



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



RENATA VIEIRA SILVA

**EXTRATO DOS FRUTOS DE *Spondias purpurea* L. COMO
PRINCÍPIO ATIVO PARA FORMULAÇÃO
FITOCOSMÉTICA FOTOPROTETORA**

Feira de Santana, BA
2015

RENATA VIEIRA SILVA

**EXTRATO DOS FRUTOS DE *Spondias purpurea* L. COMO
PRINCÍPIO ATIVO PARA FORMULAÇÃO
FITOCOSMÉTICA FOTOPROTETORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Branco.

Coorientadora: Prof. Dra. Carla Rodrigues Cardoso Branco

Feira de Santana, BA
2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Convidado - Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dr. Raphael F. Queiroz
Convidado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Dr. Alexsandro Branco
Orientador – Universidade Estadual de Feira de Santana

Dedico este projeto a minha família, em especial ao meu filho Luca, pois é por ele que meus olhos brilham a cada amanhecer.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me dar a oportunidade de viver e aprender algo novo a cada dia.

À minha família, em especial meu filho Luca e meu marido Marcel, pela paciência, compreensão da ausência e amor transmitido a mim. Amo vocês!

Aos meus orientadores Dr. Alexsandro Branco e Dra. Carla Branco, pela oportunidade de crescimento profissional e intelectual.

À professora e amiga Sônia Carine, pela ajuda nesses dois anos de experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica da UEFS, pelos momentos de alegria compartilhados. Em especial a amiga Isabella Reis.

À LABOVET, por permitir ausentar-me para concluir esse projeto.

Obrigada!

“Uma mente que se abre a uma nova ideia, jamais retornará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Os frutos de *Spondias purpurea* L. (Anacardeacea), conhecidos popularmente como seriguela, são ricos em compostos fenólicos, que podem ser aplicados na produção de fitocosméticos. Este trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos do extrato bruto metanólico de *S. purpurea* (EBMSP) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-ESI-EMⁿ), avaliando sua utilização como princípio ativo em formulações fotoprotetoras. Em adição, o teor de fenólicos e de flavonoides, bem como a atividade de sequestro de radicais livres pelo método de DPPH e atividade antimicrobiana pelo método do halo de inibição, também foram verificados. A análise por CLAE-ESI-EMⁿ possibilitou caracterizar cinco compostos fenólicos, entre eles ácidos fenólicos, taninos e flavonóis. O extrato apresentou valores de teor de fenólicos e flavonoides de $28,68 \pm 0,046$ mg de equivalente a ácido gálico/g e $2,64 \pm 0,005$ mg de flavonoide equivalente a quercetina/g de extrato, respectivamente. A atividade antioxidante *in vitro* demonstrou percentual de inibição de 74,41 a 250µg/mL, valor elevado quando comparado com o padrão de rutina. A avaliação do potencial fotoprotetor *in vitro* do EBMSP demonstrou atividade fotoprotetora, com valores de FPS > 6,0 em baixas diluições, e proteção UVA igual aos padrões de benzofenona-3 e rutina. Os melhores resultados entre as formulações de 5, 10, 20 e 30%, para o perfil fotoprotetor UVA e UVB, corresponderam à loção de 30%, entretanto, nenhuma das formulações obteve sinergismo com o padrão de benzofenona-3. Para avaliação da atividade antimicrobiana, sugere-se que o EBMSP possui atividade contra os micro-organismos Gram-negativos *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella dublin*, sem ação para cepas de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: *Spondias purpurea* L., fotoprotetor, CLAE-ESI-EMⁿ, antioxidante, UVA/UVB, antimicrobiano.

ABSTRACT

Fruits of *Spondias purpurea* L. (Anacardeacea), popularly known as seriguela, are rich with phenolic compounds, which can be applied in the production of phytocosmetic. This study aimed to analyze the chemical constituents of the metanolic crude extract of *S. purpurea* (EBMSP) by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-ESI-MSⁿ) and to evaluate this extract as principle active in photoprotective formulations. In addition, the flavonoid and phenolic content, sequestration activity of free radicals by DPPH method and antimicrobial activity by the inhibition zone method, were investigated. HPLC-ESI-MSⁿ analyses were possible to characterize five phenolic compounds, including phenolic acids, tannins and flavonols. The extract showed phenolic content and flavonoid values at 28.68 ± 0.046 mg gallic acid equivalent/g and at 2.64 ± 0.005 mg of flavonoid quercetin equivalent/g of extract, respectively. *In vitro* antioxidant activity showed percentage of inhibition of 74.41 to 250 $\mu\text{g/mL}$, a high value compared with the rutin. The EBMSP demonstrated sunscreen activity, with solar protection factor (SPF) values > 6.0 at low dilutions and UVA protection equal to the reference standards benzophenone-3 and rutin. The best results among formulations 5, 10, 20 and 30% for UVA and UVB sunscreens profile corresponded to lotion 30%, however, no formulations showed synergism with the standard benzophenone-3. To evaluate the antimicrobial activity, suggests that the EBMSP has activity against Gram-negative micro-organisms *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella dublin*, without action to strains of *Escherichia coli*.

Keywords: *Spondias purpurea* L., sunscreen, HPLC-ESI-EMⁿ, antioxidant, UVA/UVB, antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Radiações eletromagnéticas e seus comprimentos de onda.	14
Figura 2	A pele humana e sua composição.	15
Figura 3	Ressonância de elétrons a estrutura molecular das Benzofenonas.	18
Figura 4	Folhas, flores e frutos da Seriguela.	26
Figura 5	Cromatograma do modo negativo para o extrato de <i>S. purpurea</i> L.	38
Figura 6	Curva analítica média do ácido gálico padrão de referência.	42
Figura 7	Curva analítica média da quercetina padrão de referência.	44
Figura 8	Cálculo de regressão logarítmica do sequestro de radical DPPH pelo extrato metanólico das cascas de Seriguela.	45
Figura 9	Característica das cores das formulações.	48
Figura 10	Formulações antes e após teste de centrifugação.	50
Figura 11	Escaneamento de absorção ultravioleta das amostras.	53
Figura 12	Perfil de fotoproteção UVB das amostras.	54
Figura 13	Amostras e suas respectivas diluições para fator de proteção solar $\geq 6,0$.	57
Figura 14	Avaliação do perfil sinérgico das formulações contendo benzofenona-3.	59
Figura 15	Perfil de degradação do <i>trans</i> -resveratrol após irradiação UVA.	62
Figura 16	Degradação do <i>trans</i> -resveratrol após 120 minutos de exposição aos raios UVA.	63
Figura 17	Perfil sinérgico das formulações contendo benzofenona-3.	64
Figura 18	Resultado dos halos de inibição para o extrato bruto de <i>S. purpurea</i> L.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Absorbância máxima UV dos compostos fenólicos.	22
Tabela 2	Atividade fotoprotetora/antioxidante de frutas através de vários métodos extrativos.	24
Tabela 3	Gradiente de solventes utilizados para CLAE-ESI-EM ⁿ	30
Tabela 4	Componentes da emulsão O/A.	32
Tabela 5	Formulações e suas concentrações.	33
Tabela 6	Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.	36
Tabela 7	Característica espectral para substância no modo negativo do EBMSF.	39
Tabela 8	Capacidade do sequestro de radical DPPH (% de inibição) em comparação com o padrão de rutina.	45
Tabela 9	Características organolépticas das formulações.	47
Tabela 10	Características organolépticas das formulações.	47
Tabela 11	Valores de pH antes e após correção com trietanolamina.	49
Tabela 12	Fator de espalhabilidade (mm ² /g) das emulsões formuladas.	50
Tabela 13	Comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) UVA/UVB/UVC das formulações.	51
Tabela 14	Fator de Proteção Solar.	55
Tabela 15	Fator de Proteção Solar para formulações contendo benzofenona-3.	60
Tabela 16	Absorbância das amostras após 120 minutos de irradiação UVA.	63
Tabela 17	Absorbância das formulações para avaliação do perfil sinérgico em comparação com a benzofenona-3.	65
Tabela 18	Zona de inibição (mm) dos microrganismos ao extrato de <i>S. purpurea</i> L.	65

ABREVIATURAS

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DME – Dose mínima eritematogênica
DMSO – Dimetilsulfoxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG – Equivalente ácido gálico
EBMSP – Extrato bruto metanólico das cascas de seriguela
EC₅₀ – Concentração eficaz para inibir 50%
EQ – Equivalente a quercetina
ROS – Radicais livres
ESI – Ionização por eletrospray
FDA – Food and Drug Administration
FPS – Fator de Proteção Solar
LB5 – Loção 5% de Benzofenona-3
LB5+S10 – Loção Benzofenona 5% + 10% de *S.purpurea*
LB5+S20 – Loção Benzofenona 5% + 20% de *S.purpurea*
LB5+S30 – Loção Benzofenona 5% + 30% de *S.purpurea*
LB5+S5 – Loção Benzofenona 5% + 5% de *S.purpurea*
LL – Loção Lanette
LR5 – Loção 5% de Rutina
LS10 – Loção 10% de *S.purpurea*
LS20 – Loção 20% de *S.purpurea*
LS30 – Loção 30% de *S.purpurea*
LS5 – Loção 5% de *S.purpurea*
m/z – Massa/carga
MeOH – Metanol
P.A – Para análise
RNA – Ácido Ribonucleico
rpm – Rotações por minuto
tr – Tempo de retenção
UV – Ultravioleta
UVA – Ultravioleta A
UVB – Ultravioleta B
UVC – Ultravioleta C
VIS – Visível
λ_{máx} – Absorbância máxima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FITOCOSMÉTICOS COMO FOTOPROTETORES	14
2.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ALIADA A FOTOPROTEÇÃO	21
2.3	<i>Spondias Purpurea</i> L. (SERIGUELA)	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	REAGENTE E EQUIPAMENTOS	29
3.2	OBTENÇÃO DOS FRUTOS DE <i>S. purpurea</i> L.	30
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE <i>S. purpurea</i> (EBMSP)	30
3.4	ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPOSTOS POR CLAE-ESI-EM ⁿ	30
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	31
3.5.1	AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOÍDES TOTAIS	31
3.5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	31
3.6	FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA	32
3.7	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES	33
3.7.1	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	33
3.7.2	DETERMINAÇÃO DE pH	33
3.7.3	CENTRIFUGAÇÃO	34
3.7.4	ESPALHABILIDADE	34
3.8	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO ($\lambda_{\text{máx}}$) DAS FORMULAÇÕES	35
3.9	AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVB	35
3.10	AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVA – MÉTODO DE IRRADIAÇÃO DO <i>TRANS-RESVERATROL</i>	36
3.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPOSTOS POR CLAE-ESI-EM ⁿ	38
4.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
4.2.1	AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOÍDES TOTAIS	42
4.2.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	44
4.3	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES	46
4.3.1	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	46
4.3.2	DETERMINAÇÃO DE pH	48
4.3.3	CENTRIFUGAÇÃO	49
4.3.4	ESPALHABILIDADE	50

4.4	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO ($\lambda_{\text{máx}}$) DAS FORMULAÇÕES	51
4.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVB	53
4.6	AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVA – TESTE DE IRRADIAÇÃO DO <i>TRANS-RESVERATROL</i>	61
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	65
5.	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade de espécies vegetais, onde muitas delas ainda não foram devidamente estudadas quanto a sua composição e aplicação, portanto, é de suma importância o estudo e ampliação dos conhecimentos em volta das propriedades farmacológicas, terapêuticas e cosméticas de sua flora (GUERRA; NODARI, 2001).

Dentre os compostos bioativos em plantas estão os fenólicos, que constituem um grupo de substâncias que tem entre suas funções a ação antioxidante e absorção de raios ultravioleta (UV). Os extratos vegetais contendo fenólicos podem ser incorporados a formulações farmacêuticas diversas, podendo originar cosméticos inovadores. As frutas tropicais como a seriguela (*S. purpurea* L.), que são ricos em flavonoides simples e conjugados, o que pode lhe conferir importante potencial biológico e nutricional (CRUZ, 2008; SILVA et al., 2012).

Os produtos fitocosméticos são aqueles que possuem como princípio ativo um ou mais extratos vegetais, com propriedades corretivas e preventivas, que podem vir a retardar o efeito do envelhecimento e dos processos oxidativos da pele, permitindo uma alteração no metabolismo celular cutâneo (OLIVEIRA, 2011).

Segundo Calixto (2000), atualmente, grandes companhias multinacionais tem se interessado em medicamentos produzidos por drogas vegetais, e os valores gastos com marketing para esses tipos de drogas ultrapassam bilhões de dólares. O desenvolvimento tecnológico da indústria cosmética possibilitou que várias substâncias ativas pudessem ser aplicadas em formulações fitocosméticas (ISAAC et al., 2008; DAL'BELO, 2008; CAMARGO, 2010).

A partir do aumento do interesse pelo desenvolvimento de fitocosméticos inovadores juntamente com o interesse pelo conhecimento das atividades biológicas de princípios ativos naturais do Nordeste brasileiro, este trabalho tem como objetivo principal investigar o potencial de *S. purpurea* L. como fotoprotetor em uma formulação farmacêutica, investigando seus componentes químicos, sua capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana.

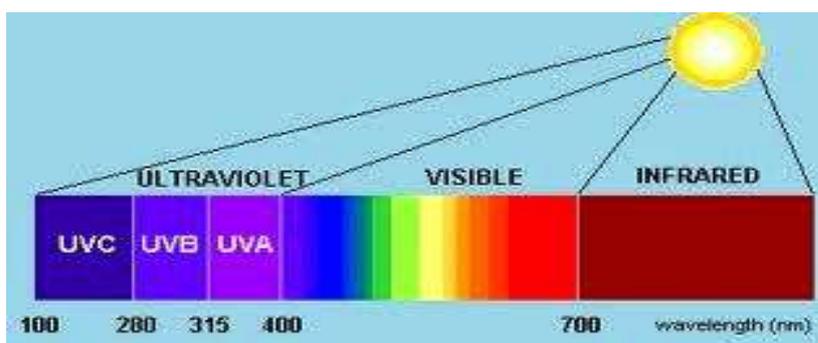
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FITOCOSMÉTICOS COMO FOTOPROTETORES

A incidência de várias doenças e distúrbios relacionados com a radiação ultravioleta solar tem aumentado de forma alarmante. De fato, as radiações solares UVA e UVB atingem significativamente camadas epidérmicas e dérmicas, propagando a formação de eritema, edema, queimadura das células, hiperplasia e supressão imune (SAIJÁ et al., 2000; SVOBODOVÁ et al., 2003).

O sol é responsável por emitir as radiações sobre a superfície da terra, sendo essas radiações eletromagnéticas divididas em três intervalos de acordo com seu comprimento de onda: ultravioleta (UV) (100-400 nm), visível (Vis) (400-700 nm), e infravermelho (IV) (acima de 700 nm) (Figura 1) (NISHIKAWA et al., 2013).

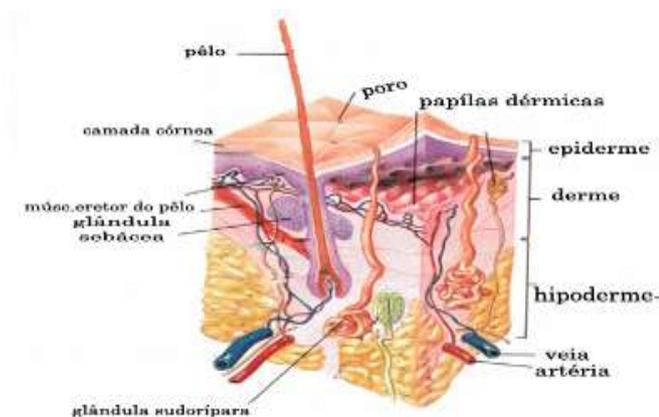
Figura 1: Radiações eletromagnéticas e seus comprimentos de onda.



Fonte: <http://acquaticos.blogspot.com.br/2010/08/radiacao-ultravioleta-gerada-pela.html>

A pele (Figura 2) é considerada o maior órgão do corpo humano com funções de revestimento, barreira protetora contra radiações solares e outros fatores externos. Ela se caracteriza por duas camadas básicas: a epiderme e a derme, e logo abaixo, uma camada de tecido adiposo (camada subcutânea) chamada hipoderme, que têm a função de unir a pele ao tecido muscular (RIBEIRO, 2006).

Figura 2: A pele humana e sua composição.



Fonte: RIBEIRO, 2006.

A epiderme, camada mais ampla, é avascular e funciona como barreira protetora contra agentes estranhos. Sua principal célula é o queratinócito (célula epitelial) e são produzidas na camada inferior da epiderme (camada basal) e na superfície da pele sofrem o processo de queratinização, que dá origem à camada córnea. Ela é formada basicamente por queratina, proteína responsável pela impermeabilização da pele, sendo a primeira barreira contra raios UV, refletindo-a, dispersando-a e absorvendo-a. Além dos queratinócitos, encontram-se na epiderme os melanócitos e as células de defesa imunológica (células de Langerhans) (ROSÁRIO, 2008; GOMES; GABRIEL, 2006).

Os melanócitos, componente fundamental da pele, produzem o pigmento melanina, responsável pela coloração da pele e pelos, e por absorver as radiações UV até regiões próximas do infravermelho (250 a 1200 nm) transformando-as em calor, apreendendo energia e neutralizando radicais livres originados dessa radiação (RIBEIRO, 2006; ROSÁRIO, 2008).

A derme, localizada entre a epiderme e hipoderme, é responsável pela resistência e elasticidade da pele. É constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elastina), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas (ROSÁRIO, 2008).

Ainda que a pele possua muitos mecanismos de proteção contra as radiações existentes, todas as pessoas, independente da idade, cor da pele, estão sujeitos a agressão causadas pelo sol (VANZIR; CAMARGO, 2008).

As radiações ultravioletas dividem-se em Ultravioleta A (UVA) compreendendo radiações entre 320 e 400 nm (UVA I 340 – 400 nm e UVA II 320 – 340 nm) e Ultravioleta B (UVB), com radiações entre 280 a 320 nm e Ultravioleta C (UVC), com radiações entre 100 e 280 nm (BRASIL, 2012; CHORILLI et al., 2006). Essas radiações apresentam diferentes graus de penetração que estão relacionadas ao tamanho de seu comprimento de onda e o local onde foi incidida e absorvida. Os agravos causados à pele ocorrem em vários níveis de epiderme e derme e essas alterações as moléculas são cumulativas, dependendo do tempo e quantidade de raios que entraram em contato com o tecido (VANZIR; CAMARGO, 2008).

Diversas moléculas cromóforas podem absorver a radiação UV e sofrer reações fotoquímicas envolvendo espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas são a melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos como tirosina e triptofano, ácido urocânico, entre outros. Os ácidos nucleicos e as proteínas são os maiores cromóforos que absorvem a radiação UVB (BALOGH, 2011; SVODOBOVÁ et al., 2003).

A região germicida ou bactericida é também conhecida como UVC, pois possuem uma maior energia por conter um menor comprimento de onda. Quando atinge a terra é quase toda absorvida pela camada de ozônio, entretanto, podem atingir a pele e causar danos irreparáveis (ARAUJO; SOUZA, 2008).

A radiação UVB ou radiação eritematógena é a responsável pelas queimaduras solares, eritema, manchas, descamações e também pelo desenvolvimento de bronzeamento a partir da produção de melanina (COELHO, 2005; NASCIMENTO, 2014). A queimadura de sol é resultante de uma dose excessiva de radiação UVB, liberando mediadores inflamatórios como histamina e cinina, e tende a aparecer após 4 horas de exposição, causando danos crônicos as células que incluem fotoenvelhecimento e câncer de pele (VANZIR; CAMARGO, 2008).

As radiações UVA são as mais energéticas por possuírem maior comprimento de onda e podem penetrar profundamente na derme, originando radicais oxidantes, causando, ao longo dos anos, doenças fotossensibilizantes, envelhecimento precoce cutâneo e câncer (ARAUJO; SOUZA, 2008).

Os raios UV também alteram as funções imunes cutâneo, pois podem modificar a morfologia, função e números de células de Langerhans. Outros danos como alteração da microcirculação, hiperqueratinização e ativação de enzimas colagenases também são causados pela exposição excessiva aos raios UV (RIBEIRO, 2006; VANZIR; CAMARGO, 2008).

Para combater os efeitos maléficos da radiação solar são utilizados os protetores solares, também denominados fotoprotetores, que são formulações farmacêuticas desenvolvidas para a proteção da pele e podem ser divididos em compostos inorgânicos e orgânicos, possuindo, conseqüentemente mecanismos diferentes (FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007; VANZIN; CAMARGO, 2008).

Os agentes inorgânicos ou físicos são substâncias insolúveis que formam uma camada protetora a fim de refletir e dispersar os raios UV. São impermeáveis e considerados toxicamente seguros. Exemplos conhecidos desses protetores são o dióxido de titânio e óxido de zinco (VANZIN; CAMARGO, 2008).

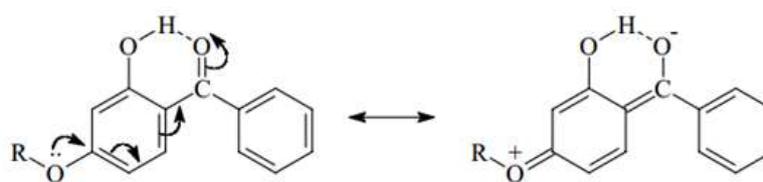
Os agentes orgânicos ou fotoprotetores químicos são substâncias capazes de interagir com a luz UV, difundindo sua energia deletéria, as transformando em radiações inofensivas ao homem. Essas moléculas possuem um mecanismo de ação diferenciado, pois quando absorvem os raios vindos do sol, os elétrons existentes nesses compostos e que estão estabelecidos no orbital de mais alta energia, π HOMO, são estimulados para um de mais baixa energia π^* LUMO, e quando retornam ao orbital anterior, liberam o excesso de energia em forma de calor ou luz fluorescente. Nesses compostos existem anéis aromáticos com grupos doadores de elétrons (grupos carboxílicos, amida, metoxila), em uma posição *orto* ou *para* (FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007; VANZIN; CAMARGO, 2008).

Os protetores orgânicos são divididos em filtros UVA, aqueles que exercem proteção contra os raios UVA; filtros UVB, que exercem proteção contra os raios solares UVB e filtros de amplo espectro, que exercem proteção a ambos os raios UVA e UVB (BALOGH et al., 2011).

Diversas são as classes de filtros orgânicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entre eles estão o Octocrileno (UVA/UVB), Metilbenzidileno cânfora (UVB) e Octil metoxicinamato (UVB). Um exemplo de filtro

orgânico de amplo espectro é a oxibenzona, mais conhecida como benzofenona-3 ou Hidroxi salicilato de 4-metoxi benzofenona, uma das únicas cetonas aromáticas pertencentes à classe dos filtros solares (CABRAL et al., 2011). Sua relação estrutural-atividade acontece por deslocalização dos elétrons pela ressonância, por conta da presença de grupamentos doadores de elétrons *orto* - *para* e um grupamento carbonila participa como elétron receptor (Figura 3).

Figura 3: Ressonância de elétrons na estrutura molecular da Benzofenona.



Fonte: Ribeiro, 2004.

Compostos como as Benzofenonas fazem ressonância demandando menor energia para transição eletrônica, e, como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda, esses compostos tendem a absorver a energia em comprimentos acima de 320 nm (RIBEIRO, 2004).

Além de absorver a radiação ultravioleta, os protetores solares devem ser estáveis na pele e na formulação, não irritantes, não sensibilizantes, sem penetração cutânea, para que não haja exposição sistêmica. Sua reaplicação é um evento que deve ser avaliado e a quantidade a ser aplicada por cm^2 de pele deve ser de 2 mg, sendo necessária uma quantidade de 30 a 40 g de produto por indivíduo adulto (RIBEIRO, 2004).

Os fotoprotetores apresentam-se mais comumente nas formas farmacêuticas em géis e emulsões, sendo as emulsões os veículos mais usados, tanto na forma de cremes como loções. As emulsões óleo em água (O/A) são os sistemas mais empregados, por serem, sensorialmente mais agradáveis (LIMA et al., 2010).

O método de avaliação do FPS é obtido através dos ensaios *in vivo* utilizando voluntários humanos, o qual indica quantas vezes à pele pode ficar a exposta ao sol, sem o risco de eritema. Quanto maior o FPS, maior será o tempo em que a pele ficará protegida frente às radiações UVB (FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007). Esse valor é calculado de acordo com a equação 1:

Equação 1: $FPS = DME \text{ (pele com proteção)} / DME \text{ (pele sem proteção)}$

Alguns testes *in vitro* foram propostos para auxiliar na determinação do FPS. Mansur et al (1986) correlacionaram a determinação *in vivo* e *in vitro* por um método espectrofotométrico, usada para avaliar a possibilidade de uma substância ser potencialmente protetora antes dos ensaios *in vivo* (FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007).

Para a eficácia contra os raios UVA, a *Food and Drug Administration* (FDA), determina que dois testes devam ser elaborados, sendo o primeiro que avalia a capacidade do fotoprotetor em reduzir a penetração dos raios UVA e outro que testa a capacidade do produto em prevenir o bronzeamento. Não existe metodologia padronizada *in vitro* (BALOGH et al., 2011).

No Brasil, a partir do ano de 2012, a ANVISA determinou que para um fotoprotetor ser aprovado pelo órgão, as empresas precisam testar suas substâncias *in vivo* de acordo com métodos desenvolvidos pelo órgão americano FDA e o órgão europeu COLIPA, sendo o FPS mínimo 6,0 e proteção UVA 1/3 do valor do FPS declarado no rótulo (BRASIL, 2012).

De acordo com Oliveira e Almeida (2012) o interesse por filtros solares contendo produtos naturais é grande, pois estes apresentam menores efeitos colaterais e agressividade ao meio ambiente, além de possuírem substâncias cromóforas, fotoprotetoras e compostos antioxidantes.

Savian et al. (2011), avaliaram a atividade fotoprotetora do café verde em uma formulação contendo 5% do ativo, onde obteve um FPS de 2,53. O mesmo autor relata que em outro estudo houve um sinergismo do óleo essencial após aplicação tópica, verificando-se um aumento de 28% do FPS em comparação com grupos placebo.

Outros estudos avaliaram as propriedades fotoprotetoras do óleo de calêndula. O fator de proteção solar do creme a 5%, em uma diluição de 2 mg/mL, foi 14,84, valores maiores do que o considerado como mínimo pela ANVISA (MISHRA et al., 2012).

Apesar do desenvolvimento de fotoprotetores naturais ser algo crescente e bastante promissor, Oliveira e Almeida (2012) revelam que apenas um pedido de patente foi depositado no INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial no Brasil.

Países da Europa são campeões na prospecção tecnológica envolvendo fotoprotetores naturais, demonstrando a importância e carência da pesquisa frente ao desenvolvimento de cosméticos sustentáveis no Brasil.

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ALIADA À FOTOPROTEÇÃO

Muitas reações no corpo humano originam espécies reativas de oxigênio, os chamados radicais livres, que participam de processos metabólitos importantes no corpo e que são neutralizados a partir de antioxidantes naturais. O excesso de fatores externos podem iniciar reações que resultam no surgimento de radicais livres que o corpo não consegue eliminar, causando modificações químicas em moléculas expostas. Um desses fatores é a exposição a raios solares. As espécies mais conhecidas de radicais livres são o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) e o oxigênio *singlete* (CHEN et al., 2012).

Essas espécies reativas e instáveis de oxigênio (ROS) são capazes de oxidar proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios. A peroxidação lipídica, um efeito à exposição excessiva de ROS, é um processo de agressão oxidativo aos ácidos graxos poli-insaturados, onde esses radicais tendem a reagir com a membrana celular, desestabilizando-a e causando efeitos biológicos irreversíveis, como o envelhecimento, mutagênese, carcinogênese, doenças cardíacas coronárias e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (CHEN et al., 2012).

A exposição ao sol promove a absorção de fótons por compostos susceptíveis à formação de ROS (moléculas cromóforas), além de induzir a diminuição nas concentrações de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, tais como alfa-tocoferol, ubiquinol, glutatona e ácido ascórbico (RIBEIRO, 2006). De acordo com Rosário (2008), o fotoenvelhecimento é considerado como 90% das alterações de pele associadas à idade e ocorrem em consequência da exposição solar exacerbada.

Um agente antioxidante é definido como um composto que em concentrações mínimas, adiam ou previnem a oxidação do substrato. Algumas propriedades são necessárias para ser um bom agente antirradicalar, como presença de substituintes doadores de elétrons ou hidrogênios ao radical, quelantes naturais de metais, todos atributos de compostos fenólicos (RIBEIRO, 2006).

Os fenólicos são um diverso grupo de moléculas classificadas como metabólitos secundários de plantas e envolvem desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados como os taninos. Eles são classificados de

acordo com o número de anéis fenólicos, tendo uma ou mais hidroxilas ligadas ao anel aromático, caracterizando este grupo. Eles podem ser encontrados em vários alimentos, incluído maçãs, amêndoas, uvas, chás e morangos (COENTRÃO, 2005; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; HAMINIUK et al., 2012).

Os flavonoides são um dos grupos mais extensos dos fenólicos e possuem esse termo por incluir uma cadeia carbônica $C_6C_3C_6$. (HAMINIUK et al., 2012). Todos os fenóis absorvem na região ultravioleta (UV) (Tabela 1). Para os flavonoides, o espectro tipicamente consiste em duas absorções máximas nas faixas de 240-285 nm (banda 2) e 300-550 nm (banda 1). A posição precisa e intensidade das bandas fornece informações sobre a natureza do flavonoide e seu padrão de oxigenação (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997).

Tabela 1: Absorção máxima UV dos compostos fenólicos

Classe de Compostos*	Máxima absorção/nm	
	Banda II	Banda I
Fenóis simples	266-295	
Ácidos Fenólicos	235-305	
Ácidos hidroxicinâmicos	227-245, 310-332	
Hidroxicumarinas	210, 250-260, 280-303	312-351
<i>Flavonoides -</i>		
Flavonas, Biflavonas	250-280	310-350
Isoflavonas	245-275	310-330
Flavonols	250-280	350-385
Flavanonas	275-295	310-330
Chalconas	240-260	365-390
Auronas	240-270	390-430
Antocianinas	265-275	465-560

*Solvente usualmente utilizado é o metanol, com exceção das antocianinas que utiliza metanol acidificado.

Fonte: ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997.

Muitos estudos demonstram que dos benefícios atribuídos aos compostos fenólicos estão sua capacidade de reagir com ROS, suas habilidades quelantes (Cu, Fe, etc), e inibição de enzimas que colaboram para o efeito oxidativo (lipoxigenases, ciclooxigenases, proteínas quinase). Seu mecanismo envolve um anel que participa do deslocamento de elétrons e estabiliza a forma radicalar, além de grupamentos hidroxilas que podem aparecer nas posições 3 e 5 nos anéis A e C que potencializam a atividade, exemplo da quercetina, que é um dos flavonoides com maior potencial antioxidante conhecida (MARTINÉZ-FLÓRES et al., 2002; FLAMINI, 2013).

Os fenólicos como os taninos, têm demonstrado eficiência para remover os processos de peroxidação lipídica de ácidos linoleicos, fosfolipídios de membrana e inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, assim como potencial de recessão da formação de ânion superóxido e radicais de DPPH. Seus efeitos citoprotetores são difundidos aos fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais humanas, entre outras (MARTINÉZ-FLÓRES et al., 2002; SVOBODOVA et al., 2003; BALOGH, 2011).

Os níveis de polifenóis podem variar entre cultivos da mesma espécie. A formação de flavonoides glicosilados depende da incidência da luz. As maiores concentrações são encontradas em partes externas da planta, com pequenas quantidades em partes subterrâneas. Isso acontece, pois os fenólicos se acumulam na camada epidérmica de células de tecidos de plantas que são expostas a raios UVB. As concentrações de compostos fenólicos totais de cascas aumentam após o stress provocado por esses raios (COENTRÃO, 2005; HENGARI et al., 2014).

Como os extratos vegetais são uma mistura de diversos compostos na forma livre e heterosídeos com propriedades distintas, exemplo dos flavonoides, eles podem apresentar vantagens em relação a um composto isolado, atuando com ação antirradicalar e em diferentes espécies reativas de oxigênio (BALOGH, 2011). Muitos extratos de frutas já foram utilizados por diversos autores para demonstrarem atividades antioxidantes/fotoprotetoras a partir de vários métodos de extração (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade fotoprotetora/antioxidante de frutas através de vários métodos extrativos.

Espécie	Parte utilizada	Composto com função fotoprotetora	Atividade Antioxidante (EC ₅₀)	FPS (fator de proteção solar)	Tipo de extração	Referência
<i>Bryonia dioica</i>	Fruta	Aperigina, quercetina, kaempferol, flavonóis	1,5 ± 0,1	-	Metanol: água (80:30), temperatura ambiente por 1 hora	Barreira et al., 2013.
<i>Tamus communios</i>	Fruta	Luteonina, Kaempferol, Aperigina, quercetina, flavonóis	0,9 ± 0,1	-	Metanol: água (80:30), temperatura ambiente por 1 hora	Barreira et al., 2013.
<i>Garcinia brasiliensis</i>	Epicarpo	Benzofenonas, polifenóis, biflavonoides, xantonas	47,46	18,5 (100 mg/mL)	Maceração etanol (31), temperatura ambiente	Figueiredo et al., 2014.
<i>Lycopersicon esculontum</i>	Fruta	-	-	6,083	Metanol (100 mL)	Gupta, 2013.
<i>Malpighia glabra L.</i>	Frutos	Malvidina, Quercetina, Kaempferol, Ácido cafeico, Ácido ferúlico	120 eq BHT/g	0,14 a 10%	Etanol	Souza et al., 2013.
<i>Psidium guajava L.</i>	Fruta	Flavonoides, taninos	0,29 ± 0,003	-	Percolação com 1,5 L de etanol 70%, temp. ambiente	Chiari et al., 2012.

Fonte: O autor.

A atividade antioxidante é um ponto respeitável no estudo de fotoproteção, sendo determinada por vários métodos colorimétricos. Um dos métodos que se destaca é a utilização de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), onde os compostos são testados quanto à sua capacidade de sequestrar esses radicais, reduzindo-o e mudando sua coloração de púrpura para amarelo. É um método indireto, mas eficaz para verificação da atividade antioxidante de produtos naturais (BORGES et al., 2011).

Atualmente, por conter princípios ativos capazes de absorver os raios UV e neutralizar radicais livres produzidos após exposição solar, os extratos vegetais são aplicados em formulações fotoprotetoras, podendo intensificar a proteção final do produto. Os flavonoides, por apresentar semelhança estrutural com filtros químicos, além da tendência a não absorção cutânea, são compostos que apresentam potencial

para exercerem a atividade fotoprotetora (SOUZA et al., 2013; SILVA; CASTRO, 2013).

Os flavonoides rutina e quercetina têm sido avaliados frente à ação fotoprotetora, onde, estudos demonstram que a rutina atua contra danos causados pela ação dos raios ultravioleta e pode ser usada como adjuvante nos sistemas de protetores solares. De acordo com Angeli (2007), o flavonoide quercetina, quando associada a uma emulsão não iônica, aumentou a inibição da mieloperoxidase, a depleção da glutathione e a secreção/atividade das proteinases, indicando sua possível utilização tópica para prevenção de danos fotooxidativos.

Solovchenko et al. (2003) estudaram a ação de proteção de flavonoides isolados das cascas de maçãs irradiadas e não pelos raios UVB, e constataram que extratos da pele de maçã obtiveram elevada absorvância na região do UV, diferente das não irradiadas. Este extrato obteve máxima absorvância em 358 nm acompanhando picos de ondas curtas (perto de 260 nm), características de absorção da quercetina, demonstrando a importância desses compostos na proteção de frutas tropicais.

As plantas medicinais estão progressivamente sendo empregadas na dermatologia e em produtos cosméticos, principalmente devido aos efeitos colaterais menores quando comparados com os efeitos causados por produtos sintéticos (BARREIRA et al., 2013). Vários extratos de plantas podem ser incorporados a protetores solares para minimizar os efeitos oxidativos dos ROS, formando produtos cada vez mais eficientes e sustentáveis (SARAF; KAUR, 2010).

2.3 *Spondias purpurea* L (Seriguela)

A família Anacardiaceae é representada por cerca de 80 gêneros e 600 espécies, possuindo características diferenciadas, como a presença de substâncias terpenóides, polissacarídeos, assim como compostos de interesse da indústria farmacêutica (OLIVEIRA, 2011).

O gênero *Spondias*, pertencente a essa família e possui 18 espécies distribuídas mundialmente, onde seis dessas estão no Brasil e são árvores frutíferas tropicais exploradas por seu valor comercial. Dentre a espécie que se sobressai ao gênero está a seriguela (*Spondias purpurea* L.), planta nativa da América Central que pode vir a ser conhecida como ciriguela, ameixa espanhola, cajá vermelho, jacote, ciruela mexicana (SILVA, 2011; BRITO, 2010).

Fisicamente, é uma árvore de médio porte que amadurece ao logo do ano a dependendo de sua variante. Pode atingir até sete metros com inflorescências panículas terminais, ramificadas com flores masculinas, femininas e hermafroditas, representados na Figura 4 (SILVA, 2011).

Figura 4: Folhas, flores e frutos da *S. purpurea* L.



Fonte: O Autor.

Seu fruto se apresenta sob forma ovoide, pesando entre 15 e 20 g, com coloração amarelo ao vermelho intenso, casca fina e lisa, polpa amarela de aroma e sabor agradável a ácido, com semente branca e grande em relação ao fruto. Nas seriguelas provenientes do Nordeste brasileiro, no seu estágio maduro, a polpa constitui 70,22%, a casca de 13,80% e a semente e outros 15,61% do peso da fruta (BRITO, 2010; LIMA, 2009; ENGELS et al., 2012; SILVA et al., 2014).

As frutas e outras partes dessa planta têm sido utilizadas para o tratamento de várias enfermidades como diarreia, úlceras “sapinho”, disenteria, inchaços diversos, além de seu extrato metanólico ter uma ação antimicrobiana comprovada (ENGELS et al., 2012). O efeito adstringente da casca já é bastante difundido, sendo os frutos da família Anacardiaceae utilizados medicinalmente em países como o Camboja, associados a outros vegetais (OLIVEIRA, 2011).

O gênero *Spondias* é apreciado pela relação a sua atividade antimicrobiana. Abo et al. (1999) relatou atividade significativa para folhas de *Spondias mombin*, onde os extratos foram eficazes contra cepas de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, sendo mais ativo que a gentamicina 10 mg/mL. Outro microrganismo susceptível foi contra *Estafilococos aureus*, entretanto, não houve ação antifúngica considerada.

Gachet et al. (2010), descreve que a medicina popular do Equador utiliza as cascas da espécie *purpurea* contra doenças parasitárias, exemplo da leishmaniose. Os autores comprovaram a atividade do extrato metanólico contra o *Trypanosoma brucei rhodesiense* utilizando a técnica de microtitulação.

A seriguela também é considerada uma excelente fonte de nutrientes (carboidratos, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas A, B e C) e metabólitos secundários, como exemplo dos compostos fenólicos. A distribuição destes compostos pode ser diferenciada a depender do órgão vegetal em que se encontra e da maturação dos frutos (SILVA et al., 2012; SILVA, 2011).

Estudos fitoquímicos de algumas espécies de *Spondias* descritos por Silva et al 2014a, demonstram a presença de taninos, flavonoides, triterpenos, alcaloides. Omena et al. (2012) identificou em *Spondias purpurea* e *tuberosa*, a presença de polifenóis e taninos (casca e semente), antocianinas, proantocianidinas e flavonoides na casca da seriguela, leucoantocianidinas, catequinas nas sementes, antraquinonas e cumarinas nas cascas e sementes de seriguela e umbu, e saponinas nas sementes de seriguela.

Apesar de ser uma espécie bastante difundida no Nordeste brasileiro, a caracterização dos seus compostos e atividade biológica associada ainda são pouco determinadas. Alguns estudos indicam a potente atividade antioxidante desta fruta, entretanto, existem poucos estudos sobre o perfil de compostos fenólicos existentes (ENGELS et al., 2012) assim como seu perfil fotoprotetor. Nesse sentido, pesquisas

com frutos de seriguela são necessários para gerar conhecimentos sobre sua composição química e potencial farmacológico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REGENTES E EQUIPAMENTOS

Para preparação do material botânico foi utilizado estufa, moinho de facas, metanol P.A, funil de Buchner, papel Watmann nº1 e rotaevaporador. Para a espectrometria de massas utilizou equipamento Esquire 3000 Plus-Bruker Daltonics, capilar de 4000V, nebulizador a 40 psi, gás seco de 9 litros/min e temperatura a 300 °C, solução aquosa de H₂O/H₃PO₄, metanol grau analítico e coluna C₁₈ (fase reversa).

O teste antioxidante foi realizado com DPPH, padrão de rutina (Sigma Aldrich[®]), etanol P.A (Cromoline[®]) e espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis (Varian[®]). Para análise de polifenóis e flavonoides totais foi utilizado reagente de Folin Ciocalteu's, padrão de ácido gálico, padrão de quercetina (Sigma Aldrich[®]), carbonato de sódio e cloreto de alumínio (Fmaia[®]) e espectrofotômetro já mencionado.

Para formulação das emulsões utilizou agitador de pás, placa de aquecimento, cera Lanette N, estearato de octila, imidazolidinil ureia, propilenoglicol e trietanolamina (Pharmanostra[®]), metilparabeno, propilparabeno e glicerina vegetal (Fragon[®]), vaselina líquida (Galena[®]).

As análises físico-químicas foram efetuadas usando pHmetro digital Digimed DM-22, com sensor Digimed DNE-CVB, tampão comercial pH 4,0 e 7,0, centrífuga Eppendorf Centrifuge 5424 e Eppendorf 3 g. Para a espalhabilidade utilizou-se papel milimetrado, pesos de vidro e paquímetro.

A atividade antimicrobiana incluiu Agar Triptona de Soja (TSA) e Caldo Triptona de Soja (TSB) (Sigma Aldrich[®]), tubos de ensaio, estufa, meio Ágar Muller-Hilton e Caldo Muller Hilton (Sigma Aldrich[®]), placas de petri, capela de fluxo laminar, álcool P.A, solução salina 0,75%, ácido sulfúrico P.A e Cloreto de bário P.A (Fmaia[®]), contador de colônias eletrônico CP-600 Plus Phoenix, Swab estéril, Dimetilsilfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich[®]), Amoxicilina 500 mg (Medley[®]).

Para avaliação do comprimento de onda máximo e perfis fotoprotetores UVA e UVB foram utilizados etanol P.A, padrão de benzofenona-3 e resveratrol (Sigma Aldrich[®]), placas de petri (4,5 cm diâmetro), cuba com lâmpadas UVA 60 watts potência.

3.2 OBTENÇÃO DOS FRUTOS DE *S. purpurea* L.

Os frutos de *S. purpurea* foram coletados no município de Santo Estevão-BA, onde uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana sob número de tombo HUEFS 211101 com coordenadas 12° 26 minutos 05,9 segundos Leste e 39° 15 minutos 34,2 segundos Oeste.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS CASCAS DE *S. purpurea* (EBMSP)

10 kg do material coletado foi descascado manualmente, onde suas cascas foram secas em estufa a 50 °C e pulverizados em moinho de facas. Os constituintes químicos foram extraídos por maceração em metanol P.A 100% (2l), por 72 horas à temperatura ambiente (25 °C). A mistura foi filtrada a vácuo utilizando funil de Buchner e papel Watmann nº 1 e posteriormente o solvente foi removido em rotaevaporador à pressão reduzida e temperatura controlada de 60 °C, obtendo-se 500 g de extrato bruto final.

3.4 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CLAE-ESI-EMⁿ

Os ensaios por espectrometria de massas com ionização por eletrospray foram efetuados pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), e foi utilizado equipamento Esquire 3000 Plus-Bruker Daltonics, capilar de 4000V, nebulizador a 40 psi, gás seco de 9 litros/min e temperatura a 300 °C, coluna de fase reversa C₁₈. Sua fase móvel utilizada composta por solução aquosa de H₂O/H₃PO₄ a 0,1% e metanol, na forma de gradiente, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Gradiente dos solventes utilizados para CLAE-ESI-EMⁿ

Tempo (min)	Solvente	
	H ₂ O/H ₃ PO ₄ 0,1%	MeOH
0-19	75	25
20-24	0	100
25-35	75	25

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de fenólicos totais foi determinado de acordo com a metodologia de SINGLETON e ROSSI (1965) e JARSYCKA et al. (2013). Foi preparada uma solução estoque a 1,0 mg/mL em metanol, onde 1,0 mL do extrato foi misturado a 5,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 em água). Após 8 minutos, foi adicionada a mistura 4,0 mL de carbonato de sódio a 7,5% (p/v). Passados 60 minutos no escuro e em temperatura ambiente (25 °C), sua absorvância foi lida a 765 nm em aparelho espectrofotômetro UV/Vis. Para o branco foi utilizado todos os reagentes na mesma proporção, retirando-se o extrato a ser avaliado. A concentração de polifenóis foi mensurada a partir construção da curva de calibração de ácido gálico (10 mg/L a 100 mg/L). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com JARSYCKA et al. (2013). Primeiramente 2,0 mL do extrato (1,0 mg/mL solução estoque) foi adicionado a 2,0 mL de cloreto de alumínio 2% em metanol. Após 60 minutos no escuro e em temperatura ambiente (25 °C), a absorvância foi lida em espectrofotômetro UV/Vis a 420 nm, após o branco. A concentração de flavonoides totais foi calculada a partir construção da curva de calibração da quercetina (1 mg/mL). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A atividade antioxidante do EBMSF foi realizada de acordo com MELO et al. (2008) com alterações, monitorando-se o consumo de radical livre DPPH (solução em etanol a 0,3 mM). Soluções do extrato (1,0 mg/mL) foram diluídas em etanol até as concentrações de 1, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL. Adicionou-se 1,0 mL da solução de DPPH e 2,5 mL das diversas concentrações do extrato. Foram feitas leituras em espectrofotômetro UV/Vis após 30 minutos em 518 nm. Para o branco foi utilizado 1,0 mL de etanol adicionado dos extratos nas diferentes concentrações; o controle negativo 1,0 mL DPPH mais 2,5 mL de etanol; o controle positivo foi efetuado a partir da rutina, nas mesmas concentrações do extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi calculada e expressa em percentuais de inibição de DPPH conforme a equação:

$$\% \text{ Inibição DPPH} = [(\text{Controle negativo} - \text{Absorbância}) / \text{Controle negativo}] \times 100$$

A concentração eficaz EC_{50} , que indica a capacidade do extrato em inibir 50% do radical DPPH, foi calculada a partir da regressão logarítmica da curva padrão de rutina.

3.6 FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA

A forma farmacêutica escolhida para incorporação dos extratos foi uma emulsão do tipo O/A (Tabela 4). A formulação da loção foi retirada de Batistuzzo et al. (2002).

Tabela 4: Componentes da emulsão O/A.

Fase	Matérias primas	Quantidades	Propriedades
1	Metilparabeno	0,15%	Conservante
	Glicerina	5%	Umectante
	Água deionizada	q.s.p. 100g	Veículo
2	Propilparabeno	0,05%	Conservante
	Vaselina líquida	3%	Umectante
	Estearato de octila	4%	Emoliente
	Cera Lanette N	8%	Base Auto
	Benzofenona-3 (quando utilizado)	5%	Emulsionante
	Rutina (quando utilizado)	5%	Fotoprotetor UVA/UVB
3	Imidazolidinil Ureia	0,1%	Fotoprotetor

A preparação da loção ocorreu aquecendo separadamente a fase aquosa 1 e oleosa 2 a $80 \pm 5^\circ\text{C}$, vertendo a fase aquosa na oleosa e agitando continuamente até esfriamento. A imidazolidinil ureia foi adicionada após resfriamento da loção.

Os extratos foram incorporados após a loção pronta, variando a concentração. Depois de formuladas, os pHs foram medidos e acertados com trietanolamina para pH próximo da pele humana (4,6 – 5,8). As formulações analisadas quanto a seu potencial fotoprotetor estão destacadas na Tabela 5.

Tabela 5: Formulações preparadas com o EBMSP.

Formulação	Componentes
LL	Loção Lanette
LS5	Loção + Extrato 5%
LS10	Loção + Extrato 10%
LS20	Loção + Extrato 20%
LS30	Loção + Extrato 30%
LB5	Loção + Benzofenona 5%
LB5+S5	Loção + Benzofenona 5% + Extrato 5%
LB5+S10	Loção + Benzofenona 5% + Extrato 10%
LB5+S20	Loção + Benzofenona 5% + Extrato 20%
LB5+S30	Loção + Benzofenona 5% + Extrato 30%
LR5	Loção+Rutina 5%

3.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES

3.7.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

As características organolépticas foram verificadas em todas as formulações de acordo com Brasil (2004). Entre os parâmetros analisados estão cor, odor, maciez, aspecto antes e após incorporação dos extratos, todos verificados à temperatura ambiente (25°C) e fonte de luz natural, tendo como padrão de referência a loção após manipulação sem nenhuma incorporação.

3.7.2 DETERMINAÇÃO DE pH

Depois de formuladas, foi medido o pH de todas as emulsões antes e após correção desse parâmetro para próximo da pele humana. O ensaio foi realizado através de pHmetro digital próprio para análise emulsões, onde as amostras foram inseridas diretamente em contato com o eletrodo, verificando sua diferença de potencial (BRASIL, 2004). Antes das leituras, o pHmetro foi calibrado com solução tampão comercial pH 4,0 e 7,0. O ensaio foi efetuado em triplicata.

3.7.3 CENTRIFUGAÇÃO

Para avaliar a estabilidade inicial das formulações, foi realizado o teste de centrifugação das emulsões após correção de pH. Em eppendorf com capacidade para 3 g, foram pesados 1,55 g das amostras centrifugadas por 30 minutos a 3.000 rotações por minuto (rpm) e temperatura ambiente (25 °C). As formulações foram observadas quanto ao aparecimento de precipitações, separação de fases e aparecimento de gotículas de óleo. O ensaio foi realizado em triplicata (BRASIL, 2004).

3.7.4 ESPALHABILIDADE

Colocou-se abaixo da placa suporte de vidro uma folha de papel milimetrado. Acima da placa suporte, foi posicionada outra placa contendo um cilindro de 2,0 cm de diâmetro, onde foi adicionada a amostra. Retirou-se cuidadosamente o cilindro e sobre a amostra adicionou-se uma placa de vidro de peso pré-determinado. Após um minuto calculou-se a superfície abrangida através da medição do diâmetro em duas posições opostas com posterior cálculo de diâmetro médio. Repetiu-se o procedimento acrescentando novas placas, em intervalos de um minuto, e registrando, após cada determinação, a superfície e o peso da placa adicionada (COELHO, 2005). Os testes foram efetuados em triplicata.

A espalhabilidade, determinada a 25 °C, foi calculada através da Equação 2:

$$\text{Equação 2: } E_i = d^2 \cdot \pi / 4$$

Onde: E_i =espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2); d =diâmetro médio (mm) e $\pi=3,14$

Os resultados da espalhabilidade foram apresentados pela relação entre a área de espalhamento conseguido com a aplicação de esforço sobre o produto e o esforço limite, relação esta que corresponde ao Fator de Espalhabilidade em mm^2/g .

3.8 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO ($\lambda_{\text{máx}}$) DAS FORMULAÇÕES

Para determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) utilizou-se metodologia de Violante et al. (2009). As formulações foram diluídas em etanol absoluto P.A. nas concentrações 1 mg/mL para LL, LS30, LB5+S30, LR5, EBMS e 0,4 mg/mL para LB5, e realizada varredura em espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 270 a 480 nm, em cubeta de quartzo 1,0 cm, verificando assim absorções nas regiões ultravioleta A e B. O álcool etílico P.A foi utilizado como branco para o extrato bruto, e a LL para as formulações, sendo o experimento verificado em triplicata.

3.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVB

O FPS foi determinado pelo método *in vitro* espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986). Foi preparada, a partir de cada formulação e extrato bruto, uma solução estoque de 1 g/mL, solubilizado em etanol P.A. Dessa solução estoque, várias concentrações foram obtidas (0,2, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/mL) para se obter um perfil de FPS das amostras estudadas. Após esse procedimento, foi efetuada a leitura das amostras em triplicata no aparelho espectrofotômetro UV/Vis, com ajuste da abertura da fenda de 2 nm e intervalo de leitura de 5 nm. A formulação LL foi utilizada como branco e as leituras realizadas entre 290 a 320 nm. O FPS médio foi calculado de acordo com a Equação 3 e Tabela 6 abaixo:

$$\text{Equação 3: } \text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot 2 \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção (igual a 10); EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ).

Tabela 6: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.

λ (nm)	EE (λ) \times I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Σ	1,0000

Fonte: MANSUR et al. 1986.

3.10 AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVA - MÉTODO DE IRRADIAÇÃO DO *TRANS*-RESVERATROL

O potencial fotoprotetor UVA foi avaliado pelo método de Irradiação do *trans*-resveratrol de acordo com Detoni et al., (2012) modificado. Utilizando-se placas de petri (4,5 cm de diâmetro) contendo 0,1 mg/mL de resveratrol em etanol P.A, pesou-se 0,04 g de cada formulação e extrato em placas individuais, espalhando homogeneamente com a ajuda de uma espátula. As placas foram colocadas em cuba fechada e submetidas à radiação com lâmpadas UVA (320-400 nm) de exposição com 60.0 W de potência. A fotodegradação do resveratrol foi avaliada nos tempos 0 (t0) a 120 minutos (t120), com análise a cada 20 minutos, por espectrofotômetro UV/Vis. As avaliações da fotodegradação do resveratrol foram feitas em triplicata.

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do extrato das cascas de *S. purpurea* foi avaliada segundo Bauer et al. (1966) e Iha et al. (2008) com modificações. Para a avaliação do potencial antimicrobiano, os micro-organismos *Escherichia coli* (1110033 Fiocruz), *Pseudomonas aeruginosa* (1010230 Fiocruz) e *Salmonella dublin* (142804 Fiocruz), foram enriquecidos em caldo TSB e TSA e semeados na superfície do Ágar Mueller-Hilton. A suspensão bacteriana preparada em solução salina 0,75% foi padronizada pelo tubo 0,5 da escala McFarland, correspondendo aproximadamente a 10^6 UFC/mL. A seguir, discos contendo papel de filtro de 1 cm de diâmetro foram impregnados com 20 μ L do EBMSP diluído em DMSO (concentração de 102.400 μ g/mL) e inseridos sobre a superfície do Ágar inoculado. Após incubação por 24 horas a 37 °C foram observados

os halos de inibição. A medida dos halos foi realizada com paquímetro e o resultado dado em milímetros. O controle positivo e negativo utilizado foi o antibiótico amoxicilina e DMSO, respectivamente.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de polifenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante foram calculados pelos valores originais e expressos em média \pm desvio padrão após análises em triplicata, assim como os valores de pH. A espalhabilidade e os potenciais fotoprotetores *in vitro* foram analisado empregando o software GraphPrism[®] e a avaliação estatística foi determinada por análise de variância ANOVA seguida de teste de Tukey de múltipla variância, com significância de 5%.

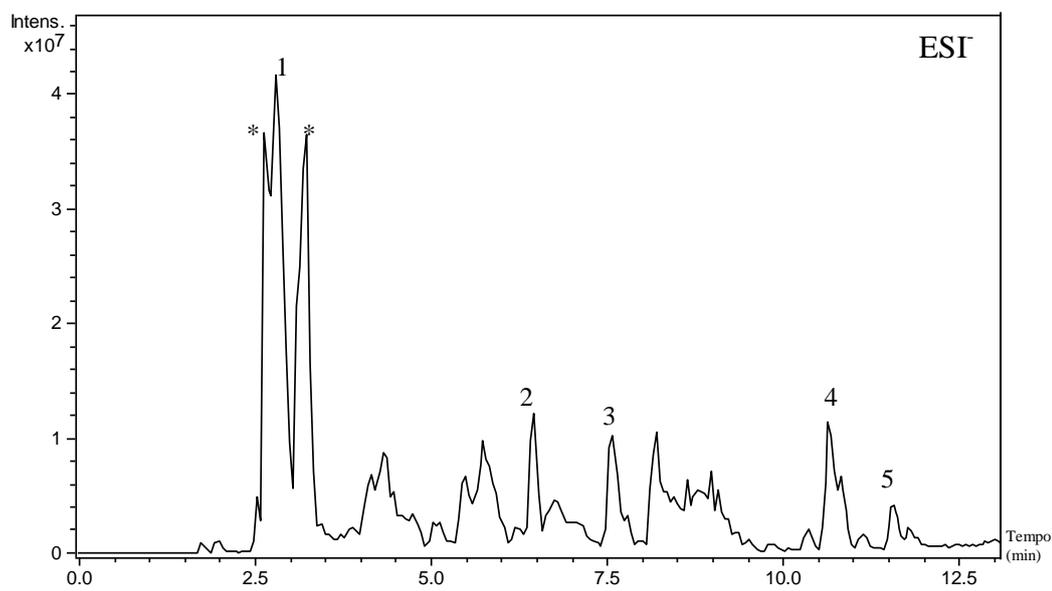
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CLAE-ESI-EMⁿ

De um modo geral, os frutos são constituídos por endocarpo (parte interna) e epicarpo (parte externa). O endocarpo contém grande quantidade de açúcares e água, além da presença de metabólitos secundários. O epicarpo, por apresentar a primeira barreira de proteção biológica do fruto, também contém quantidades grandes de metabólitos secundários, sendo as cascas de frutas tropicais bastante estudadas na literatura em relação à sua determinação de fenólicos.

Previamente foram analisadas a casca e polpa da *S. purpurea* para triagem de escolha. Os dois materiais foram analisados separadamente por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de arranjo diodos, onde foi escolhido o estudo das cascas por conter uma quantidade maior de compostos de interesse. Após maceração do material, utilizou-se a espectrometria de massas no modo negativo para análise dos constituintes químicos. O cromatograma desta análise é demonstrado na Figura 5 e Tabela 7.

Figura 5: Cromatograma do modo negativo para o extrato de *S. purpurea* L.



*Picos não analisados por problemas técnicos.

Tabela 7: Característica espectral para substâncias no modo negativo do EBMSP.

Pico	t_r (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	EM ⁿ	Substância Proposta
1	2,8	683	MS ³ [683] 503-341-179	Dicafeoil-diglicose
2	6,5	633	MS ² [633] 463-301	HHPD-galoil-glicose
3	7,6	935	MS ³ [935] 633-463-301	Galoil-bis-HHPD-glicose
4	10,6	609	MS ³ [609] 301-179	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (Rutina)
5	11,6	301	MS 301	Quercetina

A análise por CLAE-ESI-EMⁿ apresentou para o pico 1 ($t_r= 2,8$) massa molecular compatível com a estrutura de dois ácidos cafeico ligados a duas unidades de açúcares. Seu íon precursor é um dímero em m/z 683.2 que corresponde ao $[M-H]^-$, com fragmentação de terceira-ordem m/z 341, por perda de uma unidade de hexose formando a aglicona do ácido cafeico com m/z correspondente a 179.2 $[M-162-H]^-$ (GOUVEIA; CASTILHO, 2011; BARREIRA et al., 2014).

O dímero encontrado contém em sua estrutura o ácido cafeico, que é um dos ácidos hidroxicinâmicos presentes em plantas que quando aplicados topicamente, protegem a pele contra o eritema induzido por UVB *in vivo* e *in vitro*. Seu efeito fotoprotetor foi correlacionado com sua atividade antioxidante (KULLAVANIJAYA et al., 2005). Seija et al. (2000) estudaram a permeação cutânea do ácido cafeico em soluções aquosas e concluíram que o mesmo atravessa o estrato córneo, agindo nas células da pele mais profundas, auxiliando na remoção de ROS. Outros relatos na literatura se utilizam de ácidos fenólicos obtidos de folhas e cascas da espécie de *Salix* sp. para produção de cosméticos pela presença de ácidos hidroxicinâmicos como o cafeico (BALOGH, 2011).

Com efeitos biológicos estudados, Prasad et al. (2009) irradiaram linfócitos juntamente com ácido cafeico e comprovaram que esta substância reduz os níveis de marcadores da peroxidação lipídica, além de diminuir os efeitos citotóxicos induzidos pelos raios UVB, afirmando sua atividade fotoprotetora.

O pico 2 ($t_r = 6,5$) apresentou sinal de molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 633, correspondendo a um hexahidroxidifenoila (HHDP) galoil glicose, classificado como um elagitanino. Fragmentações de segunda-ordem geraram os sinais m/z 463 $[M-170-H]^-$ referente à perda de um ácido gálico originando um sinal em m/z 301 $[M-162-H]$ (ROMANI et al., 2012).

Para análise do pico 3 ($t_r = 7,6$), sugere-se a estrutura do galoil-bis-HHDP-glicose com $[M-H]^-$ m/z 935. Sua fragmentação de terceira ordem levou a formação de íons produtos em m/z 633 $[M-302-2H]^-$ resultado da perda de um HHDP, m/z 463 $[M-170-H]^-$ resultado da perda de uma unidade de ácido gálico e m/z 301 $[M-162-H]$ pela perda de uma hexose (ROMANI et al., 2012).

Os elagitaninos têm várias atividades biológicas reportadas na literatura, entre elas estão à atividade anti-HIV, antitumoral e antimicrobiana, como também relatos de atividade antioxidante (ROMANI et al., 2012; CARVALHO, 2010). Romani et al. (2012) citam que o epicarpo de *Punica granatum*, mais conhecida como Romã, possui compostos fenólicos como o galoil glicose, ácido elágico e vários outros tipos de flavonóis glicosilados, assim como os encontrados nas cascas de seriguela.

Os taninos, segundo Svobodova et al. (2003) são potentes antioxidantes que podem proteger as células da pele contra radicais livres causados pela exposição aos raios ultravioleta, reduzindo assim os riscos de câncer prematuro. Os mesmos autores citam que taninos hidrolisáveis administrados topicamente, reduzem a formação de peróxido de hidrogênio e a incidência de tumores em pele de ratos.

O pico 4 com t_r em 10,6, apresentou dois sinais em m/z 609 e m/z 677. A fragmentação de terceira ordem do íon precursor m/z 677 gerou a formação de íons produto m/z 609, considerado o $[M-H]^-$ sugerido como a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina) e m/z 301 $[M-308-H]^-$ a quercetina após perda do açúcar rutinose (TIBERTI et al., 2007).

O pico 5, com $t_r = 11,6$, apresentou dois sinais de íons precursores, um em m/z 301 $[M-H]^-$, sugerido como quercetina, e outro sinal em m/z 625 $[2M+Na-2H]^-$ corresponde ao aduto da quercetina, que em *full scan* (EM²) obteve fragmento compatível com a quercetina aglicona em m/z 301.

A rutina é um flavonoide da classe dos flavonóis muito encontrado em folhas e frutas e é a forma glicosilada da quercetina. Segundo Saewan e Jimtaisong (2013) a quercetina é um dos mais potentes flavonóis antioxidantes devido à quantidade de grupamentos hidroxilas substituídos em sua molécula. Estudos *in vivo* demonstraram que este composto protege ratos contra as radiações UV, além de eliminarem espécies radicalares. Kreft et al. (2003) descrevem que flavonoides como rutina e quercetina protegem as células contra os raios UVB, evitando que as radiações modifiquem moléculas vitais como DNA e RNA.

Slovchenko e Smichtz-Eiberger (2003) demonstraram o aumento da quantidade de quercetina glicosilada, principal flavonoide caracterizado no epicarpo de maçãs expostas ao sol, e que esse composto contribui positivamente para a proteção UVB dessas frutas, pois elas absorvem a energia radiante nessa faixa de espectro entre 290 a 320 nm. Agati et al. (2013) especulam que a biossíntese de derivados da quercetina ocorre por ligação direta da luz solar, logo, pelo epicarpo ser a primeira proteção contra essas radiações, seria uma excelente fonte desses compostos.

Fahlmon e Kron (2009) evidenciam que a aplicação tópica de quercetina aglicona mostrou ser efetiva na prevenção contra raios UVC e prevenção de mieloperoxidase induzida por raios UVB, além de sua ação antioxidante extensa.

Engels et al. (2012) caracterizaram 20 compostos fenólicos extraídos de amostras liofilizadas de *Spondias purpurea* L. originárias da Costa Rica. Entre os ácidos fenólicos encontrados estão o galoil glicose e ácido gálico, compostos também encontrados a partir da fragmentação de íons precursores. Foi encontrado também composto como o ácido 3-cafeoilquínico, fragmentando-se em ácido quínico e cafeico. Dentre os flavonóis descritos, estão a quercetina ligada a vários tipos de açúcares e outros flavonoides como derivados do kaempferol e rhamnetina.

Bora et al. (2014) citam em uma revisão sobre a *Spondias pinnata*, também da família Anacardiaceae, que de seu fruto foram isolados compostos como os elagitaninos, e que essa espécie é muito utilizada na Índia como regulador da menstruação por seu poder adstringente natural. Oliveira et al. (2012) citam que outras espécies dessa família, como o caju (*Anacardium occidentale* L.) é habitualmente usado

na medicina popular como antioxidante, antidiabético, antitumoral, podendo os polifenóis serem responsáveis por essas atividades biológicas mencionadas.

Os espectros de massas de todos os picos caracterizados estão ao final deste trabalho, representados no Anexo I.

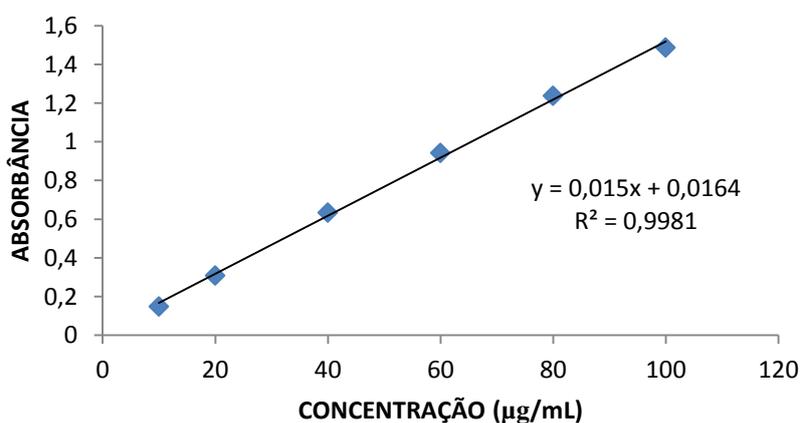
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.2.1 AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

O reagente de Folin-Ciocalteu avalia a quantidade de substâncias polifenólicas com grupamentos hidroxilas capazes de reduzir o reagente de Folin, formando óxidos de cor azul (molibdênio e tungstênio) (REZENDE, 2010).

O cálculo da concentração é realizado com ajuda da curva analítica do padrão de ácido gálico, construída com os valores de absorbância e diferentes concentrações, expostas na Figura 6. O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados gerou a equação descrita, assim como seu coeficiente de correlação linear (R^2) médio, que obteve valor de 0,9981, bastante próximo de 1, conferindo linearidade ao método.

Figura 6 - Curva analítica média do ácido gálico padrão de referência.



Os valores da absorbância do extrato foram aplicados na equação da reta substituindo o valor de y, de maneira a encontrar o valor de x determinado em µg/mL. Os cálculos foram ajustados a providenciar valores equivalentes ao ácido gálico (EAG) em miligrama por gramas de extrato.

O valor médio de fenólicos totais encontrado para o EBMSF foi de $28,68 \pm 0,046$ mg de EAG/g de amostra, valores superiores quando comparados a dados de outras espécies descritas na literatura. Oliveira (2011) registrou em extratos etanólicos dos frutos de *Spondias dulcis*, valores de 202,94 µl EAG / 100 g de fruto.

De acordo com Tiburski et al. (2011) que estudaram o teor de frutas consumidas no Brasil, a polpa da *Spondias mombin* L. mais conhecido como cajá, continham em suas amostras teor de $260,21 \pm 11,89$ mg EAG/100 g. Almeida et al. (2011), averiguaram o teor de fenólicos totais contidos no suco de várias frutas do Nordeste brasileiro, dentre elas a seriguela ($55,0 \pm 2,1$ mg EAG/ 100 g), *Spondias tuberosa* ou Umbu ($44,6 \pm 2,7$ mg EAG/ 100 g), *Tamarindus indica* L. ou Tamarindo ($83,8 \pm 6,1$ mg EAG/ 100 g), valores inferiores ao encontrado neste estudo.

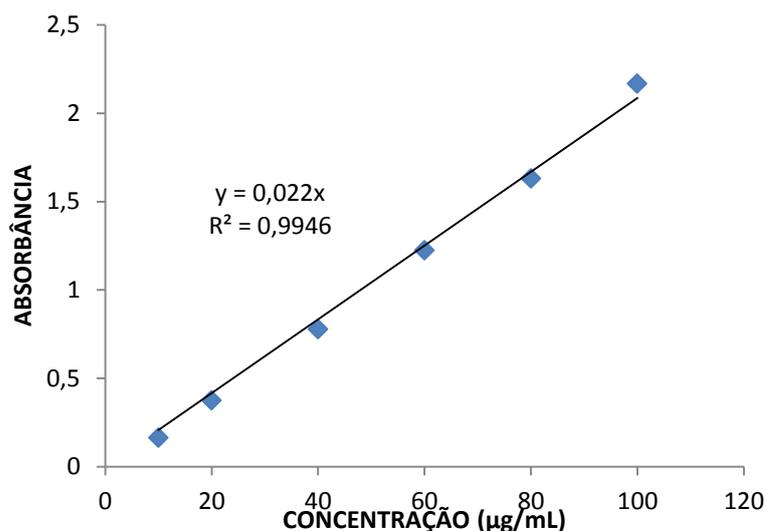
Silva (2011) pesquisou o teor de fenólicos totais em extrações ocorridas com acetona e metanol em vários tipos de genótipos de seriguela, encontrando resultados variantes de 352,48 mg EAG/100 g a 866,38 mg EAG/100 g de amostra. Todos os valores encontrados pelo pesquisador foram inferiores ao encontrado nesse estudo.

Rezende (2010) apresenta teores similares dos encontrados neste estudo para a polpa liofilizada de seriguela. Utilizando o mesmo método de Folin, o pesquisador obteve teor de fenólicos totais de $20,84 \pm 34,19$ mg EAG/g de amostra. Outras espécies de *Spondias* também foram estudadas, o umbu (*Spondias tuberosa*) com $2,23 \pm 4,45$ mg EAG/g e cajá (*Spondias mombin*) com $16,45 \pm 15,79$ mg EAG/g de amostra.

A concentração de flavonoides totais foi quantificada a partir do método do cloreto de alumínio, que ao se complexar com os flavonoides absorvem a energia UV em 425nm, quantificando-os (REZENDE, 2010).

O valor encontrado é avaliado conforme teste de fenólicos totais, com construção da curva de calibração da quercetina (Figura 7), seguida de regressão linear, onde os valores são relatados em equivalente a quercetina (EQ) por grama de extrato.

Figura 7: Curva analítica média da Quercetina padrão de referência



O teor de flavonoides contidos no extrato é um ponto importante, pois os mesmos possuem uma capacidade redutora conhecida na literatura, provocando ações preventivas primárias contra as radiações solares (MUNHOZ et al., 2012; CHIARI et al., 2012).

O conteúdo total de flavonoides existentes na amostra obteve valor de $2,64 \pm 0,005$ mg EQ/g de extrato. Valores parecidos foram encontrados nos extratos etanólicos de frutas de *Garcinia brasiliensis*, com concentração de 3,4 mg EQ/g de amostra (FIGUEIREDO et al., 2014).

Comparando o valor de fenólicos totais com flavonoides totais, é possível afirmar que o extrato estudado possui uma quantidade de compostos fenólicos elevado, e que cerca de 10% corresponde à classe dos flavonoides. A partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que o extrato metanólico das cascas de seriguela é uma excelente fonte de compostos fenólicos.

4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Muitos métodos são propostos para averiguar a capacidade antioxidante em frutas. O método do DPPH é um dos mais utilizados por ser rápido, prático e seguro (GREGORIS et al., 2013).

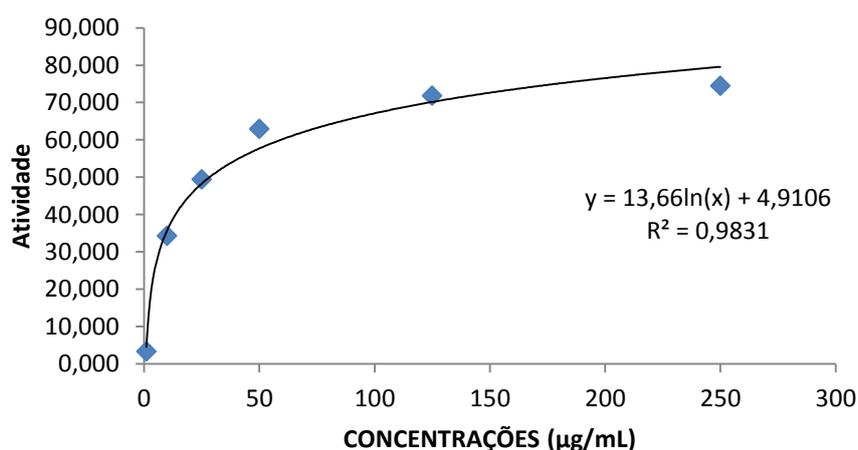
Dentre os constituintes antioxidantes existentes nos vegetais, estão compostos como ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis, que possuem capacidade de sequestrar o radical DPPH, atuando como doadores de elétrons. Esses compostos, quando em contato com a solução de DPPH de cor violeta, ao reagirem, muda-se para uma coloração amarela que absorve a radiação luminosa a 517 nm (MELO et al., 2008).

A avaliação da capacidade de sequestrar o radical DPPH do extrato das cascas de *S. purpurea* está descrita na Tabela 8. Pode-se observar que a concentração do padrão de rutina, a 250 µg/mL, conseguiu sequestrar 90,01% do radical DPPH existente, enquanto o extrato estudado conseguiu sequestrar 74,41%, demonstrando um alto potencial antioxidante do extrato. A regressão do tipo logarítmica confere um R² próximo de 1 e é vista na Figura 8.

Tabela 8: Capacidade de sequestro de radical DPPH (% de inibição) em comparação com o padrão rutina.

Concentração (µg/mL)	% Inibição	
	EBMSP	Padrão Rutina
1	3,29±0,042	30,83±0,037
10	34,23±4,890	50,86±0,071
25	49,41±0,603	80,19±0,029
50	62,90±2,562	82,65±0,338
125	71,83±0,488	84,93±0,494
250	74,41±1,255	90,01±1,393

Figura 8: Cálculo da regressão logarítmica do sequestro de radical DPPH pelo extrato metanólico das cascas de seriguela.



A partir da equação é possível calcular o valor da concentração eficaz (EC₅₀), que é a concentração do extrato, em µg/mL, capaz de reduzir 50 % do radical DPPH

disponível, logo, quanto menor o EC₅₀, melhor a capacidade antioxidante do extrato. A EC₅₀ encontrada para o extrato das cascas de seriguela foi de 27,11 µg/mL.

Sousa e Vieira (2011) avaliaram a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do resíduo das polpas de frutas e obtiveram valores de EC₅₀ para acerola (*Malpighia glabra L.*) de 308,07 ± 0,75 µg/mL, goiaba (*Psidium Guajava L.*) de 142,89 ± 4,85 µg/mL e abacaxi (*Ananas comosus L.*) de 3.293,92 ± 9,89 µg/mL, valores muito maiores que o encontrado nesse estudo, demonstrando que o extrato metanólico das cascas tem um elevado poder antioxidante diante de outras frutas tropicais.

Gregoris et al. (2013), avaliaram a capacidade antirradicalar de outras frutas, entre elas a seriguela, e confirmou que a mesma possui valores baixíssimos de EC₅₀ correspondentes a 8 ± 1 (mM), a caracterizando com de excelente capacidade antioxidante.

Vários autores vêm demonstrando de forma conclusiva que existe uma correlação entre a capacidade antioxidante e a concentração de fenólicos e flavonoides totais de frutas e hortaliças. Chiari et al. (2012), citam que “existe a conexão entre essas duas grandezas, pois quanto maior a concentração de compostos fitoquímicos, maior a atividade antioxidante natural”, entretanto, Melo et al. (2008) destaca que a capacidade antioxidante não pode ser esclarecida com base nos seus teores de fenólicos e flavonoides, pois a estrutura do composto ativo pode influenciar na eficácia da capacidade antirradicalar, porque, quanto maior a quantidade de grupos hidroxilas e suas posições na molécula, maior essa ação.

4.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES

4.3.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

De acordo com Isaac et al. (2008) uma variedade de extratos podem ser incorporados em formulações farmacêuticas, tendo atividades diferenciadas a depender do seu princípio ativo, entretanto, essa adição pode acarretar em alterações ou não da forma farmacêutica escolhida, por isso é importante analisar alguns parâmetros inerentes às emulsões elaboradas.

As características organolépticas são parâmetros analisados para avaliar se uma formulação está de acordo com as pretensões exigidas pelo formulador e são baseadas

nas propriedades sensoriais e químicas da amostra (BRASIL, 2004). As variáveis organolépticas foram analisadas por observação direta/sensorial que são: o aspecto da emulsão antes e após incorporação do extrato, o odor, a cor final, maciez e brilho.

O EBMSP caracteriza-se por ser um extrato consistente, de cor marrom e odor característico da fruta. A emulsão Lanette, depois de manipulada, consistiu em uma loção de cor branca brilhosa, odor característico e maciez. Alguns autores, como Borghetti et al. (2006) e Silva et al. (2014b) utilizam esse tipo de emulsão para incorporação de fotoprotetores. Após adição dos extratos nas concentrações estudadas, foi observada mudanças na coloração, odor e brilho de todas as formulações (Figura 9).

A formulação contendo apenas o padrão de benzofenona-3 se distinguiu pela presença da cor levemente amarelada, maciez, brilhosa e odor característico do fotoprotetor. A formulação contendo apenas padrão rutina obteve coloração amarelo-esverdeada, maciez, com pouco brilho e odor característico da loção Lanette. Todas as características organolépticas estão descritas na Tabela 9-10 e demonstradas na Figura 9.

Tabela 9: Características organolépticas das formulações.

	LL	LS5	LS10	LS20	LS30	LR5
Cor	Branca	Levemente amarelada	Amarelada	Levemente amarronzada	Amarronzada	Amarelo-esverdeada
Odor	Característica	Da fruta	Da fruta	Da fruta	Da fruta	Característica da Loção
Brilho	Brilhosa	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Maciez	Macia	Macia	Macia	Macia	Macia	Macia

Tabela 10: Características organolépticas das formulações.

	LB5	LB5 + S5	LB5 + S10	LB5 + S20	LB5 + S30
Cor	Levemente amarelada	Levemente amarelada	Amarelada	Levemente amarronzada	Amarronzada
Odor	Característica	Da fruta	Da fruta	Da fruta	Da fruta
Brilho	Brilhosa	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Maciez	Macia	Macia	Macia	Macia	Macia

Figura 9: Características de cores das formulações*.



*(A) LL, (B) LS5, (C) LS10, (D) LS20, (E) LS30, (F) LB5, (G) LB5+S5, (H) LB5+S10, (I) LB5+S20, (J) LB5+S30, (L) LR5.

Segundo Milese e Guterres (2002), a emulsão é a melhor forma farmacêutica para emprego de fotoprotetores, e ela deve ser homogênea, estável e não gordurosa, aspectos observados nas formulações contendo os extratos de seriguela. Assim, não houve mudanças significativas após incorporação do extrato à loção, considerando assim as formulações aceitáveis e promissoras para uso.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH é um parâmetro importantíssimo para formulações tópicas, já que a pele apresenta pH levemente ácido que contribui para a manutenção da sua integridade física, logo, quando essa característica é modificada, podem ocorrer agressões dermatológicas (LEONARDI et al., 2002).

Segundo Ribeiro (2006), o pH pode alterar o deslocamento dos elétrons na molécula de filtros solares, podendo reduzir seu poder de absorver e diminuir o poder protetor, além de torna-los insolúveis. Outro ponto importante se diz respeito à capacidade do pH em acelerar ou diminuir velocidades de reações de hidrólise ou oxidação, causando instabilidades em formulações farmacêuticas.

Para a medição do pH das formulações foi utilizado pHmetro com eletrodo próprio para loções, mergulhando-o de forma direta. Este processo ocorreu logo após a preparação da formulação e adição dos extratos em suas devidas concentrações. Para que as loções ficassem mais próximas do pH cutâneo, foi utilizada a trietanolamina

como agente modificador de pH. A Tabela 11 mostra os valores de pH antes e após a correção.

Tabela 11: Valores de pH antes e após correção com trietanolamina.

Formulação	pH antes da correção	pH após correção
LS5	3,07±0,025	5,64±0,043
LS10	3,02±0,015	5,75±0,026
LS20	2,98±0,015	5,78±0,026
LS30	2,97±0,015	5,74±0,047
LB5	7,02±0,032	-
LB5+S5	3,06±0,05	5,75±0,02
LB5+S10	2,97±0,025	5,78±0,037
LB5+S20	2,96±0,025	5,77±0,026
LB5+S30	2,93±0,047	5,76±0,025
LR5	5,48±0,1266	-

Avaliando a Tabela 11 é possível observar que formulações que contém o extrato de *S. purpurea* possuem pH ácidos, logo, foi necessária a correção do parâmetro para pH próximos ao da pele humana. Para as formulações contendo os padrões de benzofenona-3 e rutina não houve necessidade da correção de pH pois as mesmas estão próximas do cutâneo, além disso, a benzofenona é um composto estável em pH mais básico (RIBEIRO, 2006).

Todos os testes avaliados posteriormente foram efetuados após a correção do pH.

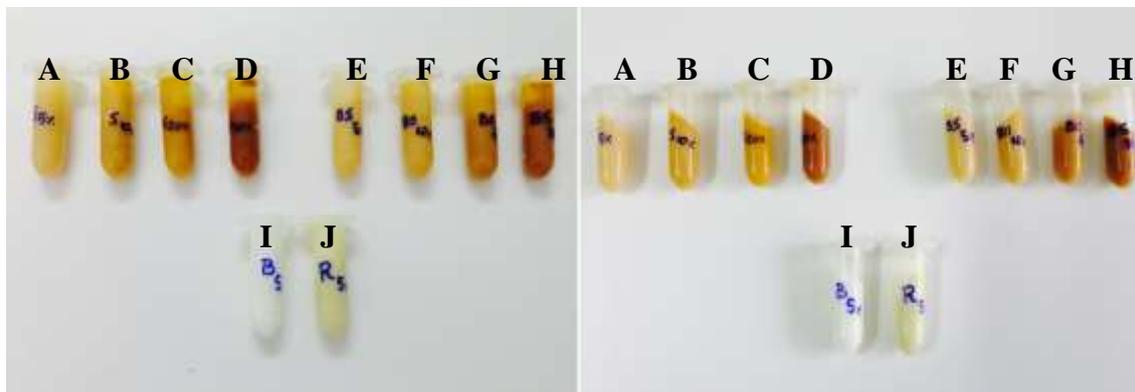
4.3.3 CENTRIFUGAÇÃO

A centrifugação é um teste recomendado pela ANVISA, pois a partir dele é possível simular a força gravitacional, aumentando conseqüentemente a motibilidade das partículas e prevendo sinais de instabilidade como precipitações, separação de fases e formação de sedimentos nas amostras (BRASIL, 2004; ISSAC et al., 2008).

Todas as amostras formuladas foram submetidas ao teste de centrifugação. Após 30 minutos a 3.000 rpm, foi observado que nenhuma amostra possuía separação de fases nem precipitações, considerando assim as formulações aptas a futuros testes de estabilidade. De acordo com Vanzin e Camargo (2008), o não aparecimento de gotículas visíveis de óleo garante à uniformidade da dose aplicada na pele, caso contrário, a

fotoproteção é considerada duvidosa. A Figura 10 demonstra as amostras antes e após teste de centrifugação.

Figura 10: Formulações antes e após teste de centrifugação*.



*(A) LS5, (B) LS10, (C) LS20, (D) LS30, (E) LB5+S5, (F) LB5+S10, (G) LB5+S20, (H) LB5+S30, (I) LB5, (J) LR5.

4.3.4 ESPALHABILIDADE

A espalhabilidade consiste na expansão de uma forma farmacêutica semissólida após aplicação de força durante um período de tempo, e está ligada a eficácia de um fotoprotetor, pois assim que aplicado à pele, este deve formar um filme homogêneo de aplicação agradável, ajudando na redução do consumo pela menor quantidade aplicada (BORGHETTI et al., 2006; BORELLA et al., 2010; KHURY; BORGES, 2011). A Tabela 12 representa os dados referentes ao fator de espalhabilidade de todas as formulações estudadas.

Tabela 12: Fator de espalhabilidade (mm^2/g) das emulsões formuladas.

Formulação	Fator de Espalhabilidade
LL	7,52±0,230 a
LB5	6,89±0,085 b
LS5	6,48±0,171 e
LS10	6,72±0,274 c
LS20	6,04±0,070 g
LS30	6,23±0,126 f
LR5	6,21±0,065 f
LB5+S5	6,67±0,198 d
LB5+S10	5,52±0,081 i
LB5+S20	6,01±0,289 h
LB5+S30	5,01±0,153 j

Tukey: letras iguais representam resultados estatisticamente iguais.

Após análise de variância ANOVA, que obteve médias diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$), foi possível observar que a emulsão que possuiu maior fator de espalhabilidade foi a Lanette, seguida da loção de benzofenona-3.

Nota-se que após adição do extrato, houve uma redução na relação entre a área e o esforço limite (mm^2/g). Sugere-se que a diminuição da espalhabilidade ocorreu, pois o extrato possui uma maior consistência que a loção, diminuindo conseqüentemente sua espalhabilidade (LANGE et al., 2009). Apesar da diminuição da espalhabilidade após adição do extrato, a formulação apresentou bons resultados, visto que essa variação não modificou bruscamente a consistência e fluidez.

Isaac et al. (2008) citam que “os extratos vegetais podem ser adicionados em diversas preparações cosméticas, podendo ou não este alterar a forma farmacêutica e o comportamento reológico das preparações”.

Após análise da espalhabilidade, a adição do extrato de *S. purpurea* mostra-se viável, pois as características físico-químicas são consideradas aceitáveis, entretanto, testes mais específicos de estabilidade precisam ser efetuados.

4.4 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO ($\lambda_{\text{máx}}$) DAS FORMULAÇÕES

Violante et al. (2009) citam que muitas literaturas assinalam que plantas que absorvem os raios UV apresentam em suas composições diferentes moléculas, destacando essa absorção a flavonoides, taninos, antraquinonas e polifenóis.

O espectro de absorção dos compostos fenólicos, em especial os flavonoides, quando diluídos em etanol, apresentam dois picos entre 240-280 e 300- 550 nm, (VIOLANTE et al., 2009). A Tabela 13 apresenta os comprimentos de onda característicos das formulações e extrato bruto estudado.

Tabela 13: Comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) UVA/UVB/UVC das formulações.

Formulação	λ máximo (nm)	λ máximo (nm)	λ máximo (nm)
	UVC	UVB	UVA
LS30	260	292	330
LB5	246	293	330
LB5+S30	246	290	330
LR5	266	298	353
EBMSP	260	292	330

Observando o espectro obtido da LS30, verificamos a presença de picos característicos em comprimentos de onda variando entre 260-280 nm e 300-400 nm, demonstrando absorção de energias por agentes cromóforos na área do UVC, UVB e absorção fraca por UVA. A $\lambda_{\text{máx}}$ ocorreu em 260 UVC, 292 UVB e 330 UVA. O EBMSP obteve as mesmas máximas de absorção da loção 30%, garantindo que os comprimentos de onda absorvidos são dos compostos do extrato de *S. purpurea*.

Para a LB5, o $\lambda_{\text{máx}}$ observado foi de 246 UVC, 293 UVB e 330 UVA. Este padrão é um filtro solar de amplo espectro por absorver radiação nas zonas do UVB e UVA (288-325 nm em etanol), sendo considerado um protetor co-absorvedor pela sua capacidade de associação com outros fotoprotetores. Essa diferença de absorção pode ter ocorrido, pois os componentes da emulsão contribuem para o aumento ou diminuição dos comprimentos de onda e mudanças no FPS (FIGUEIREDO et al., 2014; RIBEIRO, 2004).

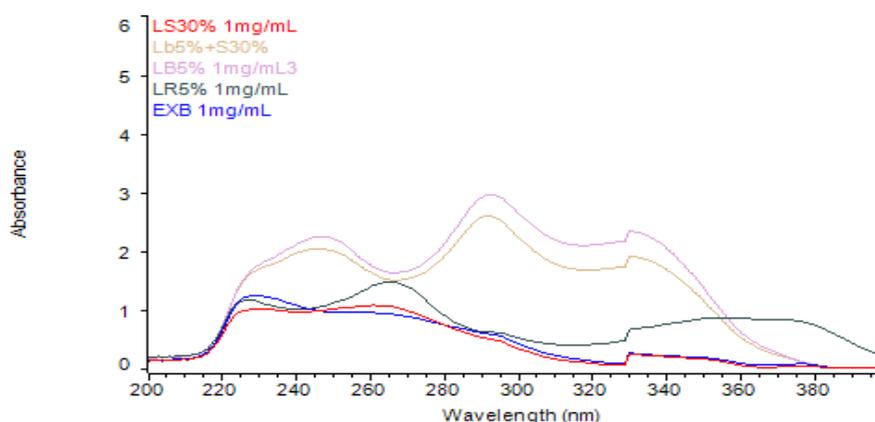
Analisando a associação entre o padrão e o extrato, LB5+S30 foi observado uma diminuição do $\lambda_{\text{máx}}$ na região UVB para 290 nm, não modificando a absorção para as zonas do UVC e UVA. O escaneamento sugere que a absorção principal foi dada pela benzofenona-3, tendo o extrato pouco contribuído para a fotoproteção.

Como segundo padrão de comparação foi utilizado a rotina, substância encontrada nos extratos brutos de *S. purpurea* L. e já conhecida por sua ação antioxidante e fotoprotetora. As máximas de absorção encontradas para a rotina foram de 266 UVC, 298 UVB e 353 UVA, valores divergentes das demais formulações (FIGUEIREDO et al., 2014).

Para verificar se a loção Lanette não absorvia na região estudada, foi realizada a varredura nas mesmas condições da padronizada para as formulações, observando que a emulsão não absorveu nos comprimentos de onda entre 200- 400 nm, garantindo que a absorbância resultante da leitura seria exclusivamente das formulações.

A partir da Figura 11 é possível verificar o espectro de varredura das loções, onde foi observado o padrão de benzofenona-3 possui alta absorção nas áreas do UVC, UVB e UVA. Para as amostras contendo o extrato de *S. purpurea*, observou-se que este possui absorção moderada na área do UVC e UVB, e baixa absorção na área do UVA.

Figura 11: Escaneamento de absorção ultravioleta das amostras*.



* LS30, LB5+S30, LB5, LR5 e Extrato Bruto, respectivamente.

4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVB

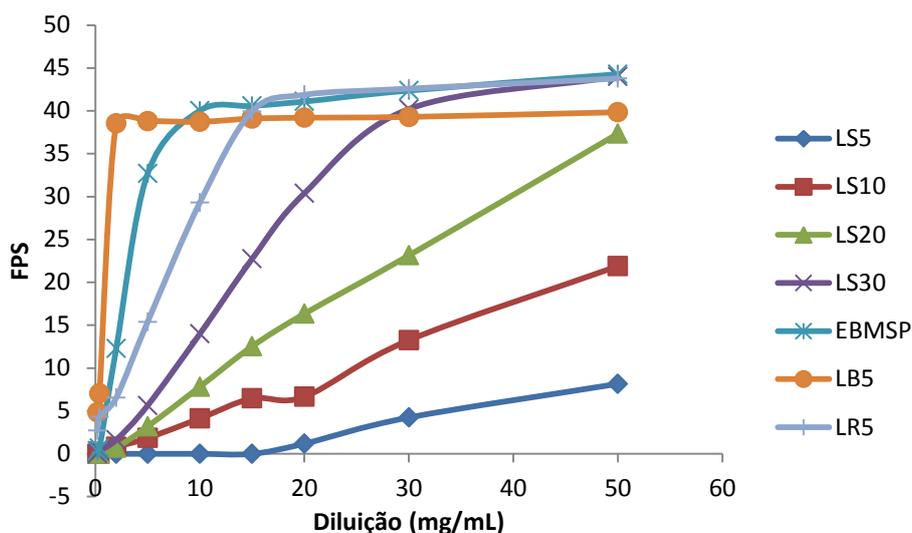
Uma das ações utilizadas pelo homem contra os efeitos nocivos dos raios UV é a utilização de fotoprotetores. Autores como Balogh et al. (2011) citam que a utilização correta desses agentes reduzem a possibilidade do aparecimento de problemas de pele, como exemplo do envelhecimento precoce.

O método de Mansur, empregado para mensurar o FPS *in vitro*, é uma metodologia que correlaciona testes *in vivo*, relacionando a absorbância com o efeito eritematígeno UVB e a intensidade da luz em comprimentos de onda de 290-320 nm (VIOLANTE et al., 2009).

O interesse pela utilização do EBMSMSP como fotoprotetor foi associado a evidências recentes que fitocompostos são bastante efetivos na proteção de doenças quanto compostos isolados, indicando uma necessidade pela descoberta de novos compostos e de estudos sobre o sinergismo entre extratos de plantas e filtros sintéticos (CHIARI et al., 2012).

Todas as amostras foram testadas quanto ao seu potencial UVB e os resultados das absorbâncias foram confrontados estatisticamente pela análise de variância ANOVA ($p < 0,05$). O teste de Tukey de múltipla comparação foi aplicado avaliando se os FPS eram iguais em uma mesma diluição, formando assim um perfil de fotoproteção UVB exemplificado na Figura 12.

Figura 12: Perfil de fotoproteção UVB das amostras.



A partir da análise da Figura 12, foi possível observar que o FPS da loção contendo 5% de extrato foi menor que as formulações contendo 10%, 20%, 30% e o extrato bruto. Isso comprova a afirmação de que o FPS é uma grandeza dose dependente, crescente com o aumento da quantidade dos filtros na emulsão, entretanto, a uma determinada concentração atinge-se os níveis de saturação de absorção, permanecendo assim o FPS quase constante (RIBEIRO, 2006).

As formulações a 5%, 10% e 20% não atingiram os níveis de saturação que são observados no padrão de benzofenona-3 e rutina, onde pequenas quantidades de princípio ativo absorvem grande parte da energia UVB irradiada. Sugere-se que a loção a 30% na diluição de 50 mg/mL está próxima dos níveis de saturação quando se compara com o extrato bruto, que a partir da diluição de 20 mg/mL obtém um FPS com valores próximos das suas diluições de 30 e 50 mg/mL.

A partir dos FPS encontrados na Tabela 14 abaixo é possível verificar que todas as formulações, exceto padrão de benzofenona-3, rutina e extrato bruto, obtiveram FPS estatisticamente iguais para a diluição de 0,2 mg/mL.

Tabela 14: Fator de Proteção Solar.

Amostras	Diluições (mg/mL)								
	0,2	0,4	2	5	10	15	20	30	50
LS5	0d	0e	0f	0g	0g	0g	1,18±0,030g	4,23±0,086f	8,15±0,075e
LS10	0d	0e	0,79±0,185e	1,83±0,123f	4,13±0,108f	6,46±0,055f	6,65±0,135f	13,25±0,238e	21,88±0,130d
LS20	0d	0e	0,70±0,056e	3,18±0,135e	7,82±0,041e	12,53±0,312e	16,33±0,339e	23,14±0,094d	37,33±0,170c
LS30	0d	0,32±0,045d	1,62±0,111d	5,62±0,273d	13,99±0,221d	22,73±0,210d	30,38±0,171d	40,21±0,105b	43,01±0,811a
LB5	4,82±0,090a	7,01±0,125a	38,53±0,325a	38,80±0,146a	38,73±0,120b	39,10±0,080c	38,20±0,062c	39,29±0,165c	39,84±0,234b
LR5	0,36±0,050b	0,67±0,045c	12,27±0,22b	32,67±0,309b	40,02±0,08a	40,58±0,065a	41,08±0,076b	42,37±0,296a	44,27±0,121a
EBMSP	2,70±0,370c	4,30±0,267b	6,53±0,314c	15,37±0,295c	29,31±0,567c	39,92±0,096b	41,88±0,209a	42,59±0,420a	43,78±0,197a

Tukey: letras iguais representam valores estatisticamente iguais para a mesma diluição.

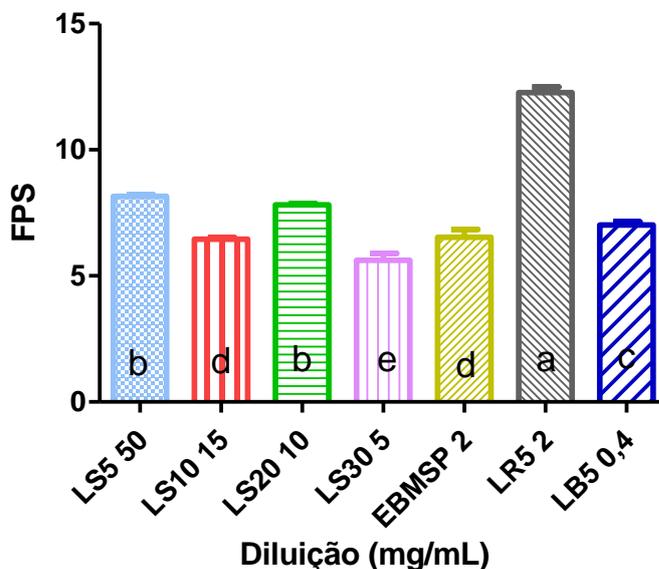
Em uma diluição a 0,4 mg/mL as formulações de 5% a 20% obtiveram FPS iguais a zero. Somente a loção contendo 30% de extrato neste mesma diluição obteve resultado de FPS diferente de zero ($0,32 \pm 0,045$), entretanto, para fotoproteção este valor é considerado irrelevante. A partir da diluição de 2 mg/mL, todas as formulações contendo *S. purpurea*, com exceção da LS5, obtiveram valores de FPS diferentes de zero.

Analisando os dados para a loção a 30%, observou-se que seu FPS é muito próximo do padrão benzofenona em diluições de 30 mg/mL. Esse fenômeno também é observado comparando a loção ao extrato bruto e rutina, onde os perfis se cruzam na diluição de 50 mg/mL que equivalem a FPS iguais.

Para o extrato bruto, foi possível observar que em baixas diluições seus resultados de FPS são diferentes de zero e crescentes, com saturação de absorção dos raios UVB girando em torno de 20 mg/mL, sendo seus FPS estatisticamente iguais ao da rutina em diluições de 30 e 50 mg/mL.

De acordo com a ANVISA, o mínimo de FPS declarado para que a formulação seja considerada fotoprotetora é $\geq 6,0$ (BRASIL, 2012). Na Figura 13 é possível observar os valores mais próximos de 6,0 para todas as amostras e suas respectivas diluições.

Figura 13: Amostras e suas respectivas diluições para Fator de Proteção Solar $\geq 6,0$.



Tukey: letras iguais representam FPS estatisticamente iguais. Fonte: O autor.

Analisando a Figura 13, conclui-se que a concentração de extrato ideal dentro da formulação para se obter um FPS $\geq 6,0$ seria entre 1,5 – 2,0 mg/mL. A LS5 a 50 mg/mL possuiu o mesmo FPS que a LS20 a 10 mg/mL, logo, compensa-se utilizar a emulsão com maior concentração e menor diluição. A LS10 a 15 mg/mL obteve o mesmo FPS que o EBMSP, entretanto, este último demonstrou uma maior absorção dos raios UVB por seu FPS ser maior em baixas diluições. Das loções que contém *S. purpurea*, a que mais protegeu contra os raios UVB foi a LS30%, que em uma menor diluição conseguiu alcançar valores de FPS próximos a 6,0.

Mishra et al. (2012) analisaram o FPS da emulsão 5% com óleo de *Calendula officinalis* em uma diluição de 0,2 mg/mL e obteve valores superiores as encontradas para *S. purpurea* ($14,84 \pm 0,16$). Balogh (2011) analisou o FPS de vários extratos glicólicos em formulações a 10%, e a romã (*Punica granatum*) apresentou em uma diluição de 0,2 mg/mL um FPS $0,27 \pm 0,06$, não muito diferente do FPS encontrado para a LS30.

Souza et al. (2013) avaliaram a atividade fotoprotetora de emulsões a 10% contendo acerola (*Malpighia glabra* L.) também pelo método de Mansur, não citando diluição utilizada, e encontrou um FPS de 0,18. Outros autores, como Violante et al. (2009) e Munhoz et al. (2012) analisaram extratos de plantas da flora brasileira ricos em

substâncias fenólicas e constataram que os mesmos, em diluições de 0,2 µL/mL, obtiveram FPS baixíssimos.

Oliveira (2011) avaliou o fator de proteção solar também pelo método de Mansur da *Spondias dulci*, a uma diluição padronizada de 0,2 mg/mL, e obteve valores de FPS 0,46 para um creme a 5%, 0,79 para um creme a 10% e 1,82 para creme a 20%, valores maiores do que encontrados para a *S. purpurea* na mesma diluição.

Apesar do baixo FPS encontrado para diversas frutas apresentadas, estudos *in vivo* sugerem proteção contra radiação UV e seus efeitos deletérios na pele humana. Adil et al. (2010) apresentaram um estudo com a fruta *Emblica officinalis*, muito utilizada na medicina popular da Índia como antiulcerogênico, contra doenças inflamatórias e metabólicas, sugerindo que o extrato inibe eficazmente o envelhecimento de fibroblastos induzidos por raios UVB, podendo futuramente ser utilizado em aplicações cosméticas.

O estudo sinérgico para a proteção ultravioleta B também foi avaliado frente ao padrão de referência. Souza et al. (2013) afirmaram que extratos contendo substâncias fenólicas estão sendo empregados em formulações com princípios fotoprotetores com o intuito de proteger não somente contra os radicais livres, mas também por sua capacidade de filtrar os raios UV.

A análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) demonstrou diferença significativa entre os grupos analisados, sendo os fatores de proteção solar comparados com a benzofenona-3 na mesma diluição. O perfil sinérgico das amostras é apresentado na Figura 14 e Tabela 15.

Figura 14: Avaliação do perfil sinérgico das formulações contendo benzofenona-3.

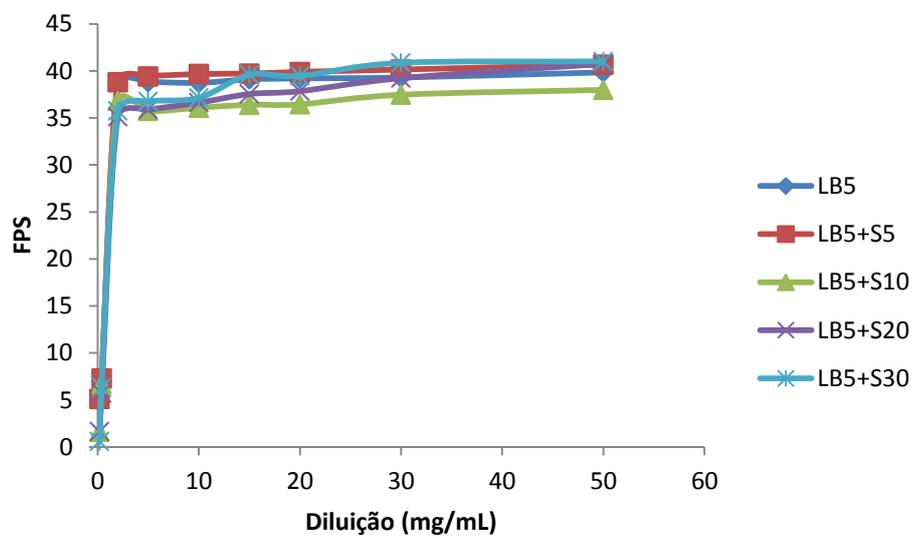


Tabela 15: Fator de Proteção Solar para formulações contendo benzofenona-3.

Diluição (mg/mL)	FPS	
	LB5	LB5+S5
0,2	4,82±0,090 a	5,09±0,032 a
0,4	7,01±0,125 a	7,27±0,318 a
2	38,53±0,325 a	38,80±0,165 a
5	38,80±0,146 a	39,41±0,515 b
10	38,73±0,120 a	39,66±0,134 b
15	39,10±0,080 a	39,72±0,035 b
20	38,20±0,062 a	39,89±0,065 b
30	39,29±0,165 a	40,14±0,074 b
50	39,84±0,234 a	40,66±0,070 b
Diluição (mg/mL)	LB5	LB5+S10
	LB5	LB5+S10
0,2	1,61±0,165 a	1,64±0,075 b
0,4	6,71±0,279 a	5,71±0,320 a
2	36,78±0,136 a	35,10±0,015 b
5	35,74±0,111 a	35,85±0,085 b
10	36,08±0,060 a	36,62±0,245 b
15	36,39±0,231 a	37,53±0,070 b
20	36,44±0,300 a	37,84±0,088 b
30	37,46±0,105 a	38,22±0,085 b
50	37,98±0,040 a	39,75±0,120 b
Diluição (mg/mL)	LB5	LB5+S20
	LB5	LB5+S20
0,2	1,61±0,165 a	1,62±0,075 b
0,4	6,71±0,279 a	5,71±0,320 b
2	36,78±0,136 a	35,10±0,015 b
5	35,74±0,111 a	35,85±0,085 b
10	36,08±0,060 a	36,62±0,246 b
15	36,39±0,231 a	37,53±0,070 b
20	36,44±0,300 a	37,84±0,088 b
30	37,46±0,105 a	39,22±0,085 a
50	37,98±0,040 a	40,75±0,120 b
Diluição (mg/mL)	LB5	LB5+S30
	LB5	LB5+S30
0,2	1,61±0,165 a	0,6±0,100 b
0,4	6,71±0,279 a	6,34±0,311 a
2	36,78±0,136 a	35,72±0,806 b
5	35,74±0,111 a	36,75±0,660 b
10	36,08±0,060 a	37,12±0,115 b
15	36,39±0,231 a	39,59±0,385 a
20	36,44±0,300 a	39,47±0,491 a
30	37,46±0,105 a	40,85±0,187 b
50	37,98±0,040 a	43,67±0,141 b

Tukey: letras iguais referenciam valores estatisticamente iguais para a mesma diluição.

Avaliando todas as formulações observa-se que os FPS encontrados possuem valores iguais ou com diferenças muito baixas quando comparados com a formulação contendo apenas a benzofenona-3. Sugere-se que a fotoproteção foi realizada pelo padrão, sem auxílio do EBMSP, concluindo que não houve sinergismo após adição do mesmo.

Valesco et al. (2008) encontraram resultados diferentes quando associaram a rotina 0,1% a formulações contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3. Para este estudo, houve sinergismo e maior absorção dos raios UVA e UVB, sendo que a formulação contendo apenas o flavonoide exerceu proteção frente à radiação UVA superior à formulação ausente de compostos ativos e às suas associações.

Com base nos resultados obtidos para a possível potencialização do FPS, conclui-se que o extrato de *S. purpurea* não promove o sinergismo com o filtro sintético benzofenona-3.

4.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL FOTOPROTETOR UVA – TESTE DE IRRADIAÇÃO DO *TRANS*-RESVERATROL

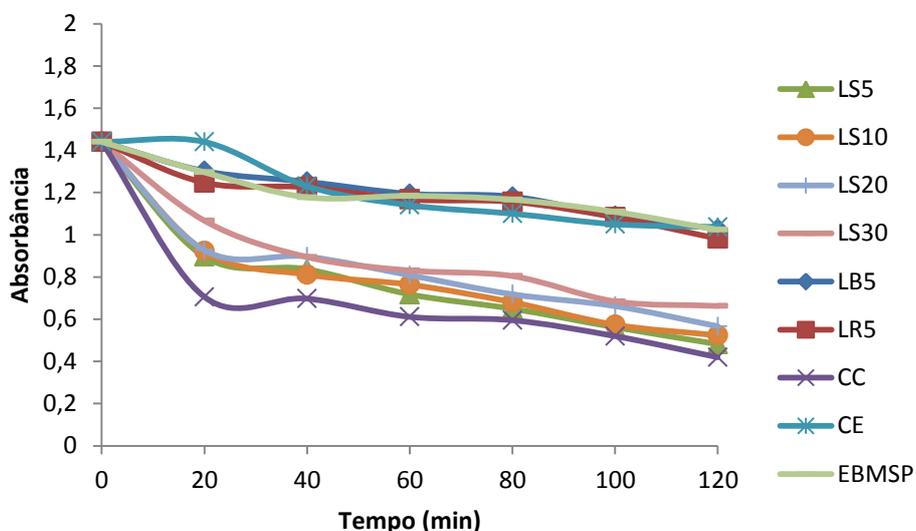
O resveratrol é um polifenol encontrado principalmente nas cascas e sementes de uva. Ele é sintetizado naturalmente nas plantas como dois isômeros, o *trans* e o *cis*-resveratrol. O isômero *trans*, quando exposto a luz, transforma-se no *cis*, tornando suas características diferentes (ORALLO, 2006).

Todas as formulações foram testadas quanto ao seu potencial fotoprotetor UVA nos tempos de 0 a 120 minutos, com leituras a cada 20 minutos. Depois de irradiadas, os resultados obtidos foram tratados estatisticamente para verificar se diferem a partir da análise de variância ANOVA para comparação de mais de duas médias. Foram analisadas variáveis tempo x absorvância. Quanto maior a absorvância após 120 minutos, maior a proteção que a amostra proporcionou ao resveratrol.

De acordo com a ANOVA, todos os grupos diferiram estatisticamente, com valor de $p < 0,05$. O teste de Tukey foi aplicado para avaliar as formulações no tempo 120 minutos com a intenção de sugerir qual emulsão protegeu a degradação do *trans*-resveratrol em *cis* quando aplicado os raios ultravioleta A.

Formulações tópicas incrementadas com 5%, 10% e 20% contém 0,002, 0,004 e 0,008g de extrato bruto respectivamente. A LS5, LS10 e LS20 obtiveram um perfil de degradação do *trans*-resveratrol gradativo, onde o maior nível de degradação ocorreu entre o tempo 0 (t0) e após 20 minutos (t20). A LS30 obteve um perfil de degradação gradativo até 40 minutos, após isso, seus resultados são parecidos para t60-80 e t100-120, o que revelam que a deterioração diminuiu entre 60 e 120 minutos, sugerindo uma proteção maior (Figura 15).

Figura 15: Perfil de degradação do *trans*-resveratrol após irradiação de raios UVA.

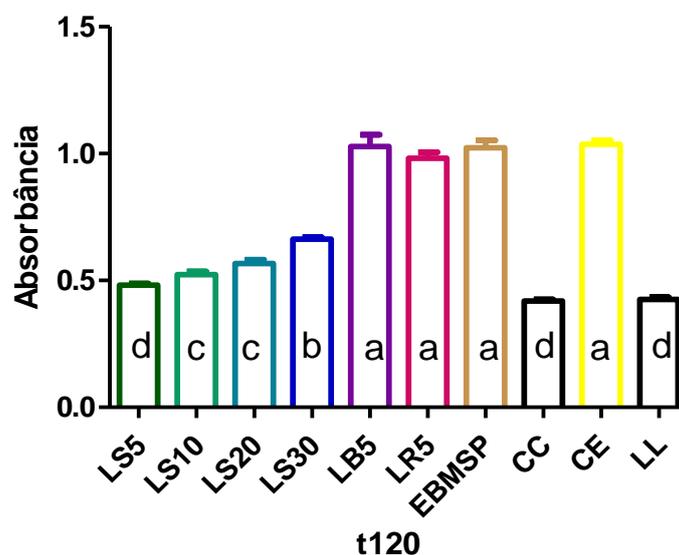


A partir das análises dos dados comparativos entre todas as amostras em t120, foi possível constatar que LS5 não conseguiu proteger a deterioração do *trans*-resveratrol, pois seus dados estatísticos foram iguais ao controle claro (CC), que consistiu em placas de petri sem nenhuma amostra e representando deterioração máxima do polifenol, e LL que foi utilizada como branco. O percentual de degradação das três amostras foram, respectivamente, 66,59, 70,83 e 70,62.

A LS10 e LS20 protegeram igualmente contra a deterioração do resveratrol, uma vez que seus dados foram estatisticamente iguais de acordo com teste de Tukey. Conclui-se que não houve nenhuma vantagem no aumento da concentração do extrato de 10 para 20%. Seus percentuais de degradação do *trans*-resveratrol foram de 64,44 e 60,69. A loção que mais protegeu contra os raios UVA foi a LS30, com um percentual de degradação correspondente a 53,81%.

O EBMSp obteve uma proteção estatisticamente igual quando comparado com LB5, LR5 e controle escuro (CE), que consiste na amostra acondicionada em local longe de qualquer tipo de radiação. O percentual de degradação do polifenol para o EBMSp foi de 28,95%, LB5 de 28,61, LR5 de 31,95 e CE de 27,77%, evidenciando que o extrato puro é um potencial protetor contra as radiações UVA. Esse resultado pode ser explicado, pois existem substâncias orgânicas fotoprotetoras capazes de absorver, dispersar e refletir os raios UV ao mesmo tempo (RIBEIRO, 2006). A Figura 16 demonstra o perfil fotoprotetor após 120 minutos de irradiação de raios UVA e a Tabela 16 as absorbâncias nas formulações analisadas.

Figura 16: Degradação do *trans*-resveratrol após 120 minutos de exposição aos raios UVA.



Tukey: letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais.

Tabela 16: Absorbâncias das amostras após 120 minutos de irradiação UVA.

Formulação	Absorbância (λ)
CC	0,419±0,005 d
CE	1,037±0,015 a
LS5	0,480±0,006 d
LS10	0,523±0,015 c
LS20	0,566±0,015 c
LS30	0,662±0,007 b
LB5	1,028±0,045 a
LR5	0,981±0,024 a
EBMSp	1,024±0,028 a
LL	0,423±0,009 d

Tukey: letras iguais referenciam valores estatisticamente iguais.

Comparando o EBMSP, LB5 e LR5 com a LS30, loção que mais protegeu contra raios UVA, verificou-se que os padrões e extrato bruto obtiveram perfis de proteção aproximadamente duas vezes maior que a loção a 30%.

Para verificar o sinergismo das emulsões em associação com o padrão benzofenona-3, os perfis foram confrontados estatisticamente tendo a LB5 como referência para o mesmo tempo de análise.

Não houve sinergismo para a LB5+S5, visto que todos seus resultados são estatisticamente idênticos a LB5. Resultados parecidos foram encontrados para a LB5+S10, LB5+S20 e LB5+S30, logo, nenhuma das formulações incorporadas juntamente com o padrão mostrou aumento ou diminuição de absorção na banda de UVA (Figura 17 e Tabela 17).

Figura 17: Perfil do sinergismo das formulações contendo benzofenona-3.

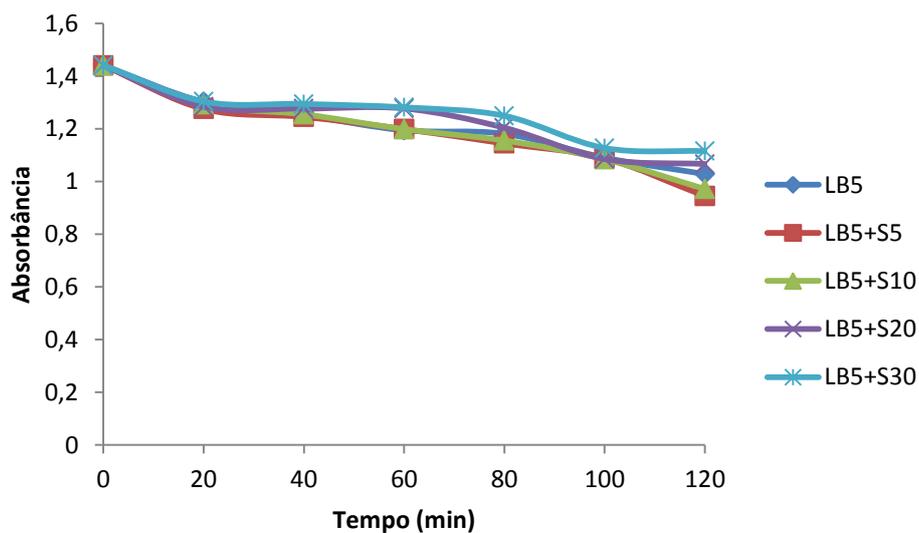


Tabela 17: Absorbância das formulações para avaliação do perfil sinérgico em comparação com a benzofenona-3.

Amostra	Absorbância (λ)*						
	t0	t20	t40	t60	t80	t100	t120
LB5	1,44±0a	1,302±0,006a	1,51±0,025 a	1,194±0,005a	1,181±0,002a	1,090±0,010 a	1,028±0,045b
LB5+S5	1,44±0a	1,275±0,007a	1,245±0,03a	1,199±0,046a	1,144±0,043a	1,088±0,025 a	0,944±0,014b
LB5	1,44±0a	1,302±0,006a	1,51±0,025a	1,194±0,005a	1,181±0,002a	1,090±0,010a	1,028±0,045a
LB5+S10	1,44±0a	1,292±0,032a	1,255±0,011b	1,198±0,017a	1,155±0,008a	1,084±0,008a	0,971±0,014b
LB5	1,44±0a	1,302±0,006a	1,51±0,025a	1,194±0,005a	1,181±0,002a	1,090±0,010a	1,028±0,045a
LB5+S20	1,44±0a	1,284±0,011b	1,277±0,016b	1,275±0,015b	1,204±0,012b	1,085±0,009a	1,066±0,048a
LB5	1,44±0a	1,302±0,006a	1,51±0,025a	1,194±0,005a	1,181±0,002a	1,090±0,010a	1,028±0,045a
LB5+S30	1,44±0a	1,303±0,007a	1,294±0,004b	1,281±0,005b	1,243±0,026b	1,127±0,016b	1,115±0,052b

Tukey: letras iguais significam valores estatisticamente iguais para o mesmo tempo.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana da *S. purpurea* L. contra os micro-organismos Gram-negativos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella dublin* foi investigada a partir do método de difusão do disco, onde a amostra foi colocada nas placas por meio de papel filtro, e considerada como possuidora de atividade antibacteriana aquela que quando aplicada sobre o meio de cultura contendo a suspensão do microrganismo apresentou um halo de inibição, caracterizado por uma zona de clareamento em torno do disco.

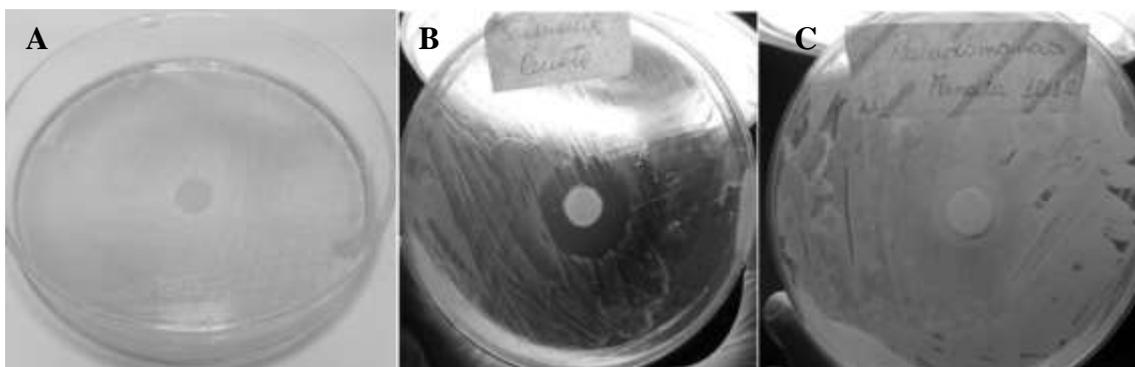
O teste da atividade antimicrobiana foi efetuado para verificar se o extrato bruto possui capacidade de proteção contra o crescimento antimicrobiano, ajudando no combate a crescimento de micro-organismos nas formulações farmacêuticas. A avaliação da sensibilidade aos micro-organismos está descrita na Tabela 18.

Tabela 18: Zona de inibição (mm) dos micro-organismos ao extrato de *Spondias purpurea* L.

Amostra	Micro-organismos Gram-negativos		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. dublin</i>
<i>S. purpurea</i>	-	170	310
Amoxicilina	450	-	490
DMSO	-	-	-

Avaliando a tabela é possível verificar que o extrato bruto de *S. purpurea* demonstrou atividade antimicrobiana para as bactérias Gram negativas *S. dublin* e *P. aeruginosa*, não sendo sensível para cepas de *E. coli*. O DMSO, controle negativo, não possuiu atividade para nenhuma cepa, comprovando que a atividade se deu pelas amostras em avaliação. O controle positivo amoxicilina foi eficaz contra cepas de *E. coli* e *S. dublin*, comprovando a não atividade para *Pseudomonas*. Os halos de inibição são demonstrados na Figura 18.

Figura 18: Resultado dos halos de inibição para o extrato bruto de *S. purpurea* L.*.



*(A) *E. coli*, (B) *S. dublin* e (C) *P. aeruginosa*.

Outra espécie de *Spondias* estudada quanto ao seu potencial antimicrobiano foi a *pinnata* Kurz, muito utilizada popularmente para infecções como bronquites, diarreia e doenças de pele. Keawsa-ard e Liawruangrath (2009) demonstraram que o extrato etanólico bruto desta espécie obteve atividade antimicrobiana elevada contra cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, e baixa atividade contra bactérias Gram-negativas.

Apesar do teste de halo de inibição ser uma ferramenta de triagem de atividade contra micro-organismos, sugere-se que a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de *S. purpurea* pode ocorrer pela existência dos compostos fenólicos caracterizados por esse trabalho, já que, alguns desses compostos possuem a capacidade de inativar enzimas, células de transporte e complexar-se com polissacarídeos (CHACHAGUA; MEDRADO, 2006; RIOS; RECIO, 2005).

5. CONCLUSÃO

O uso de extratos como agentes fotoquimioprotetores contra os danos na pele produzidos pela radiação ultravioleta ganhou atenção considerável com o crescimento de casos de câncer de pele e procura de alternativas sustentáveis. Para utilização de extratos em loções com potencial fotoprotetor, é preciso conhecimento sobre quais princípios ativos estão presentes em sua composição.

O extrato bruto das cascas de *S. purpurea* estudado possui compostos bioativos capazes de absorver os raios UV, como flavonoides quercetina e rutina, o ácido fenólico hidroxicinâmico dicafeoil-diglicose e compostos altamente antioxidantes como os elagitaninos, caracterizados pela técnica de CLAE-ESI-EMⁿ.

A atividade antioxidante, avaliada segundo método do radical DPPH demonstrou alta atividade antirradicalar quando comparada com o padrão de rutina, com EC₅₀ de 27,11 µg/mL, valor baixo quando comparado com outras frutas tropicais, sugerindo que os compostos fenólicos existentes são capazes de proteger contra danos causados pelos ROS.

Os aspectos físico-químicos das formulações contendo extrato bruto de *S. purpurea* L. evidenciou que as loções são potencialmente estáveis. Os testes de centrifugação, pH, espalhabilidade e características organolépticas foram positivos mas requerem estudos mais aprofundados de estabilidade para comprovação da manutenção de suas propriedades originais.

Após análise dos perfis fotoprotetores, verificou-se que o extrato bruto das cascas de *S. purpurea* apresentou alto poder fotoprotetor, entretanto, para ser incorporado em uma emulsão e considerado um protetor contra raios UVA e UVB é preciso uma quantidade elevada de extrato. Dentre as formulações estudadas, a que apresentou melhor desempenho foi a 30%, mas nenhuma interação sinérgica foi verificada quando comparado com o padrão de benzofenona-3.

A avaliação da atividade antimicrobiana sugeriu que o extrato é eficaz contra bactérias Gram negativas *P. aeruginosa*, *S. Dublin*, sendo esta última a mais sensível para o extrato bruto de *S.purpurea*. Não houve atividade contra cepas de *E. coli*.

Este estudo apresentou os primeiros resultados da avaliação fotoprotetora do extrato das cascas de *S. purpurea*, e sugere, após análise do alto perfil antioxidante e fotoprotetor do extrato avaliado, que o mesmo possui potencialidade para combater efeitos deletérios contra ROS, juntamente com sua ação de absorção dos raios UV, por possuir em sua constituição flavonoides e ácidos fenólicos comprovados pela literatura como possíveis antirradicais.

Estudos complementares *in vivo* devem ser realizados para comprovação da suposição e ratificação da atividade fotoprotetora das cascas de *S. purpurea* L., tendo como perspectiva a sua utilização como princípio ativo para formulações fitocosméticas inovadoras.

REFERÊNCIAS

- ABO, K. A. et al. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 494-497, 1999.
- ADIL, M. D. et al. Effect of *Emblica officinalis* (fruit) against UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n.1, p.109-114, 2010.
- AGATI, G. et al. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.72, p.35-45, 2013.
- ALMEIDA, M. M. B et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, n.7, p. 2155-2159, 2011.
- ANGELI, V. W. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nano cápsulas**. 2007, 201p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, UFRS, Rio Grande do Sul. 2007.
- ARAÚJO, T. S; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v.4, n.11, 2008.
- BALOGH, T. S. et al. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 86, n.4, p. 732-742, 2011.
- BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor**. 2011, 267p. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, USP, São Paulo. 2011.
- BARREIRA, J. C. M, et al. Phenolic profiling of *Veronica spp*-grown in mountain, urban and Sandy soil environments. **Food Chemistry**, p. 275–283, 2014.
- BARREIRA, J. C. M. et al. *Bryonia dioica*, *Tamus ommunis* and *Lonicera periclymenum* fruits: characterization in phenolic compounds and incorporation of their extracts in hydrogel formulations for topical application. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.169-176, 2013.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinic Pathology**, v. 45, n.4, p. 493-496, 1966.
- BORA, N. S. et al. Ethno-medicinal claims, phytochemistry and pharmacology of *Spondias pinnata*: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.4, 2014.
- BORELLHA, J. C, et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 31, n.2, 2010.

- BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Centro Científico Conhecer**, v. 7, n. 12, 2011.
- BORGHETTI, G. S. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.4, 2006.
- BRASIL. Aprova o regulamento técnico Mercosul sobre Protetores solares em cosméticos e dá outras providências. **Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012.
- BRASIL. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2004.
- BRITO, H. R. **Caracterização química de óleos essenciais de *Spondias mombin L.*, *Spondias purpurea L.* e *Spondias sp* (cajarana do sertão)**. 2010, 68p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais, UFSG, Patos. 2010.
- CABRAL, L. D. S, et al. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista Científica ITPAC**, v.4, n.3, 2011.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agentes). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.
- CARMARGO, F. B. J. **Estabilidade e eficácia de formulações cosméticas contendo extrato de *Myrtus communis* e um complexo polivitamínico hidratante**. 2010, 177p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.
- CARVALHO, M. R. **Estudos sobre a síntese elargitaninos**. Ribeirão Preto: USP, 2010, 143p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em química, Universidade de São Paulo, 2010.
- CHACHAGUA, V. B. G; MEDRADO, D. E. N. **Determinacion de taninos em corteza y horas de *Tamarindus indica* (Tamarindo), *Terminalia catappa* (Almendro), *Spondias purpurea* (Jacote)**. 2006, 98p. Monografia – Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador. 2006.
- CHEN, L. et al. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal American Academy Dermatology**, v.67, n. 5, 2012.
- CHIARI, B. G. et al. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava L.* fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n. 5, 2012.
- COELHO, L. C. S. **Protetor solar: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da eficácia e segurança**: 2005,110p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2005.

- COENTRÃO, P. A. M. **Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo.** 2005, 109p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em química, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.
- CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua ação composição e atividade antioxidante.** 2008, 104 p. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Bioquímica – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.
- DAL'BELO, S. E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extrato de chá verde e Ginkgo biloba.** 2008, 192 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2008.
- FLOR, J; DAVALOS, M. R; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n. 1, p. 153-158, 2007.
- DETONI, C. B. et al. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n.4, p.913-921, 2012.
- ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in Jacote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557-562, 2012.
- FAHLMAN, B. M; KROL, E. S. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.97, n.3, p.123-131, 2009.
- FIGUEIREDO, S. A. et al. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.131, p. 65-73, 2014.
- FLAMINI, R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. **International Scholarly Research Notices Spectroscopy**, v.2013, 2013.
- BATISTUZZO, J. A. O. et al. **Formulário Médico Farmacêutico.** 2. ed. São Paulo: Tecnopress, 2002.
- GACHET, M. S. et al. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n.1, p. 184-197, 2010.
- GOUVEIA, S; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC-DAD-(-)-ESI-MSn method. **Food Chemistry**, 2011.
- GOMES, R. K; GABRIEL, M. **Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos.** 2ed. São Paulo: Editora Livraria Médica Paulista, 2006.

- GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **Biomed Research International**, v.2013, 2013.
- GUERRA, M. P; NADARI, R. O. 2001. **Biodiversidade: aspectos biológicos geográficos legais e éticos**. In: SIMOES, C. M.O et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre-Florianópolis: Ed. Universidad, p. 13-40, 2001.
- GUPTA, D. UV absorbing properties of some plant derived extracts. **Research Journal of Chemical and Environmental Sciences**, v.1, n. 2, p. 34-36, 2013.
- HAMINIUK, C. W. I., et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science Technology**, v.47, p. 2023-2044, 2012.
- HENGARI, S. et al. The effect of high UV-B dosage on Apple fruit photosystems at different fruit mature stages. **Scientia Horticulturae**, v.170, p.103-144, 2014.
- IGNAT, I; VOLF, I; POPA, V. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.
- IHA, S. M, et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulações cosméticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, jul-set., 2008.
- ISAAC, V. L. B, et al. Protocolo para ensaio físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.
- JARZYCKA, A. et al. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.128, p. 50-57, 2013.
- KEAWSA-ARD, S; LIAWRUANGRATH, B. **Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* Kurz**. In: Pure and applied Chemistry International Conference, 2009.
- KREFT, I. et al. Rutin in buckwheat – protection of plants and its importance for the production of functional food. **Fagopyrum**, v. 20, p. 7-11, 2003.
- KHURY, E; BORGES, E. Protetores Solares. **Especial Dermatologia e Cosmiatria**, v. 68, 2011.
- KULLAVANIJAYA, P. et al. Photoprotection. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 52, n.6, 2005.
- LANGE, M. K. et al. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, v.45, n.1, 2009.
- LEONARDI, G. R. et al. Estudo da variação do pH da pele humana exposta a formulações cosméticas acrescidas ou não de vitaminas A, E ou de ceramidas, por

metodologia não invasiva. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.77, n.5, p. 563-569, 2002.

LIMA, B. N, et al. Avaliação do método de incorporação de filtro solar e vitamina em emulsões. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saude**, v. 11, n. 11, 2010.

LIMA, I. C. G. F. **Seriguela: propriedades físico-químicas e desenvolvimento de geleia de doce de corte e aceitabilidade desses produtos**. 2009, 87 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARTÍNEZ-FLÓRES, S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, 2002.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 44, n. 2, 2008.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S. Fatores Determinantes da Eficácia de Fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 81-87, 2002.

MISHRA, A. K. et al. Assessment of in vitro Sun protection factor of *Calendula Officinalis* L. (Asreraceae) essential oil formulation. **Journal Young Pharmacist**, v. 4, p. 17-21, 2012.

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

NASCIMENTO, L. F. et al. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisas, Inovação e a importância da síntese orgânica. **Revista Virtual Química**, v. 6, n. 2, 2014.

NISHIKAWA, D. O. et al. Estabilidade e eficácia de fitoprotetores contendo filtros inorgânicos e quercetina. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v.10, p.91-100, 2013.

OLIVEIRA, R. G. J; ALMEIDA, J. R. G. S. Prospecção tecnológica de fotoprotetores derivados de produtos naturais. **Revista GEINTEC**, v. 3, n.1, p.32-40, 2012.

OLIVEIRA, J. R. S. **Caracterização de extratos de Cajá-manga (*Spondias dulcis* Parkinson) potencialmente ativos e seguros para obtenção de fitocosmético antioxidante**. 2011, 182p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Araraquara. 2011.

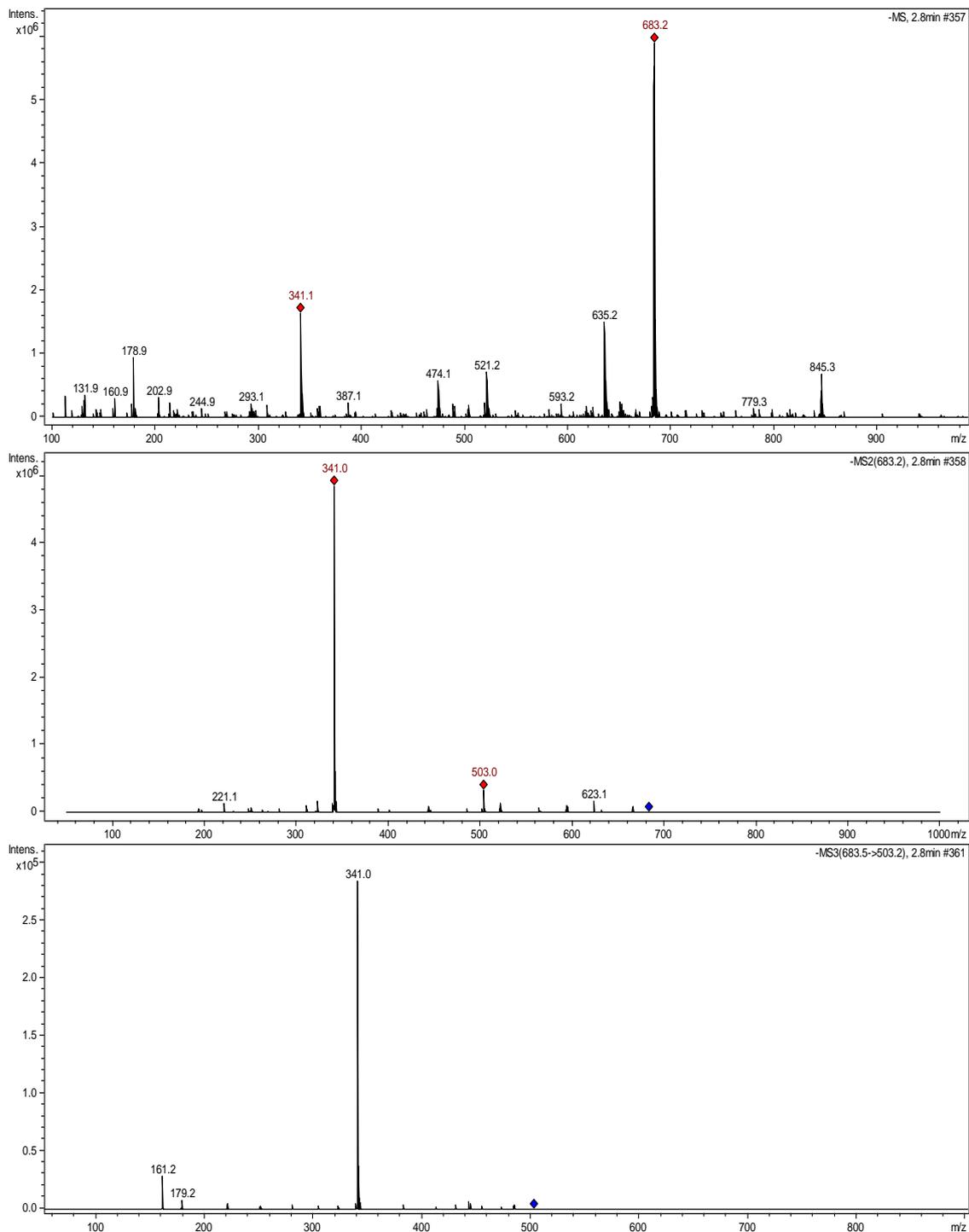
OMENA, C. M. B. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 49, p. 334-344, 2012.

- ORALLO, F. Comparative studies of the antioxidant effects os *cis*- and *trans*-resveratrol. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n. 1, p. 87-98, 2008.
- PRASAD, N. R. et al. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.95, n.3, p. 196-203, 2009.
- REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. 2010, 118p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química, UFBA, Salvador. 2010.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. Pharmabooks, 2006.
- RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais**. 2004, 104 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.
- RIOS, J. L; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacvology**, v.100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.
- ROBARDS, K; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review. **Analyst**, v.122, p.11R-34R, 1997.
- ROMANI, A. et al. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, v.130, n.1, p. 214-221, 2012.
- ROSÁRIO, M. S. **Fotoprotetores: formulações presentes no mercado**. Feira de Santana: UEFS, 2008, 88p. Monografia – Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.
- SAEWAN, N; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, n. 09, p.129-141, 2013.
- SAIJA, A. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluations of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, n.1, p.39-47, 2000.
- SARAF, S; KAUR, C. D. Development of photoprotective creams with antioxidant polyphenolic herbal extracts. **Research Journal of Medicinal Plant**, v.6, n.1, 2011.
- SAVIAN, A. L. et al. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsões não-iônicas O/A contendo óleo de café verde como potencializador do fator de proteção solar. **Revista Brasileira Farmacologia**, v.91, n.2, p. 82-88, 2011.
- SILVA, B. C. A; CASTRO, M. S. **Avaliação da estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo extrato de *Vaccinium uligosum***. Monografia – São Paulo, Faculdade de Pindamonhangaba, 2013.

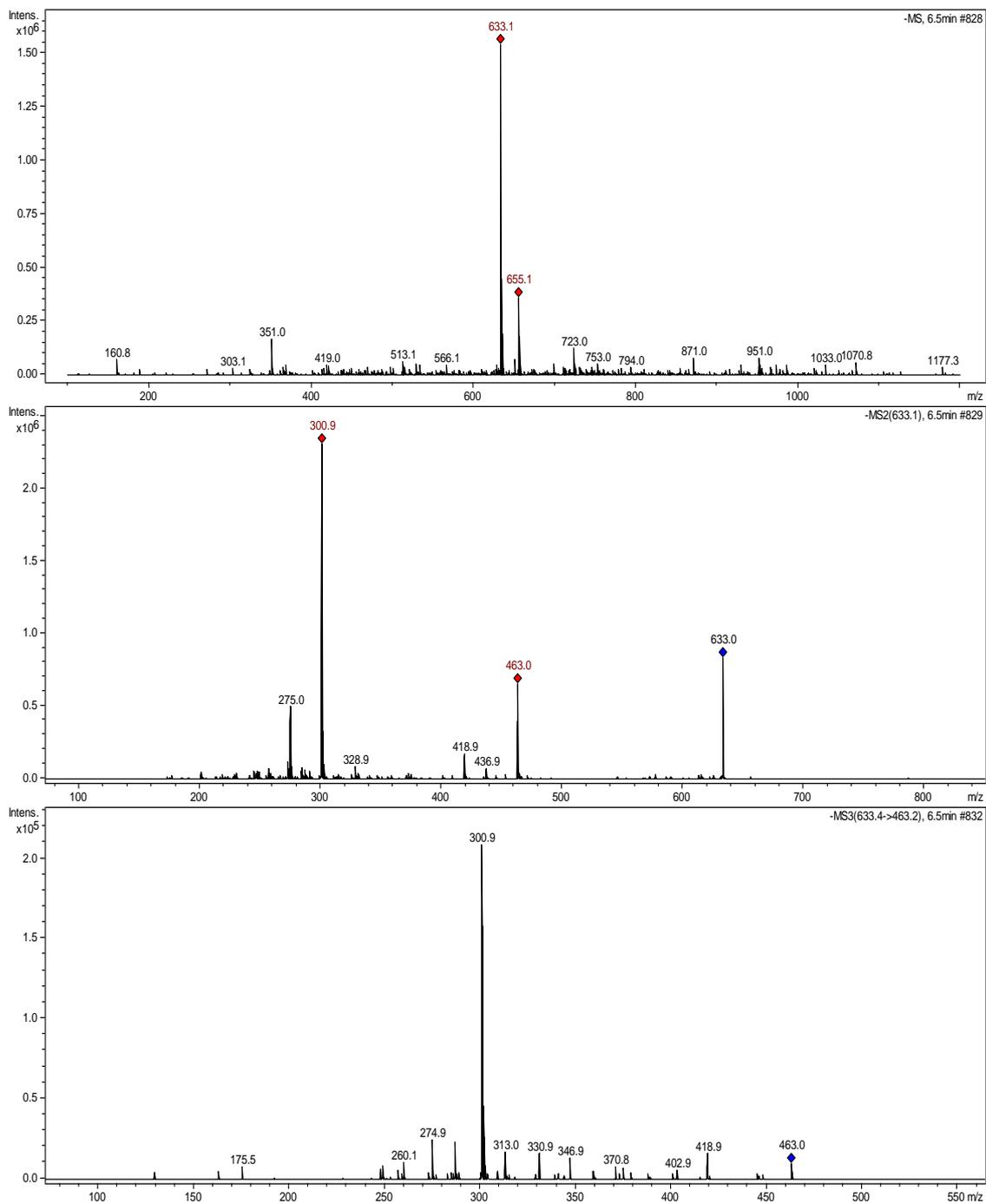
- SILVA, Q. J. **Caracterização de frutos de genótipos de ciriguela (*Spondias purpurea* L.** 2011, 107p. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em ciências e tecnologia dos alimentos, Universidade Estadual Rural de Pernambuco, Recife. 2011.
- SILVA, Q. J. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de ciriguela (*Spondias purpurea* L.). **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 23, n. 1, p. h73-80, jan./mar. 2012.
- a SILVA, G. A. et al. Gênero *Spondias*: aspecto botânico, composição química e potencial farmacológico. **Biofarm**, v. 10, n. 1, 2014
- b SILVA, M. A. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.133, p. 47-54, 2014.
- SINGLETON, V. L; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SOLOVCHENKO, A; SCHMITS, M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in Apple fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1977-1984, 2003.
- SOUSA, M. S. B; VIEIRA, L. M. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal Food Technology**, v.14, n.3, p. 202-210, 2011.
- SOUZA, F. P. et al. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.13, n. 1, p. 69-77, 2013.
- SVOBODOVÁ, A. et al. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage - A review. **Biomedical Papers**, v.147, n. 2, p.137-145, 2003.
- TIBERT, L. A. et al. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.18, n. 1, p.100-105, 2007.
- TIBURSKI, J. H. et al. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v.44, p. 2325-2331, 2011.
- VANZIN, S. B; CAMARGO, C. P. **Entendendo Cosmecêuticos: diagnósticos e tratamentos**. Editora Santos: São Paulo, 2008.
- 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.
- VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 452-457, 2009.

ANEXOS

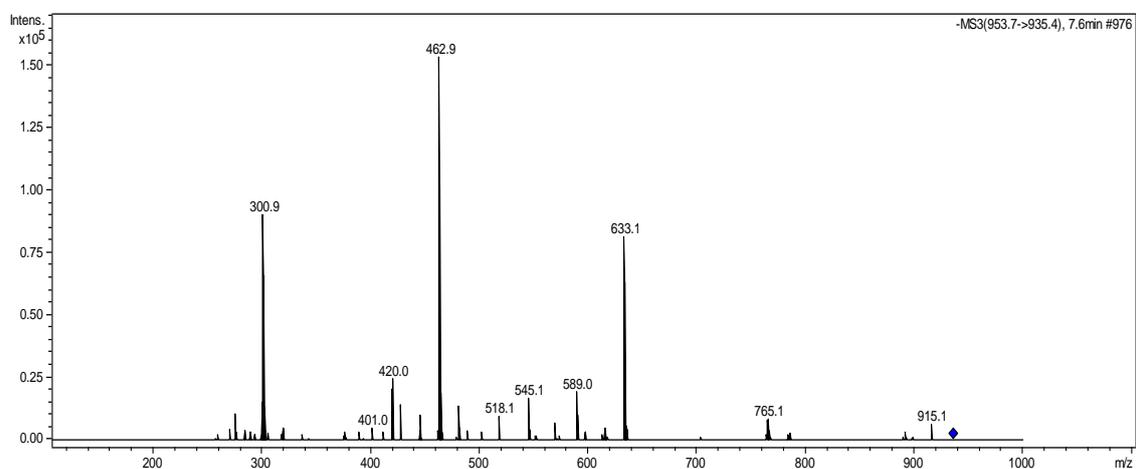
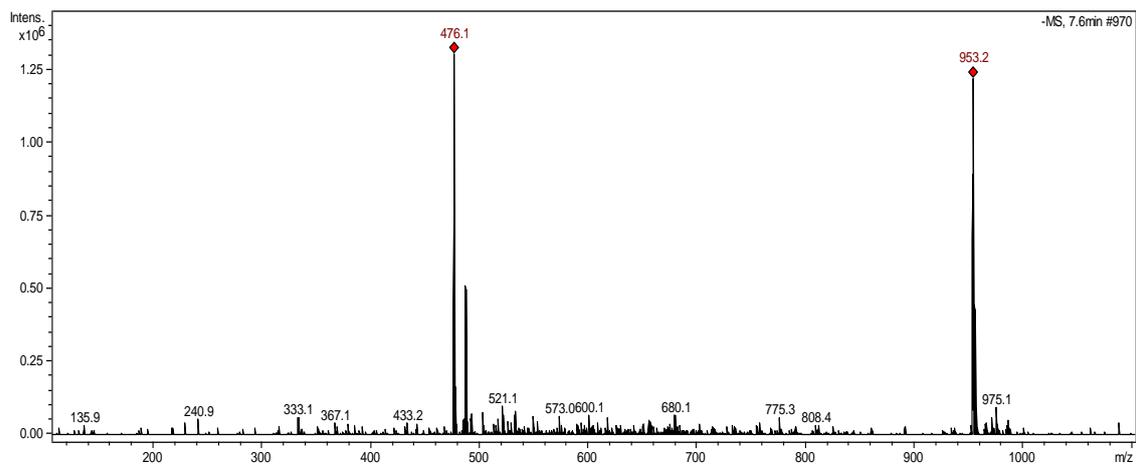
ANEXO I - Espectros de massas do modo negativo para os picos com tempo de retenção 2,8 minutos.



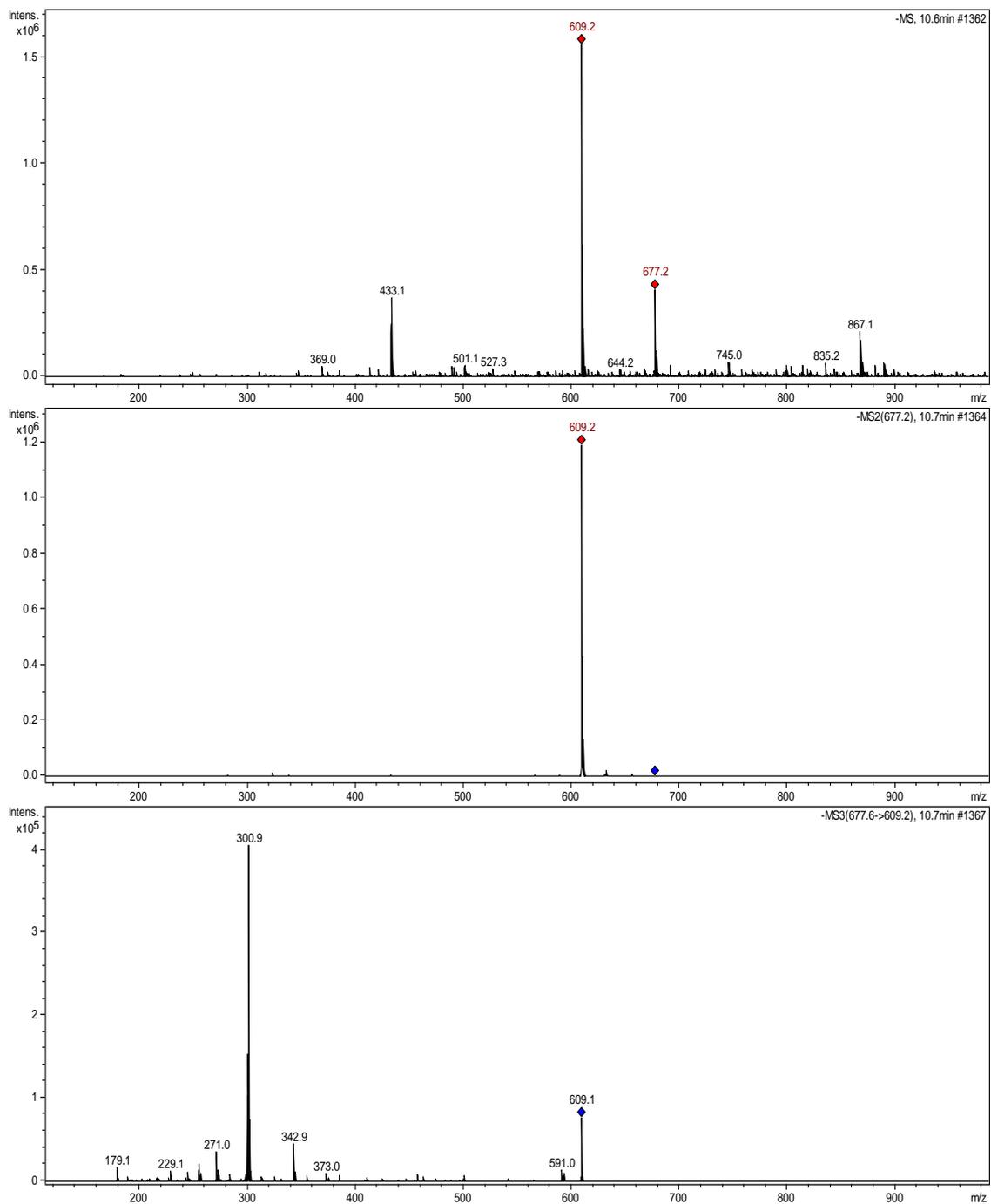
ANEXO II - Espectros de massas do modo negativo para os picos com tempo de retenção 6,5 minutos.



ANEXO III - Espectros de massas do modo negativo para os picos com tempo de retenção 7,6 minutos.



ANEXO IV - Espectros de massas do modo negativo para os picos com tempo de retenção 10,6 minutos.



ANEXO V - Espectros de massas do modo negativo para os picos com tempo de retenção 11,6 minutos.

