. Para quantificar os taninos, alíquotas de 10,0 mL das amostras (1,0 mg/mL) foram mantidas em agitação durante três horas com 1,0 g de caseína. Após filtração, o volume foi aferido para 25,0 mL com água destilada. Alíquotas de 2,0 mL deste filtrado foram quantificadas pelo método Folin-Ciocalteu. O conteúdo fenólico total e de taninos foram expressos em miligramas equivalentes de ácido tânico por g de extrato (mg EAT/g) (AMORIM et al., 2008).

024. O conteúdo de flavonoides dos extratos foi estimado usando o método colorimétrico baseado na formação do complexo flavonoide-alumínio (PEIXOTO-SOBRINHO et al. 2008). Alíquotas de 2,0 mL das amostras (1,0 mg/mL) foram misturadas com 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de piridina (20%, v/v), 2,5 mL de cloreto de alumínio (5,0%, p/v) e 10,9 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. Em 420 nm a absorbância da

solução foi medida. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por g de extrato (mg RE/g).

025. A capacidade de sequestro do radical livre foi medida utilizando o ensaio do DPPH (MENSOR et al., 2001). Soluções estoques (1,0 mg/mL) de EB-Sb e padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT) foram preparadas e diluídas até concentrações finais de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 µg/mL em etanol. A solução de DPPH foi preparada em etanol na concentração de 50 µg/mL. Foi adicionado 1 mL dessa solução a 2,5 mL das soluções das amostras e padrões nas diferentes concentrações testadas, e deixou-se reagir por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os valores de absorbância foram medidos em 518 nm e convertidas em percentual de atividade antioxidante (%AA).

026. O método da inibição da co-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico é baseado na perda da coloração amarela do β-caroteno, devido à sua reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico através da aeração do meio (WANNES et al., 2010). Dessa forma, para o preparo do meio oxidante foram dissolvidos 2 mg de β-caroteno em 10 mL de clorofórmio e foram adicionados a 2 mL desta solução 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado a 40 °C e 100 mL de água destilada foram adicionados. Em seguida, a mistura foi agitada durante 2 minutos, conferindo a oxidação do meio. Amostras do padrão e extrato (ácido ascórbico, BHA e BHT) foram preparadas em etanol na concentração de 1 mg/mL. O meio oxidante (3,0 mL) foi adicionado a uma cubeta contendo 0,12 mL dessas soluções. A absorbância foi medida imediatamente em 470 nm e, em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C,

durante 2 horas, quando a absorvância foi medida novamente, o resultado foi expresso em porcentagem de atividade antioxidante (%AA).

027. Os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos que foram encontrados no EB-Sb apresentaram valores de $624,6 \pm 0,42$ (mg EAT/g) e $132,4 \pm 1,76$ (mg RE/g) e $255,8 \pm 2,06$ (mg EAT/g), respectivamente.

028. Os resultados obtidos do EB-Sb no método do sequestro do radical livre DPPH, apresentou valor de CE_{50} $1,46 \pm 0,07$. No teste da inibição da auto-oxidação do β -caroteno, EB-Sb apresentou 60,81%AA.

029. A atividade antioxidante está intimamente ligada à presença de compostos fenólicos, pois estes apresentam em sua estrutura hidroxilas que podem funcionar como agentes doadores de elétrons. Outro determinante estrutural é a capacidade antioxidante de flavonoide atribuída às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (LIEN et al., 1999).

030. A atividade fotoprotetora de EB-Sb das cascas de *Schinopsis brasiliensis* foram medidas por determinação do comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) e Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L (em triplicata).

031. Foram realizadas varreduras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda entre 260-400 nm (VIOLANTE et al., 2009). Cálculo de FPS foi obtido de acordo com a equação descrita por Mansur et al. (1986).

032. De acordo com o espectro de varredura de EB-Sb pode-se observar que o espectro mostrou característica de bandas de absorção em UVB, já que houve absorvância entre os comprimentos de onda de 290 e 320 nm.

033. Foi verificado que ocorreu um aumento na absorbância como aumento da concentração, no qual o melhor resultado foi obtido na concentração de 100mg/mL. Dessa forma, a amostra de *Schinopsis brasiliensis* apresenta um possível potencial fotoprotetor.

034. Os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo em 240-285nm (banda II) e outro entre 300-400nm (banda I). Em geral, a banda II é considerada como devida a existência do anel A e a banda I devida ao anel B. As características das bandas de absorção no ultravioleta são variadas para os flavonoides. As flavonas apresentam a banda I entre 304-350 nm, já nos flavonóis entre 352-385nm. Há alguns grupos de flavonoides, inclusive, que exibem uma banda I de baixa intensidade, frequentemente aparecendo como ombro da banda II (SIMÕES et al., 2007).

035. As flavonas como a apigenina foram descritos na literatura como sendo protetores químicos que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que àqueles visíveis ao olho humano, protegendo as células vegetais dos danos causados pela fotoxidação. Essa classe de flavonoides age na proteção das células contra o excesso de radiação UVB (280-320 nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e caules e absorvem intensamente a luz nessa região do UVB (FERREIRA; OLIVEIRA, SANTOS, 2008).

036. Além disso, foi demonstrado que o aumento da exposição de plantas à luz UVB resulta na maior síntese de flavonas e flavonóis. O que justifica os teores desses compostos encontrados na espécie do estudo *Schinopsis brasiliensis*, uma

vez que a planta é nativa da Caatinga e encontra-se exposta a uma alta incidência de luz durante todo ano.

037. Os resultados do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* das amostras de EB-Sb nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L (em triplicata) com valores de $0,21 \pm 0,01$; $1,35 \pm 0,05$; $2,98 \pm 0,27$; $6,27 \pm 0,69$ respectivamente.

038. De acordo com a resolução RDC 30/12 (BRASIL, 2012) publicada pela Anvisa, os produtos de proteção solar utilizados pela população brasileira, precisam ter um valor mínimo do Fator de Proteção Solar FPS 6. Dessa forma, a amostra EB-Sb 100mg/L assume o pré-requisito de valor mínimos para os valores de fotoproteção.

039. Esse resultado pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos, tais como, flavonoides presentes na amostra.

040. Embora o teste tenha sido realizado *in vitro*, este método se correlaciona bem com os testes *in vivo*, pois se refere a absorbância da substância com o efeito eritematogênico da radiação e intensidade de luz em comprimentos de onda específicos entre 290 e 320 nm região UVB (MANSUR et al.,1986).

041. As preparações farmacêuticas contendo extrato de *Schinopsis brasiliensis* da presente invenção estão apresentadas no anexo 1 dos documentos da patente.

043. O gel foi formulado utilizando o Carbopolímero, que foi disperso na água e adicionado o nipagim e o propilenoglicol. Após repouso por 24 horas, foi vigorosamente agitado até obter o aspecto de gel. O pH foi corrigido para os valores de 5,0 a 5,5 com trietanolamina. Foram feitas quatro amostras G01, G02, G03, G04, todas em triplicata. G01 (Gel de Carbopol[®] + Filtro químico UVAB 10%); G02 (Gel de Carbopol[®] + EB-Sb 10%); G03 (Gel de Carbopol[®] + EB-Sb 5% + Filtro químico UVAB 5%); G04 (Gel de Carbopol[®] + EB-Sb 10% + Filtro químico UVAB 10%).

044. As formulações obtidas foram imediatamente submetidas aos testes de controle de qualidade: aspecto, cor, odor, pH, FPS, viscosidade, espalhabilidade e

teste de resistência à centrifugação e viscosidade relativa e se apresentaram dentro do preconizado. O início do teste de estabilidade foi realizado no primeiro dia (t=1), após 24 horas do preparo e, e diariamente até o 15º dia (t=15).

045. As formulações apresentaram aspectos de homogeneidade, brilho, odor e coloração de acordo com as qualidades desejáveis e pré-estabelecidas para os produtos.

046. Foi determinado o FPS, das formulações contendo EB-Sb e, de acordo com os resultados obtidos, o FPS de G01 foi de 26,28, para G02 foi de 2,30 para o G03 de 19,13 e para o G04 de 30,0. Assim, foram avaliados que quando EB-Sb foram associado aos filtros químicos, houve potencialização do efeito fotoprotetor. Assim, tais resultados demonstram que o extrato pode ser utilizado como filtro químico com finalidade fotoprotetora.