

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FORMULAÇÃO
FOTOPROTETORA A BASE DE PRODUTOS NATURAIS**

Melisha Stephanie dos Santos Tavares do Nascimento

Campo Grande – MS

2014

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FORMULAÇÃO
FOTOPROTETORA A BASE DE PRODUTOS NATURAIS**

Melisha Stephanie dos Santos Tavares do Nascimento

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul Como requisito final
para obtenção do Título de Mestre
em Farmácia

Orientador Prof Dr Patrik Oening Rodrigues

Campo Grande – MS
2014

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, que estiveram ao meu lado e me deram todo o apoio desde a primeira vez que sonhei com essa conquista.

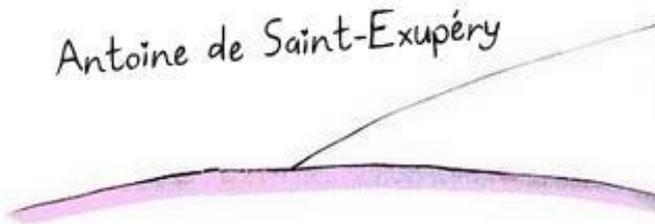
Ao meu Senhor Jesus, toda a honra e glória, tudo é possível graças ao amor Dele em minha vida.

Ao meu esposo e amigo Alisson de Jesus do Nascimento, aos meus pais Gilberto Tavares Flor e Mercedes Fernandes dos Santos Tavares e aos meus irmãos Michel Tavares e Gilberto Tavares Flor Filho, que caminharam ao meu lado e me incentivaram a chegar até aqui.



Disse a flor para
o, pequeno príncipe:
É preciso que eu suporte
duas ou três larvas
se quiser conhecer
as borboletas.

Antoine de Saint-Exupéry



Agradecimentos

- Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela graça e misericórdia diária e amor imerecido. Sem Ele na minha vida, sei que nunca chegaria a lugar nenhum. Obrigada meu Deus.
- Agradeço aos meus pais, por todo investimento e pela educação que recebi de vocês. Sem o amor e incentivo que me deram, eu não chegaria até aqui. Vocês são meu exemplo. Esta conquista é de vocês!
- Agradeço ao meu esposo Alisson, que nunca deixou de acreditar nos meus sonhos e se dedicou a este trabalho tanto quanto eu, sabendo suportar minha ausência no tempo de estudo e me apoiar a chegar até o fim. Muito obrigada meu amor.
- Agradeço aos meus irmãos Michel e Beto, que valorizaram meu esforço e sempre acreditaram que isso seria possível, às vezes até mais do que eu.
- Agradeço a todos meus familiares que direta e indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.
- Agradeço a todos os meus amigos e também aos meus pastores William e Tânia Salgado, pelo carinho, apoio e investimento em minha vida.
- Agradeço ao Prof Patrik Oening Rodrigues, pela orientação, dedicação e ensinamentos proporcionados a mim neste trabalho.
- Agradeço à amiga e Professora Patrícia Figueiredo pela orientação, pela dedicação ao meu trabalho, pelas ideias, pelo auxílio no laboratório, pelo investimento e o tempo dedicado. Serei eternamente grata por tudo que você fez.
- Agradeço à amiga Elda Regina Leite Galvão, que gentilmente cedeu sua fazenda pra que eu coletasse as amostras deste estudo.
- Agradeço à amiga e técnica Rúbia A. Sversut, pelo auxílio nas atividades laboratoriais e principalmente pela amizade e companheirismo desde a graduação. A sua ajuda, seus conselhos e sua disponibilidade fizeram toda a diferença pra que eu chegasse até aqui. Muito obrigada amiga, serei eternamente grata por tudo.
- Agradeço ao técnico Vanderlei Paes pelo auxílio, projeto e construção da câmara ultravioleta usada neste projeto. Muito obrigada pela disponibilidade em me ajudar.

- Agradeço as amigas Cibele Benetti, Cláudia Diniz e Nayara Locatelli, que estando perto ou longe, sempre me aconselharam e me incentivaram a não desistir deste sonho.
- Agradeço ao Prof Samuel de Oliveira do Instituto de Física da UFMS, pela disponibilidade em mensurar o espectro da câmara ultravioleta montada.
- Agradeço a Prof Mônica Kadri, pelo auxílio no delineamento experimental do ensaio com animais.
- Agradeço a Prof Marilene Chang e a técnica Fernanda Sposito, pela disponibilidade e auxílio nos ensaios de controle de qualidade microbiológico.
- Agradeço aos professores do LTF Nájla M. Kassab, Teófilo F.M. Cardoso e Aline Carollo, pelo auxílio e colaboração nesta pesquisa.
- Agradeço as alunas de graduação Natane Cavalcante, Jéssica Ribeiro, Soraya Akieda, Juliana Alvarenga e Stephanie Villaescusa, pelo auxílio na realização das análises experimentais deste trabalho.
- Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFMS pela oportunidade concedida.
- A todos que contribuíram com apoio, carinho e incentivo para a realização deste sonho...

Muito obrigada

Sumário

Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	05
3. Revisão da Literatura.....	06
3.1 Pele, radiação solar e danos cutâneos	06
3.2 Fotoproteção.....	08
3.4 Uso de antioxidantes e flavonoides em formulações fotoprotetoras.....	12
3.5 Cerrado e espécies nativas.....	14
4. Referências bibliográficas.....	19
5. Artigo.....	28
5.1 Apresentação do artigo.....	28
Investigation of the photoprotective potential of native extracts from Cerrado.....	29
6. Anexos.....	49
6.1 Testes de controle de qualidade físico-químico e microbiológico.....	49
6.2 Construção da câmara de simulação de radiação ultravioleta.....	51
6.3 Determinação do FPS in vivo – fotos.....	53
6.4 Certificado da Comissão de ética no uso de animais.....	54

Resumo

A radiação ultravioleta é um dos principais fatores causadores de danos cutâneos. O uso de produtos que bloqueiam esta radiação, pode efetivamente minimizar lesões e prevenir o desenvolvimento de câncer de pele, queimaduras e envelhecimento cutâneo. Substâncias antioxidantes e também da classe dos flavonoides têm sido estudadas como alternativa para incrementar a fotoproteção. Após revisão bibliográfica de espécies nativas do Cerrado que apresentavam relatos de presença destes compostos, foram selecionadas para estudo: *Annona crassiflora* Mart., *Caryocar brasiliense* Camb., *Campomanesia adamantium* e *Vytex cymosa* Bert. Foram produzidos extratos etanólicos concentrados destas espécies e realizados testes iniciais para determinar o potencial fotoprotetor (determinação do comprimento de onda de máxima absorção na região ultravioleta, o teor de flavonoides totais (TFT) e a atividade antioxidante frente ao radical DPPH), sendo escolhidas duas espécies, a *Annona crassiflora* e o *Caryocar brasiliense*. Com estas foi realizado um estudo químico direcionado para a identificação de flavonoides e avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* por método espectrofotométrico. Ambos os extratos foram incorporados em formulações cosméticas e realizados os testes de: determinação do FPS *in vitro* e *in vivo*, toxicidade dérmica aguda e controle de qualidade físico-químico e microbiológico. Para o ensaio de determinação do FPS *in vivo*, foi construída uma câmara de simulação da radiação solar. No extrato de *Annona crassiflora* foi identificado o flavonoide glicosilado guaijaverina e o FPS *in vitro* deste extrato foi de $10,66 \pm 0,94$. Após incorporação na formulação o FPS *in vitro* foi de $0,21 \pm 0,02$ e *in vivo* de 1,5. No extrato de *Caryocar brasiliense* foram detectados flavonoides com esqueleto característico do tipo flavonol ou flavona e o FPS *in vitro* foi de $22,21 \pm 0,07$. Após incorporação na formulação o FPS *in vitro* foi de $0,22 \pm 0,04$ e *in vivo* de 2,0. Nenhuma das formulações testadas apresentou toxicidade dérmica aguda e foram consideradas estáveis nos ensaios físico-químicos e microbiológicos. A câmara de simulação da radiação foi eficaz em ocasionar o eritema na pele dos animais, possibilitando a padronização de ensaio em modelo animal para determinação do FPS. Os extratos estudados apresentaram constituintes químicos e FPS *in vitro* desejáveis a produtos fotoprotetores e o incremento do fator de proteção solar observado *in vivo*, sugere que estes extratos podem apresentar maior eficácia fotoprotetora frente à radiação UVA.

Palavras-chave: flavonoides, fotoproteção, Cerrado.

Abstract

Ultraviolet radiation is one of the main factors causing skin damage. Use of drugs that block this radiation, can effectively minimize injuries and prevent the development of skin cancer, sunburn and skin aging. Antioxidant substances and also of the class of flavonoids have been studied as an alternative for increasing the photoprotection. After a brief literature review of native Cerrado species that had reported the presence of these compounds were selected for study: *Annona crassiflora* Mart, *Caryocar brasiliense* Camb, *Campomanesia adamantium* and *Vytex cymosa* Bert. Concentrated ethanol extracts of these species were produced and initial tests performed to determine the potential sunscreens (determining the wavelength of maximum absorption in the ultraviolet region, the content of total flavonoids (TFT) and the antioxidant activity against DPPH), being chosen two species, *Annona crassiflora* and the *Caryocar brasiliense*, that were selected for a chemical study aimed at identification of flavonoids and evaluation of Sun Protection Factor (SPF) *in vitro* by spectrophotometric method. Both extracts are incorporated in cosmetic formulations and tests performed: determining the SPF *in vitro* and *in vivo*, acute dermal toxicity and physical-chemical and microbiological control quality. For the test of the FPS *in vivo*, we constructed a simulation chamber of solar radiation. In the *Annona crassiflora* extract the glycosylated flavonoid guaijaverin was identified and the SPF *in vitro* this extract was 10.66 ± 0.94 . After incorporation into the formulation *in vitro* SPF was 0.21 ± 0.02 and 1.5 *in vivo*. In *Caryocar brasiliense* extract flavonoid skeleton with characteristic flavonol or flavone type and were detected the SPF *in vitro* was 22.21 ± 0.07 . After incorporation into the formulation *in vitro* SPF was 0.22 ± 0.04 and *in vivo* 2.0. None of the formulations tested had acute dermal toxicity and were considered stable in the physical-chemical and microbiological tests. The simulation chamber radiation was effective in causing erythema on the skin of animals, enabling the standardization of testing in an animal model to determine the SPF. The extracts studied (EAC and ECB) had chemical constituents and *in vitro* SPF sunscreen products and desirable to increase the sun protection factor observed *in vivo* assay suggests that these extracts may be more sunscreen efficacy against UVA radiation.

Key-words: flavonoids, photoprotection, Cerrado.

1. Introdução

A indústria cosmecêutica obteve crescimento vertiginoso nos últimos anos devido ao desenvolvimento de formulações de notável avanço tecnológico e pela utilização de matérias-primas naturais em detrimento aos ativos sintéticos. Parte dos consumidores de cosméticos a base de produtos naturais entende que estes produtos têm efeitos sobre a pele e sobre todo o organismo, trazendo um equilíbrio saudável, e consideram-nos como produtos que não agridem a saúde e nem ao meio ambiente (1).

De maneira global, o mercado para produtos naturais segue em avanço notável, levando pesquisadores a buscarem produtos naturais de alta qualidade e atividade e que tragam multiplicidade de benefícios, no intuito de substituir ou compor os produtos sintéticos existentes no mercado (2). Os fotoprotetores estão entre os vários produtos cosméticos sob avaliação científica para incorporação de matérias-primas naturais.

A fotoproteção consiste no bloqueio da radiação ultravioleta a qual a pele está exposta. Esta radiação é a principal responsável pelos fotodanos cutâneos, e pode ser subdividida em três regiões: UVC (100-280nm) que é absorvida pela camada de ozônio; UVB (280-320nm) que é a radiação de maior energia entre as que chegam à Terra, e que tem maior absorção pela epiderme, sendo responsável pelos eritemas e queimaduras cutâneas; e UVA (320-400), radiação de comprimento de onda mais longo que penetra a pele atingindo a derme, gerando radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROS), que favorecem o envelhecimento cutâneo e a mutação gênica (3).

Produtos capazes de bloquear estas radiações podem efetivamente minimizar fotolesões e prevenir o desenvolvimento de câncer de pele e envelhecimento cutâneo precoce (4). Os protetores solares são formados frequentemente pela mistura de filtros físicos e filtros químicos, classificação esta baseada no mecanismo de ação destes compostos.

Os filtros físicos (substâncias inorgânicas) agem por reflexão da radiação, sendo os mais utilizados: dióxido de titânio (que atua sobre a radiação UVB) e óxido de zinco (que atua sobre a radiação UVA). O inconveniente destes agentes é o aspecto estético desagradável provocado na pele dos pacientes (5).

Os filtros químicos (substâncias orgânicas) absorvem a radiação e a liberam na forma de energia térmica ou fluorescência, através do mecanismo denominado ressonância (6). Os ativos mais comuns desta classe são o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), os cinamatos, salicilatos e as benzofenonas. Merece destaque, a utilização das benzofenonas devido à sua absorção na região do UVA/UVB e a tolerância cutânea (5).

A fotoproteção pode ocorrer de forma passiva e/ou ativa. A proteção passiva consiste nos mecanismos de reflexão ou absorção da radiação, que são exercidos pelos filtros físicos e químicos. A proteção ativa ocorre quando substâncias como os antioxidantes que inibem EROS ou RL gerados a partir da radiação ultravioleta que tenha ultrapassado a proteção dos filtros físicos ou químicos (7). Neste sentido, a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais, ou ainda de extratos vegetais com esta atividade, a fotoprotetores é de fundamental importância.

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável inibem ou retardam a sua oxidação. Produtos naturais que exerçam esta atividade têm sido usados puros ou em associação a antioxidantes sintéticos (8). Também é crescente o desenvolvimento de protetores solares superiores aos de décadas passadas devido à maior proteção UVA e incorporação de novos ativos como as vitaminas C e E que agem como antioxidantes (7).

Os constituintes fenólicos e os flavonoides possuem ação fotoprotetora e antioxidante (9), sendo esta atividade resultante da sua estrutura química e propriedades redutoras, onde agem neutralizando ou sequestrando radicais livres e quelando metais de transição, inibindo a etapa de iniciação e/ou propagação da oxidação (10). Este efeito é importante no combate aos danos causados pelas radiações ultravioletas.

Matérias-primas vegetais que apresentam estes constituintes têm sido investigadas no intuito de incrementar os benefícios de produtos cosméticos, dentre eles os fotoprotetores. Neste contexto, o Brasil é um país de ampla biodiversidade em seu território, sendo a Amazônia uma região bastante explorada com diferentes espécies nativas utilizadas como matérias-primas: óleos de andiroba, de buriti, de copaíba; e manteigas de cupuaçu e muru-muru (1).

O Cerrado é o 2º maior bioma do país, possuindo muitos tipos fisionômicos de vegetação, conferindo-lhe uma alta biodiversidade, ainda em grande parte inexplorada

(11). Estudos indicam a presença de substâncias de interesse químico e tecnológico neste bioma como compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas (12; 13), carotenoides e óleos essenciais (14; 15; 16).

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre as espécies nativas quanto à utilização de novas matérias primas para fotoproteção, foi realizada breve revisão bibliográfica em artigos publicados a fim de selecionar espécies que apresentassem em sua composição flavonoides e/ou compostos fenólicos e apresentassem atividade antioxidante. Dentre as espécies regionais que apresentam estes constituintes e foram escolhidas para estudo podemos citar: *Annona crassiflora* Mart., *Campomanesia adamantium*, *Caryocar brasiliense* Camb., e *Vytex cymosa* Bert.

A *Annona crassiflora* Mart., de nome popular araticum, é uma espécie frutífera da família Annonaceae, encontrada frequentemente no Cerrado (17). É uma árvore de tronco ereto e ramos tortuosos, de casca corticosa e suberosa, atingindo até 10 metros de altura. Possui frutos grandes, de até 1,0 kg com numerosas sementes (18). Extratos etanólicos da casca do e da semente do fruto do araticum demonstraram atividade antioxidante *in vivo* que pode ser mediada por compostos como ácido caféico, ácido ascórbico, ácido quínico, ácido ferrúlico, xantofilinas, entre outros presentes na espécie (12).

A *Campomanesia adamantium*, conhecida como guavira ou gabiroba, é uma espécie arbustiva, da família Myrtaceae, que apresenta frutos pequenos e ovais, de coloração verde claro e aroma cítrico. Na medicina popular, as folhas e frutos são relatados por apresentarem propriedades anti-inflamatórias, anti-diarreicas e antissépticas das vias urinárias (19).

Os frutos de tarumã, espécie *Vytex cymosa* Bert., são relatados por possuírem atividade antioxidante *in vitro* devido a presença de constituintes fenólicos (10). O *Caryocar brasiliense* Camb., conhecido popularmente como pequi, é uma espécie arbustiva, com frutos de polpa amarelada rica em óleo. Possui de duas a quatro sementes com espinhos. Ocorre em todo o Cerrado brasileiro e também no Nordeste, e sua frutificação dá-se entre os meses de janeiro e março (20). Este fruto, apresenta compostos fenólicos, carotenoides e vitamina C, com boa atividade antioxidante (21).

Na comunidade acadêmica, diferentes trabalhos que incorporam extratos vegetais em formulações cosméticas têm sido realizados, contudo o conhecimento científico sobre espécies nativas do Cerrado e a sua aplicabilidade quanto à fotoproteção ainda é escasso. Sendo assim, o presente trabalho visa ampliar a gama de informações sobre a flora regional e valorizar as espécies deste bioma, uma vez que objetiva a identificação do potencial de extratos de plantas nativas tocante à fotoproteção.

2. Objetivo Geral

- Desenvolver e avaliar uma formulação fotoprotetora a partir da prospecção de espécies nativas do Cerrado.

2.1 Objetivos específicos

- Preparar extratos etanólicos concentrados das folhas das espécies selecionadas na revisão bibliográfica;
- Determinar o comprimento de onda máximo de absorção na região ultravioleta dos extratos etanólicos concentrados;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos concentrados;
- Determinar o teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos concentrados;
- Selecionar o(s) extrato(s) com maior potencial de atividade fotoprotetora e antioxidante;
- Realizar estudo químico direcionado a identificação de flavonoides dos extratos etanólicos concentrados com maior potencial fotoprotetor;
- Produzir formulações fotoprotetoras incorporadas do extrato;
- Realizar o controle de qualidade físico-químico e microbiológico das formulações incorporadas dos extratos;
- Construir uma câmara de simulação da radiação ultravioleta;
- Determinar a atividade fotoprotetora *in vitro* e *in vivo* das formulações produzidas;

3. Revisão da Literatura

3.1 Pele, radiação solar e danos cutâneos

A pele é um órgão do corpo humano que faz a interface entre o organismo e o ambiente externo. Devido a sua resistência física, exerce a função protetora do organismo contra agressões mecânicas e térmicas e também contra patógenos. Por sua constituição química, tem função termorreguladora, controla a homeostasia de líquidos e minerais e possui papel metabólico ao atuar na síntese de vitamina D (22).

Este órgão é formado por uma tripla camada tecidual: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a porção superficial, fina e estratificada, sendo formada por uma região chamada epiderme viável, com células metabolicamente ativas, os queratinócitos, que se organizam em camadas: basal, espinhosa e granulosa, e o estrato córneo, que corresponde às células mortas queratinizadas (23). A renovação epidérmica consiste no processo permanente e repetido de células da camada basal que atingem o estrato córneo. Além dos queratinócitos, outras células presentes neste extrato, são os melanócitos, células responsáveis pela cor da pele, que sintetizam a melanina, substância e que é progressivamente transmitida aos queratinócitos e que pode absorver parte da energia transmitida pelo sol.

A derme, tecido localizado abaixo da epiderme dá a consistência física da pele. Ela é formada por tecido conjuntivo denso, sendo rica em fibras colágenas e de elastina formadas pelos fibroblastos presentes. É subdividida em derme papilar, rica em finas fibras colágenas orientadas aleatoriamente; e derme reticular, rica em fibras de elastina (22; 23). Possui vasos sanguíneos e linfáticos que garantem sua nutrição e também fibras nervosas que fazem a interação com o ambiente. A região da hipoderme corresponde a uma camada de tecido conjuntivo frouxo, que faz a ligação com os órgãos subjacentes.

A pele tem contato direto e constante com a energia transmitida pelo sol, chamada de espectro solar terrestre. Os raios solares são responsáveis por alguns efeitos benéficos ao organismo, como: a síntese de vitamina D₃(colecalciferol) que é responsável pela fixação de cálcio nos ossos, ação fungicida e bactericida, além da sensação de bem-estar (24). Entre os efeitos nocivos aos indivíduos, a curto e médio prazos, encontram-se: a perda de água e o ressecamento da pele, provocando aspecto

opaco, perda da elasticidade, eritema (vermelhidão), edema, descamação e manchas (25).

Do espectro solar terrestre, apenas 7% atinge a superfície da Terra e aproximadamente 93% são retidos pela atmosfera. Ele é composto por diferentes radiações, aproximadamente 5% de ultravioleta (UV – cujo comprimento de onda é entre 280-400nm), 45% de luz visível (VIS – cujo comprimento de onda é entre 400-800nm) e 50% de infravermelho (IV – radiação cujo comprimento de onda é acima de 800 nm) (26).

Dentre estas radiações, o espectro de radiação ultravioleta que atinge a Terra é subdividido em região UVC (200-280 nm) que não alcança a superfície terrestre, pois é absorvida pela camada de ozônio, região UVB (280-320 nm) e região UVA (320-400 nm). A radiação UVA é a radiação de maior comprimento de onda no espectro ultravioleta, porém de menor energia, já a radiação ultravioleta C, é a radiação de menor comprimento de onda e maior energia (26).

A penetração desta energia na pele é mediada por uma combinação de difusão e absorção, sendo que na epiderme a absorção é o processo dominante. Os comprimentos de onda inferiores a 300nm ocorre forte absorção por parte de proteínas, melanina, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano), RNA e DNA. Em comprimentos de onda entre 320 e 1200nm a absorção é mediada pela melanina cutânea. Na derme, o processo é mediado pela dispersão causada pelas fibras colágenas (27). Na molécula de DNA, os danos atingem as pirimidinas, que sofrem modificações fotoquímicas resultando em dímeros de ciclobutano e demais subprodutos que são reparados, fisiologicamente por enzimas específicas. O sistema de reparo formado por enzimas como ABC excinuclease, DNA polimerase I e DNA ligase, é eficaz, porém o excesso de exposição solar pode tornar a reparação menos eficiente (28).

O envelhecimento cutâneo é um processo altamente complexo devido à acumulação de diferentes substâncias nas células e tecidos, desencadeado por fatores intrínsecos, como geração de radicais livres e alterações hormonais; e extrínsecos, como a exposição a radiação ultravioleta (principal agente), exposição ao tabaco, a radiação infravermelha e a desnutrição (29).

Para prevenção e terapia contra o envelhecimento cutâneo diversos métodos podem ser utilizados como: fotoprotetores para prevenir os danos induzidos pela

radiação ultravioleta, compostos antioxidantes como vitaminas, coenzima Q10 e polifenóis, que podem ser usados por via tópica ou oral, ácido eicosapentaenoico (EPA), retinoides, hormônios, enzimas de reparo ao DNA, DNA-oligonucleotídeos e forskolin, um diterpeno com atividade similar a enzimática (29).

Há evidências de que algumas substâncias administradas por via oral como os carotenoides, o extrato de *Polypodium leucotomus*, alguns flavonoides, cafeína, ácido eicosapentaenoico e combinação de antioxidantes, exercem um efeito preventivo contra os danos induzidos pelos raios UV sem efeitos adversos. Os mecanismos de ação são muito variados, afetando as diversas vias de sinalização resultando em atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomodulatória (30).

3.2 Fotoproteção

A função primária de um produto filtro solar é proteger a pele contra os efeitos nocivos da energia solar. Para fornecer essa proteção, os produtos contêm ingredientes ativos capazes de absorver, refletir ou dispersar a radiação UV que é incidente sobre a pele, interceptando-a antes que possa penetrar na pele e causar danos (31).

A proteção contra os fótons de alta energia da radiação UVB é necessária para evitar o eritema e as queimaduras solares. O fotoenvelhecimento, por outro lado, é causado principalmente pela radiação de baixa energia UVA. Assim, os novos filtros solares são produtos que têm procurado prevenir, combater e até mesmo reparar danos na pele induzido por radiações ultravioletas (32).

A proteção contra ambos os tipos de radiação é considerada de fundamental importância na prevenção ao câncer de pele. No Brasil, que possui elevada incidência de raios ultravioletas, o câncer de pele do tipo não-melanoma é o mais incidente. O melanoma, que representa 5% de todos os tipos de câncer de pele, apresenta uma elevada letalidade devido à capacidade de gerar metástases (33).

Filtros solares podem ser divididos em dois tipos: filtros químicos (orgânicos) ou físicos (inorgânicos). Os filtros químicos podem ser subdivididos em filtros-UVA (absorvendo apenas radiação UVA), filtros-UVB (absorvendo apenas radiação UVB) e

filtros de amplo espectro (absorvem radiação UVA e UVB). Os filtros físicos disponíveis também são classificados como filtros de amplo espectro (34).

Os filtros orgânicos são moléculas que interferem na radiação incidente pelo mecanismo de absorção, pois o filtro atua como um cromóforo ao absorver um fóton de energia e evoluir para um estado excitado. Ao retornar para o estado não excitado, ocorre liberação de energia num comprimento de onda mais longo, na região do visível ou infravermelho. Esse processo pode repetir-se várias vezes num fenômeno de ressonância (6). Os filtros físicos ou inorgânicos são representados por dois óxidos ZnO e TiO₂. Estes formam um filme opaco sobre a pele e têm a capacidade de refletir ou espalhar a radiação UV (35).

Para que a ação do protetor solar seja completa é ideal que este forme um filme uniforme sobre a superfície da pele. O relevo cutâneo é bastante irregular formado por picos e vales, portanto, torna-se um trabalho difícil revestir a pele de forma homogênea e este é um fator crucial para alcançar uma proteção efetiva. A dosagem estabelecida para a eficácia fotoprotetora é de 2 mg/cm² (31).

Os primeiros estudos para mensurar a eficácia fotoprotetora tiveram início entre 1940 e 1950. Estes trabalhos levaram aos conceitos de dose eritematosa mínima (DEM) e fator de proteção solar (FPS). A Dose Eritematosa Mínima (DEM) é definida como a menor dose de raios ultravioleta (UV), ou seja o menor tempo de exposição (em minutos), que produz o primeiro eritema perceptível inequívoco com fronteiras definidas aparecendo sobre a maior parte do campo de exposição à radiação UV, de 16 a 24 horas após a exposição à radiação UV (36).

A DEM na pele desprotegida é referida como 'DEMnp' e DEM na pele protegida é referido como 'DEMp'. O valor individual do Fator de Proteção Solar de um produto é definido como a razão entre a DEM na pele protegida sobre a DEM na pele não protegida (36).

$$\text{FPS} = \text{DEMp} / \text{DEMnp}$$

Apesar dos filtros solares serem utilizados desde 1930, somente em 2002 foi assinado o primeiro acordo para padronização da metodologia que avalia a eficácia fotoprotetora, que é o método *in vivo* do FPS (36).

A classificação da cor da pele de um indivíduo pode ser feita pela classificação dos fototipos cutâneos de Fitzpatrick. Os fototipos referem-se à cor da pele que pode ser classificada de forma constitutiva (determinada por fatores genéticos) ou facultativa (determinada pela exposição ao sol, envelhecimento e hormônios). É uma classificação empírica a partir da capacidade de cada pessoa de se bronzear e sua sensibilidade e tendência a ficar vermelha. São seis fototipos: I – Branca, sempre queima e nunca bronzeia (Muito sensível ao Sol); II – Branca, sempre queima e bronzeia muito pouco (Sensível ao Sol); III – Morena clara, queima e bronzeia moderadamente (Sensibilidade normal ao Sol); IV – Morena moderada, queima pouco e sempre bronzeia (Sensibilidade normal ao Sol); V – Morena escura, queima raramente e sempre bronzeia (Pouco sensível ao Sol) e VI – Negra, nunca queima e totalmente pigmentada (Insensível ao Sol).

Para a determinação do valor do FPS, um grupo de 10 a 20 voluntários, de fototipos de I a III pela classificação de Fitzpatrick, são submetidos a doses progressivas de radiação emitidas por uma fonte artificial de luz em áreas de pele protegida e não protegida pelo protetor em estudo, aplicado na quantidade de 2 mg/cm². Após cerca de 16 a 24 horas da exposição, é realizada a leitura da DEM nas duas áreas e calculada a sua razão, que é o valor do FPS. (6). Esta metodologia é adotada pelo FDA (Food and Drug Administration) e pelo COLIPA (European Cosmetic and Toiletries Association).

A RDC 237 de 2002 da ANVISA determina que o valor de FPS de um produto seja determinado aplicando ou a metodologia do FDA ou da COLIPA (ANVISA), cujas principais diferenças entre as monografias são: número de voluntários, produto FPS padrão, progressão de doses e leitura da DEM (6). Apesar dessas diferenças, as metodologias produzem resultados de FPS equivalentes.

Apesar de ser o método aceito para determinar a eficácia fotoprotetora de um produto, existem algumas controvérsias quanto ao método do FPS e sua aplicabilidade. Devido à utilização de um marcador biológico, que é a medida do eritema, este ensaio pode sofrer variação em seus resultados. Em trabalho da COLIPA concluiu-se que os parâmetros-chave para assegurar a validade do método são a quantidade e a forma de aplicação do produto (6).

É importante ressaltar que o método do FPS aplica-se a proteção à radiação UVB. Em relação à radiação UVA não existe uma metodologia internacionalmente aceita, mas já é clara a necessidade de rotular os produtos quanto a este tipo de proteção. Os métodos *in vivo* que mensuram a proteção UVA são: IPD (pigmentação persistente imediata), PPD (pigmentação persistente permanente) e PFA (fator de proteção UVA). A diferença entre o teste *in vivo* do FPS para a proteção UVA é o espectro da fonte de luz e o desfecho de pigmentação medido (37).

Os ensaios atualmente disponíveis para mensurar proteção UVA não tem relevância para o consumidor visto que as informações obtidas são pertinentes às condições experimentais testadas. Para realização deste ensaio, o comprimento de onda referente à radiação UVB é filtrado, resultando num espectro parcial que emite apenas radiação UVA. Este espectro resulta num perfil de absorção da radiação diferente do observado quando o espectro é completo (290-400nm), o que seria mais adequado para avaliação do produto e uso pelo consumidor (37).

As principais inovações em fotoproteção nos anos recentes têm sido destacadas duas categorias: 1) a introdução de novos ingredientes em tradicionais protetores solares tópicos, e 2) a utilização de formulações orais para proporcionar fotoproteção sistêmica (30).

Uma das tendências no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras é a reduzida concentração de filtros químicos que ainda apresentem elevada proteção frente às radiações UVA e UVB. Tal fato se deve ao surgimento de eventos adversos ocasionados pelo uso tópico destes compostos ou formulações e mesmo por sua absorção cutânea, o que compromete a eficácia fotoprotetora (38).

Apesar das fortes evidências dos benefícios do uso regular de fotoprotetores, algumas controvérsias sobre a sua utilização têm sido relatadas: dermatite de contato, fotoinstabilidade, toxicidade, influência na síntese de vitamina D, absorção sistêmica, atividade hormonal e mutagenicidade (32).

Estes produtos possuem formas de apresentação diversas, sendo encontrados na forma de loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água (O/A), emulsões água em óleo (A/O), bastões e aerossóis, entre outras. Dentre todas estas formas de apresentação, as emulsões são aquelas que apresentam fotoproteção superior

(28). As principais queixas na utilização diária destes são: sensação de pele pegajosa ou oleosa, sensação de calor ou suor cutâneo, percepção de aumento da incidência de acne e dificuldade de utilização diária (39).

3.3 Uso de antioxidantes e flavonoides em formulações fotoprotetoras

Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários de plantas formados estruturalmente por um esqueleto do tipo cromano com um substituinte fenil na posição C2 ou C3. Podem ser hidroxilados em diferentes posições e conter açúcares ligados, comumente na forma de C- ou O-glicosídeos. Os açúcares geralmente encontrados são glucose, ramnose, galactose e arabinose, sendo também frequentes os dissacarídeos (40).

O termo glicosídeo é aplicado quando na presença de um ou mais grupamentos de açúcares e glucosídeo se este for uma unidade de glucose. Quando nenhum açúcar está presente é aplicado o termo aglicona. A classificação e nomenclatura desta classe não são simples e está relacionada à estrutura química dos compostos (40).

A estrutura geral de um flavonoide está representada na Figura 1.

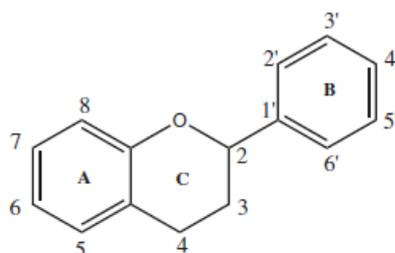


Figura 1. Estrutura geral e padrão de numeração para flavonoides (41).

A subdivisão dos flavonoides é baseada no carbono de ligação do anel B com o anel C e no padrão de oxidação do anel C. Os grupos cuja ligação entre os anéis B e C dá-se pelo C2 são os flavanois, flavanonas, flavonas, flavonois e antocianinas. Quando a ligação dá-se pelo C3 têm-se as isoflavonas (42).

A absorção na região do ultravioleta é uma das premissas para utilização de flavonoides como fotoprotetores. O espectro da aglicona em geral apresenta dois

máximos de absorção: a banda I entre 240 e 285nm (corresponde ao anel A) e a banda II entre 300 e 550nm (corresponde ao anel C). A intensidade relativa destes máximos dão informações valiosas sobre a natureza dos flavonoides e seu padrão de oxidação (43).

Quando o máximo é observado na banda I geralmente a estrutura corresponde a dihidroflavonas, dihidroflavonois ou isoflavonas. Quando o máximo é observado na banda II geralmente são chalconas, auronas ou antocianinas. Mudanças no padrão de substituição também geram alteração no espectro de absorção ultravioleta (43).

Devido à semelhança estrutural dos flavonoides com os filtros químicos, adicionalmente às suas propriedades antioxidantes e a similaridade entre seus espectros de absorção na região da radiação UV, tais compostos de origem natural são passíveis de exercer atividade fotoprotetora (38).

Os flavonoides têm um número variável de hidroxilas fenólicas na sua estrutura química e são excelentes quelantes de ferro e de outros metais de transição, tornando-os antioxidantes mais eficientes. Conseqüentemente, desempenham um papel essencial na proteção do organismo contra o dano oxidativo. (30).

Os mecanismos relacionados à capacidade fotoprotetora de flavonoides e compostos fenólicos baseiam-se em atividades decorrentes de sua estrutura química: a capacidade de absorção na região do ultravioleta, a inibição da geração de espécies reativas de oxigênio e caso estas sejam formadas têm capacidade para reduzi-las, e também capacidade de mediar cascatas de sinalização de crescimento e diferenciação celular (44; 30).

O envelhecimento cutâneo é um processo bioquímico de múltiplas etapas onde estão envolvidos radicais livres e espécies reativas de oxigênio. A radiação UV pode estimular a produção destas espécies na pele e os flavonoides têm capacidade para neutralizar este efeito (45).

A Quercetina é considerada o flavonoide com a mais potente propriedade antioxidante e potencial fotoprotetor, devido ao padrão de hidroxilação da molécula. Há poucas pesquisas sobre os seus efeitos fotoprotetores, mas algumas formulações tópicas contendo quercetina inibem o dano induzido pela radiação UVB em animais (30).

Em virtude destas atividades, diversos trabalhos têm procurado incorporar matérias primas vegetais ricas em flavonoides a bases cosméticas com intuito de fotoproteção. Podem ser citados: acerola (46), *Passiflora incarnata*, rutina (38), *Culcitium reflexum* (47), extrato de vinho a partir de uvas *Jacquez* (48), *Calendula officinalis* (49), própolis (50) pistache (51), entre outras.

3.4 Cerrado e espécies nativas

O Cerrado ocupa uma área de 204 milhões de hectares, o equivalente a aproximadamente 23,9% do território brasileiro. O clima dominante na região é o tropical-quente-subúmido, caracterizado por forte estacionalidade das chuvas, temperatura média anual de 21,3 a 27,2°C. A região do Cerrado se destaca do ponto de vista hidrológico, pois 12 das grandes regiões hidrográficas brasileiras recebem água de rios que nascem neste bioma, e ambiental, pois o Cerrado tem a segunda maior diversidade do planeta, superado apenas pela Amazônia (52).

Infelizmente, metade deste bioma já foi devastado ou alterado pelo homem e apenas 11% do seu território é protegido por lei. Quase toda a região desmatada deste bioma hoje é ocupada por pastagens e plantações e corresponde a cerca de 50% dos grãos e 40% da carne bovina produzida no país (53).

Grande parte da flora deste bioma ainda carece de estudo, tanto por parte da distribuição geográfica das espécies, quanto por parte dos constituintes químicos. Um dos objetivos deste trabalho é contribuir com o enriquecimento literário-científico sobre espécies nativas deste bioma.

Foram selecionadas espécies nativas do Cerrado que apresentassem relatos de atividade antioxidante e presença de compostos fenólicos ou flavonoides, substâncias estas passíveis de exercer ação fotoprotetora; sendo escolhidas quatro espécies: *Annona crassiflora* Mart., *Campomanesia adamantium*, *Caryocar brasiliense* e *Vitex cymosa*.

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) pertence à família Annonaceae e popularmente é conhecido como marolo ou pinha-do-cerrado. A família Annonaceae compreende aproximadamente 120 gêneros com cerca de 2000 espécies. Ocorre no Cerradão, Cerrado *strito sensu* e Campo Rupestre que estão distribuídos em vários

estados brasileiros, abrangendo as regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Os frutos possuem excelente sabor, aroma e qualidade nutritiva, sendo muito consumidos *in natura*, e apresentam rendimento médio de 55% a 65% em polpa, com potencial para a sua utilização na forma processada como polpa congelada, sucos, geleias e sorvetes (54).

A família Annonaceae é frequentemente relatada pela presença de alcaloides, sendo que nas folhas de araticum já foram identificados duas aporfina (anonaine e xilopina), um fenantreno (anoretina) e uma benzilisoquinolina (romucosina) (55). Popularmente, é utilizado para o tratamento de doença de Chagas e estudo com o extrato etanólico da casca apresentou atividade anti-leishmania e anti-tripanososoma (56).

Na análise do fruto do araticum, um estudo que comparou a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante na casca, semente e polpa deste, foi detectado maior teor fenólico e atividade antioxidante na semente do fruto. Como melhor solvente extrativo para esta atividade, foi estabelecido o etanol (57).

O mesmo grupo de pesquisa também identificou as substâncias presentes nas partes do fruto que apresentaram esta atividade através da técnica de espectrometria de massa por ionização por eletrospray (ESI-MS), sendo detectados os seguintes constituintes: ácido málico, ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina, ácido cafeoil-tartarico e rutina (58).

O extrato bruto etanólico desta espécie não demonstrou atividade larvicida frente à *Artemia salina*, mas as frações obtidas apresentaram IC₅₀ classificado como tóxico para a larva (IC₅₀ < 1000 ug/mL). Tanto os extratos brutos quanto as frações obtidas para esta espécie apresentaram reação positiva para presença de acetogeninas (59).

Nas folhas de *Annona crassiflora* foram encontrados os seguintes flavonóis: campeferol-3-O-galactosídeo, campeferol-3-O-glucosídeo, campeferol-3-O-arabinosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo, quercetina-3-O-arabinosilarabinosídeo e quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo (60). As folhas avaliadas através do teste de micronúcleos em camundongos apresentaram atividade antimutagênica e ausência de atividade mutagênica, sendo estas atribuídas aos flavonóides presentes (61).

As sementes de araticum apresentaram elevado conteúdo de fitosteróis, sendo identificados: campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, sendo este em maior concentração. Além destes, tocoferóis e ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente o ácido palmítico e o ácido esteárico, respectivamente (62; 63).

A guavira, também conhecida por gabioba, gabioba-do-mato ou gabioba do-cerrado, possui como nome científico *Campomanesia cambessedeana* e sinonímia *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. (64). É uma espécie arbustiva, da família Myrtaceae, cujos frutos são redondos, de aroma cítrico, com coloração variando entre o verde e o amarelo, e são utilizados na fabricação de sucos, licores e doces (14; 64).

A polpa dos frutos apresentou elevado teor de ácido ascórbico ($234 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e presença de α -pineno, limoneno e β -z-ocineno no óleo volátil (14). Foram encontrados diferentes compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas, predominando entre estes as flavonas e chalconas (15), sendo demonstrada atividade antioxidante para estes extratos (15; 65). Os frutos apresentaram atividade antimutagênica e foram encontrados os seguintes constituintes fenólicos: catequina, etil-galato e propil-galato (66).

Nas folhas foram identificadas 5 flavanonas e 2 chalconas, porém estas substâncias não apresentaram atividade antimicrobiana. (64). Nesta porção foram obtidos e identificados os seguintes compostos: miricitrina, miricetina e quercetina. Para estas substâncias, bem como para a fração isolada foram demonstradas as seguintes atividades biológicas: antinociceptiva e anti inflamatória devido a efeitos imunomodulatórios sobre óxido nítrico, TNF- α e interleucina-10, e também efeito anti edematogênico (67). Em outra espécie do mesmo gênero, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Campomanesia eugenioides*, apresentou atividade contra *Candida spp* (68).

A espécie *Caryocar brasiliense* Cambess., da família Caryocaraceae, é conhecida popularmente como pequi, pequiá, pequi-do-cerrado ou piqui. O nome vulgar vem do tupi, *py* (pele, casca) + *qui* (espinho), casca espinhenta, decorrente dos espinhos do endocarpo lenhoso ou caroço. É uma espécie arbórea de tronco tortuoso, ocorrendo nos biomas do Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica. Os frutos e as amêndoas podem ser consumidos *in natura*, e da polpa também são preparados licores (69).

Em análise do óleo de pequi, tanto de polpa quanto de amêndoa verificou-se a sua relevância para aplicação em emulsões cosméticas, por apresentar em sua

composição ácidos graxos essenciais para hidratação cutânea e pelo pH se aproximar ao da pele (4,6 – 5,8) (70). Além disso, o mesmo apresenta potencial antioxidante devido a seus constituintes fenólicos e carotenoides (16).

A composição em ácidos graxos do óleo fixo da amêndoa de pequi indicou a presença dos ácidos: oleico (57,15%), palmítico (35,53%), esteárico (4%) e linoleico (2,38%). A aplicação tópica deste óleo, foi capaz de reduzir a inflamação tópica e acelerar o reparo de feridas cutâneas (71).

Em análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas foram identificados os principais componentes dos aromas voláteis do fruto que são: etil-hexanoato e etil-octanoato, tetrahidrofurfurilalcool, butanoato de etila, palmitato de butila, estearato de isobutila, ácido 3-metilvalérico e fenilacetaldeído (72).

Na polpa de pequi foram identificados os carotenoides majoritários violaxantina, luteína, zeaxantina, e minoritários: β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina (73). A casca do pequi demonstrou excelente atividade captora de radicais e potencial para inibir a peroxidação lipídica. Os constituintes fenólicos encontrados nesta porção do fruto foram: ácido gálico, ácido quínico, quercetina, e quercetina 3-O-arabinose possivelmente explicam sua maior atividade antioxidante (74).

As folhas de pequi apresentaram capacidade de inibir a proliferação de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, atividade antioxidante semelhante a da rutina e da vitamina C (75) e boa atividade moluscicida (76).

Em outras espécies da família Caryocaraceae, como *Caryocar coriaceum* Wittm., também foram identificados flavonoides e compostos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e quercetina; sendo observado moderado efeito antimicrobiano para esta espécie (77). O óleo desta espécie também apresentou efeito benéfico na cicatrização de feridas e úlceras gástricas (78).

O tarumã pertence à família Verbenaceae, espécie *Vitex cymosa* Bertero ex Spreng, sendo conhecido popularmente como tarumeiro, tarumã-do-alagado, tarumã-guaçu, tarumã-do-igapó, azeitona-do-mato e jaramantaia. Ocorre na região Amazônica e no Brasil Central até São Paulo e Mato Grosso do Sul em matas ciliares. É particularmente frequente nas várzeas do pantanal mato-grossense. Os frutos globosos

apresentam baixo valor energético 39,6 kcal/100g e possui como principais minerais potássio, fósforo e ferro (79).

Em estudo comparativo da atividade antioxidante frente ao radical DPPH, foi observado para o fruto do tarumã, que as sementes, a casca e a polpa do fruto apresentam diferenças entre o melhor solvente extrativo para os compostos fenólicos do fruto, sendo que para a polpa e semente foi a água e para as cascas foi o etanol. O estudo demonstrou que a casca do fruto apresenta elevado conteúdo de fenóis totais, porém este não está relacionado a atividade antioxidante da espécie (10).

Nos frutos de tarumã foi encontrado o ácido di-cafeoilquínico (80). O óleo fixo extraído dos frutos mostrou-se em ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, aldeídos e butanolidos, notando-se ausência de terpenoides que geralmente apresentam efeito antimicrobiano. Apesar disto, este foi ativo contra espécies de *Candida* e *Staphylococcus*, provavelmente devido à presença dos butanolidos (81).

Nas cascas do caule foram isolados ecdiesteroides, comuns no gênero *Vitex* (82) e o extrato metanólico dos ramos apresentou efeito inseticida (83). Nas folhas foram encontrados iridoides: tarumal, viteoide e agnuside (84), flavonoides (vitexina, orientina, iso-orientina, caempeferol, luteolina, 3'-O-metil-luteolina, pachipodol e apigenina) e diversos triterpenos. Na avaliação de atividade biológica, todos os extratos exibiram atividade antinociceptiva (85).

4. Referências bibliográficas

1. SEBRAE. Informações de mercado sobre cosméticos à base de produtos naturais. Relatório técnico, Sebrae, ESPM, novembro, 2007.
2. FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. *Cosmetics and toiletries*, v. 18, março, p. 7-10, 2006
3. ARAÚJO TS, SOUZA O. Protetores solares e o efeito da radiação ultravioleta. *Scientia plena*, v. 4, n.11, 2008
4. MAW KL, CATON-WILLIAMS J, SALON J, HUANG Z. Simple ultraviolet and high-performance liquid chromatography for the evaluation of sunscreen efficacy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 65, n. 2, p.328-335, ago., 2011
5. WANG SQ, OSTERWALDER U, JUNG K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.25, n.6, p.525-530, set., 2011
6. SCHALKA S, REIS VMS. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. *Anal. Bras. Dermatol.*, v.86, n.3, p.507-515, 2011.
7. SAMBANDAN DR, RATNER D. Sunscreens: an overview and update. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.64, n.4, abr., p.748-758, 2011
8. SOUSA CMM, SILVA HR, VIEIRA-JUNIOR GM, AYRES MCC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO MS, CHAVES MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, v.30, n.2, p.351-355, 2007
9. MACHADO H, NAGEM TJ, PETERS VA, FONSECA CS, OLIVEIRA TT. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Bol. Cent. Biol. Reprod.*, Juiz de Fora, v.27, n.1/2, p.33-39, jan./dez., 2008.
10. SILVA GM. Potencial antioxidante de frutos do Cerrado e do Pantanal, no estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado) – Campo Grande, 77f. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010

11. MARQUES MCS, CARDOSO MG, SOUZA PE, GAVILANES ML, SOUZA JA, PEREIRA NE, NEGRÃO IO. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras. Edição Especial, p.1410-1419, dez., 2002.
12. ROESLER R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 31, n.1, p.93-100, jan.-mar., 2011
13. ALMEIDA ACA. Análise dos mecanismos antioxidantes na atividade antiulcerogênica de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae). 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010
14. VALILLO MI, LAMARDO LCA, GABERLOTTI ML, OLIVEIRA E, MORENO PRH. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.26, n.4, p.805-810, out.-dez., 2006
15. COUTINHO ID, COELHO RG, KATAOKA VMF, HONDA NK, SILVA JRM, VILEGAS W, CARDOSO CAL. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Ecl. Quím.*, São Paulo, n. 33, v.4, p.53-60, 2008
16. MIRANDA-VILELA AL. Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa e fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB.). Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 2009
17. VILAR JB, FERREIRA FL, FERRI PH, GUILLO LA, CHEN CHEN L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of Araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleous test in mice. *Braz. J. Biol.*, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008
18. NAVES RV, ALMEDA-NETO JX, ROCHA MR, BORGES JD, CARVALHO GC, CHAVES LJ, SANTOS PIMENTA LP, PINTO GB, TAKAHASHI JA, SILVA LGF, BOAVENTURA MAD. Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine* 10: 209–212, 2003

19. RAMOS DD, CARDOSO CAL, YAMAMOTO NT. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg (Myrtaceae). Rev. Bras. Biociênc., Porto Alegre, v.5, s. 2, p. 774-776, jul., 2007
20. RIBEIRO RF. Pequi: o rei do cerrado. Belo Horizonte, Rede Cerrado, 2000. 62p
21. MACHADO MTC, MELLO BCBS, HUBINGER MD. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. Journal of Food Engineering 117 (2013) 450–457
22. BELO SD. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Gingko biloba*. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.
23. ROSEN MR. Delivery system handbook for personal care and cosmetic products. Cap 3, p.77-100, William Andrew Inc. 2005
24. SASSON SC. Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol. Dissertação (Mestrado), 111f. Curitiba, Universidade Federal do Paraná).
25. MANSUR MCPPR. Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar. Dissertação (Mestrado), 145f. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
26. GUARANTINI T, CALLEJON DR, PIRES DC, LOPES JNC, LIMA LM, GIANNELLA NETO D, SUSTOVICH C, LOPES NP. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. Quim. Nova, Vol. XY, No. 00, 1-5, 2009
27. FUCHS J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and β -caroteno in cutaneous photoprotection. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 25, No. 7, pp. 848–873, 1998
28. BALOGH TS, VELASCO MVR, PEDRIALI CA, KANEKO TM, BABY AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. An Bras Dermatol. 2011; 86(4):732-42

29. KOHL E, STEINBAUER J, LANDTHALER M, SZEIMIES RM. Skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011, 25, 873–884
30. GILABERTE Y, GONZÁLEZ S. Update on photoprotection. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101(8):659–672
31. TANNER PR. Sunscreen product formulation. *Dermatol Clin* 24 (2006) 53 – 62
32. GONZÁLEZ S, FERNÁNDEZ-LORENTE M, GILABERTE-CALZADA Y. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology* (2008) 26, 614–626
33. INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. *Rev Bras Cancerol* 2002;48(3):317-32
34. KOCKLER J, OELGEMÖLLER M, ROBERTSON S, GLASS BD. Photostability of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 13 (2012) 91– 110
35. PAESE K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da estabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi sólidos. Dissertação, Porto Alegre, 2008, 185p
36. COLIPA GUIDELINES. International sun protection factor (SPF) test method. Colipa, CTFA SA, JCIA, CTFA, maio, 2006
37. NASH JF, TANNER PR, MATTS PJ. Ultraviolet A Radiation: Testing and labeling for sunscreen products. *Dermatol Clin* 24 (2006) 63-74
38. VELASCO MVR, BALOGH TS, PEDRIALI CA, SARRUF FD, PINTO CASO, KANEKO TM, BABY AR. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (1): 23-7 (2008).
39. DRAELOS ZD. Compliance and sunscreens. *Dermatol Clin* 24 (2006) 101 – 104
40. RIJKE E, OUT P, NIESSEM WMA, ARIESE F, GOOJKER C, BRINKMAN UAT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 31–63

41. FERREIRA CHA, COLOMBO R. Validação de método e determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas e do vinhoto da cana-de-açúcar e comparação com método CLAE-UV. *Quim. Nova*, v. 34, n. 9, 1651-1655, 2011
42. BEECHER GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* 133, 3248S-3254S, 2003
43. MARKHAM KR. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, 1982, 113 pgs
44. AGATI G, BRUNETTI C, FERDINANDO MD, FERRINI F, POLLASTRI S, TATTINI M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>
45. POVICHIT N, PHRUTIVORAPONGKUL A, SUTTAJIT M, CHAIYASUT C, LEELAPORNPID P. Phenolic content and in vitro inhibitory effects on oxidation and protein glycation of some Thai medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.23, No.4, October 2010, pp.403-408
46. SOUZA FP, CAMPOS GR, PACKER JF. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2013;34(1):69-772
47. AQUINO R, MORELLI S, TOMAINO A, PELLEGRINO M, SAIJA A, GRUMETTO L, PUGLIA C, VENTURA D, BONINA F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (2002) 183–191
48. SPAGNA G, TOMAINO A, CIMINO F, BARBAGALLO RN, VENTURA D, BONINA F, SAIJA A. Chemical analysis and photoprotective effect of an extract of wine from *Jacquez* grapes. *J Sci Food Agric* 82:1867–1874 (online: 2002)
49. MISHRA AK, MISHRA A, CHATTOPADHYAY P. Assessment of *In Vitro* Sun Protection Factor of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) essential oil formulation. *J Young Pharmacists*, 2012; 4:17-21

50. GREGORIS E, FABRIS S, BERTELLE M, GRASSATO L, STEVANATO R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics* 405 (2011) 97–101
51. MARTORANA M, ARCORACI T, RIZZA L, CRISTANI M, BONINA FB, SAIJA A, TROMBETTA D, TOMAINO A. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia* 85 (2013) 41–48
52. EMBRAPA FLORESTAS. Disponível: <http://www.cpac.embrapa.br/unidade/ocerrado/acesso> 12/11/2013 as 19:30
53. ESTADÃO. Disponível: <http://sustentabilidade.estadao.com.br/noticias/geral,ameaca-ao-cerrado-se-volta-para-o-norte,441513#cerrado/acesso> 23/09/2014 as 19:42
54. SILVA AML, GOMES ACG, MARTINS BA. Alterações físico-químicas e estudo enzimático da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart). *Estudos, Goiânia*, v. 36, n. 5/6, p. 775-783, maio/jun. 2009.
55. EGYDIO APM, VALVASSOURA TA, SANTOS DYAC. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 46 (2013) 145–151
56. MESQUITA ML, DESRIVOT J, BORRIES C, FOURNET A, PAULA JE, GRELLIER P, ESPINDOLA LS. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v.100, n.7, p.783-787, nov., 2005
57. ROESLER R, MALTA LG, CARRASCO LC, PASTORE G. Evaluation of the Antioxidant Properties of the Brazilian Cerrado Fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*, v. 71, n. 2, 2006
58. ROESLER R, CATHARINO RR, MALTA LG, EBERLIN MN, Pastore G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* 104 (2007) 1048–1054

59. SANTOS PIMENTA LP, PINTO GB, TAKAHASHI JA, SILVA LGF, BOAVENTURA MAD. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine* 10: 209–212, 2003
60. SANTOS DYAC, SALATIN MLF. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55 (2000) 567±573.
61. VILAR JB, FERREIRA FL, FERRI PH, GUILLO LA, CHEN CHEN L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of Araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleous test in mice. *Braz. J. Biol.*, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.
62. LUZIA DMM, JORGE N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. Seeds. *Industrial Crops and Products* 42 (2013) 231– 235
63. THE PLANT LIST. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-33130> Acesso 13/11/2013 as 08:41
64. KATAOKA VMF, MELO AMMF, EBERHARDT GM, CARDOSO CAL. Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana de dos extratos etanólicos das cascas dos frutos e das folhas de *Campomanesia adamantium*. IX Simpósio Nacional Cerrado, 12 a 17 out de 2008, ParlaMundi, Brasília, DF.
65. RAMOS DD, CARDOSO CAL, YAMAMOTO NT. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg (Myrtaceae). *Rev. Bras. Biociênc.*, Porto Alegre, v.5, s. 2, p. 774-776, jul., 2007
66. MALTA LG, GHIRALDINI FG, REIS R, OLIVEIRA MV, SILVA LB, PASTORE GM. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. *Food Research International* 49 (2012) 604–611
67. FERREIRA LC, GRABE-GUIMARÃES A, PAULA CA, MICHEL MCP, GUIMARÃES RG, REZENDE AS, SOUZA FILHO JD, GUIMARÃES DAS. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology* 145 (2013) 100–108
68. MOURA-COSTA GF, NOCCHI SR, CEOLE LF, MELLO JCP, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP, TEMPONI LG, UEDA-NAKAMURA T. Antimicrobial activity of

- plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 143 (2012) 631–638
69. EMBRAPA FLORESTAS. Pequiizeiro: *Caryocar brasiliense*. Comunicado Técnico, 230, 1ª Edição, 2009.
70. MACHADO MTC, MELLO BCBS, HUBINGER MD. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. *Journal of Food Engineering* 117 (2013) 450–457
71. OLIVEIRA MLM, NUNES-PINHEIRO DCS, TOMÉ AR, MOTA EF, LIMA-VERDE IA, PINHEIRO FGM, CAMPELLO CC, MORAIS SM. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. *Journal of Ethnopharmacology* 129 (2010) 214–219
72. MAIA JGS, ANDRADE EHA, SILVA MHL. Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (2008) 574–576
73. AZEVEDO-MELEIRO CH, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004) 385–396
74. ROESLER R, CATHARINO RR, MALTA LG, EBERLIN MN, PASTORE G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* 110 (2008) 711–717
75. PAULA-JUNIOR W, ROCHA FH, DONATTI L, FADEL-PICHETH CMT, WEFFORT-SANTOS AM. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(Supl.): 625-630, Dez. 2006.
76. LOPES TC, GONÇALVES JRS, SOUZA NS, MORAES DFC, AMARAL FMM, ROSA IG. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. *Cad. Pesq., São Luís*, v. 18, n. 3, set./dez. 2011.
77. ARARUNA MKA, SANTOS KKA, COSTA JGM, COUTINHO HDM, BOLIGON AA, STEFANELLO ST, ATHAYDE ML, SARAIVA RA, ROCHA JBT, KERNTOPF MR, MENEZES IRA Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit

tree *Caryocar coriaceum* Wittm. European Journal of Integrative Medicine 5 (2013) 178–183

78. QUIRINO GS, LEITE GO, REBELO LM, TOMÉ AR, COSTA JGM, CARDOSO AH, CAMPOS AR. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. Phytochemistry Letters 2 (2009) 179–183

79. CALDEIRA SD, HIANE PA, RAMOS MIL, RAMOS FILHO MM. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. B.CEPPA, Curitiba, v. 22, n.1, p. 145-154, jan./jun., 2004

80. LEITÃO SG, FONSECA EN, SANTOS TC, FRANÇA F, MONACHE FD. Caffeoylequinic acid derivatives from two Brazilian *Vitex* species. Biochemical Systematics and Ecology 36 (2008) 312 e 315.

81. FONSECA EN, FIGER A, FURTADO DT, LOPES D, ALVIANO DS, ALVIANO CS, LEITÃO SG. Análise química e atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Vitex cymosa* Bertero. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 8, n. 4, p. 87-91, 2006

82. SANTOS TC, MONACHE FD, LEITÃO SG. Ecdysteroids from two Brazilian *Vitex* species. Fitoterapia 72 2001. 215-220

83. OLIVEIRA TA, RONCHI-TELES B, FONSECA CRV, SILVA SLR, SANTOS PA, NUNEZ CV. Insecticidal activity of *Vitex cymosa* (Lamiaceae) and *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) extracts against *Sitophilus zeamais* adults (Curculionidae). Emir. J. Food Agric. 2012. 24 (1): 49-56

84. SANTOS TC, SCHRIPEMA J, MONACHE FD, LEITÃO SG. Iridoids from *Vitex cymosa*. J. Braz. Chem. Soc., v. 12, n. 6, 763-766, 2001

85. LEITÃO SG, SANTOS TC, MONACHE FD, MATHEUS ME, FERNANDES PD, MARINHO BG. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. Brazilian Journal of Pharmacognosy 21(5): 874-883, Sep./Oct. 2011

5. Artigo

5.1 Apresentação do artigo

De acordo com a Resolução N° 11 de 25 de maio de 2012, o Regulamento do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Farmácia, Capítulo IX, Artigo 39, prevê a apresentação da dissertação final na forma de artigo original precedido por revisão de literatura. O artigo a seguir, foi submetido em língua inglesa à Revista *AAPS PharmSciTech* (ISSN 1530-9932) em 28/08/2014 e sua formatação e organização correspondem às normas da revista até a presente data. Abaixo segue a versão em língua portuguesa do artigo submetido.

Investigation of the photoprotective potential of native extracts from Cerrado

Melisha Stephanie dos S. T. do Nascimento¹, Patrícia de O. Figueiredo², Walmir S. Garcez², Natane C. da F. de Araújo³, Patrik O. Rodrigues⁴

Abstract

Ultraviolet radiation is the principal cause of skin damage, and the use of products that block this radiation can minimize injuries and prevent burns, aging and skin cancer. Antioxidants and flavonoids have been studied as an alternative for increasing the photoprotection and native Cerrado species such as *Annona crassiflora* Mart, *Caryocar brasiliense* Camb, *Campomanesia adamantium* and *Vytex cymosa* Bert have been reported in the literature by the presence of these compounds. These species were selected for the investigation of their photoprotective potential, and the species *Annona crassiflora* (EAC) and *Caryocar brasiliense* (ECB) were selected by their promising potential and were submitted to a chemical study in order to identify the possible active compounds, which were identified as flavonoids. These extracts were incorporated into formulations and the SPF was determined *in vitro* (by spectrophotometry) and *in vivo* as well as the acute dermal toxicity. The *in vitro* SPF from EAC was 10.66 ± 0.94 and 0.21 ± 0.02 after incorporation into the formulation. The ECB presented a *in vitro* SPF 22.21 ± 0.07 and 0.22 ± 0.04 when incorporated in the formulation. The activities were correlated to the presence of flavonoids in both extracts. The formulations with embedded dermal extracts tests showed no toxicity *in vivo*, being obtained in the EAC formulation SPF 1.5 and in the ECB formulation SPF 2. In conclusion, the SPF of the extracts was higher than those of formulations and incorporated the *in vitro* can be correlated with those obtained *in vivo*.

Key-words: photoprotection, flavonoids, native species

¹ Graduate program in pharmacy, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil – Street Verdum, 184, Nasser Village, Zip Code 79117360, 556792818343, melishastephanie@gmail.com

² Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

³ Pharmacy course, Center of Biological Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

⁴ Center of Biological Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

1. Introdução

A radiação solar corresponde à energia emitida pelo Sol, transmitida sob a forma de radiação eletromagnética. Considerando o espectro eletromagnético, a radiação solar é transmitida na forma de radiação ultravioleta (100-400nm), luz visível (400-700nm) e infravermelho (acima de 700nm). Esta radiação ultravioleta natural é a principal responsável por lesões cutâneas, envelhecimento cutâneo precoce e câncer de pele, consequência da exposição frequente e prolongada das pessoas à radiação solar, seja por lazer ou por atividades profissionais (1)

Os filtros solares são capazes de bloquear/minimizar o acesso da radiação ultravioleta à pele, sendo eficazes na minimização dos efeitos nocivos, especialmente com a prevenção do desenvolvimento de câncer de pele (2). O efeito fotoprotetor pode ocorrer de forma passiva e/ou ativa. A proteção passiva consiste nos mecanismos de reflexão ou absorção da radiação, que são exercidos pelos filtros físicos e químicos. A proteção ativa ocorre quando substâncias como os antioxidantes inibem espécies reativas de oxigênio ou radicais livres e, neste sentido, a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais às formulações de filtros solares, ou ainda, a adição de extratos vegetais com reconhecida atividade antioxidante, torna-se de fundamental importância, uma vez que podem potencializar o efeito fotoprotetor deste tipo de cosmético (3).

Os constituintes fenólicos e os flavonoides possuem reconhecida ação fotoprotetora e antioxidante (4), sendo esta atividade resultante da sua estrutura química e propriedades redutoras, uma vez que podem agir neutralizando ou sequestrando radicais livres e quelando metais de transição, inibindo a etapa de iniciação e/ou propagação da oxidação (5).

Estudos que agregam extratos vegetais ricos em flavonoides a protetores solares vêm sendo desenvolvidos no sentido de potencializar o efeito fotoprotetor destes cosméticos, sendo que alguns trabalhos já mostraram resultados promissores (6; 7; 8). Considerando que o Cerrado brasileiro possui uma rica diversidade de espécies em sua flora produtoras de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides (9; 10; 11;12), foi objetivo deste estudo avaliar o potencial de extratos de espécies nativas deste Bioma como aditivos à formulação de um filtro solar, visando à potencialização do efeito fotoprotetor.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

As espécies vegetais foram selecionadas com base em revisão na literatura de espécies nativas do Cerrado que apresentassem relatos de teor de constituintes fenólicos e flavonoides e também atividade antioxidante. As espécies selecionadas foram coletadas no município de Campo Grande, MS, na Estância Alegria, situada na Estrada das Três Barras, quilômetro nove, 20°38'S e 54°31'WO, nos períodos entre outubro e novembro de 2012, devido ao período de floração das mesmas.

Após a identificação botânica, exsiccatas correspondentes a cada uma das espécies foram depositadas no Herbário CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), cujos registros foram: *Vitex cymosa* (40580), *Campomanesia adamantium* (40581), *Caryocar brasiliense* (40582) e *Annona crassiflora* (40583).

2.2 Preparo dos extratos vegetais

Foi realizada uma triagem inicial com as partes dos frutos (casca, polpa e semente) e com as folhas e flores de cada espécie, sendo que as folhas foram selecionadas para estudo devido à facilidade de obtenção e ao melhor rendimento extrativo. As folhas de cada espécie foram separadas manualmente e secas em estufa ventilada a 40°C por três dias. Em seguida, foram trituradas em liquidificador e o pó obtido constituiu a droga vegetal. 200g de cada droga vegetal foi extraída por maceração com etanol absoluto 1:20 (p/v) durante três dias à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador e armazenados sob-refrigeração.

2.3 Seleção do(s) extrato(s) com potencial fotoprotetor

A fim de determinar os extratos de maior potencial fotoprotetor foram realizados os ensaios de: determinação do comprimento de onda máximo de absorção dos extratos ($\lambda_{\text{máx}}$), teor de flavonoides totais (TFT) e atividade antioxidante (AA). As espécies que apresentaram melhores resultados nestas análises foram escolhidas para realização de estudo químico direcionado a identificação de flavonoides e para incorporação num creme dermatológico fotoprotetor.

2.3.1 Determinação do comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$)

O $\lambda_{\text{máx}}$ dos extratos diluídos (Concentração de 50mg sólidos/L) foi realizado após varredura em Espectrofotômetro Thermo Scientific® Evolution 60 entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm, com intervalos de 5nm utilizando etanol absoluto como branco (13).

2.3.2 Teor de flavonoides totais (TFT)

O TFT dos extratos foi determinado segundo metodologia adaptada da Farmacopeia Francesa (14) em Espectrofotômetro Thermo Scientific ® Evolution 60. 0,3g de droga vegetal foram extraídos (2x20mL) com Etanol:Água 60% formando a Solução-Mãe (SM Vf = 50mL). Alíquotas de 1mL da SM foram diluídas (10mL) de duas formas: apenas diluída com metanol ou complexada com AlCl_3 (1mL). As absorvâncias das soluções diluídas foram lidas a 413nm, e o valor da absorvância da solução diluída foi subtraído do valor da absorvância da solução complexada. Foi realizada uma curva de calibração com a rutina nas concentrações de 37,5; 75; 112,5; 150; 187 e 225 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O TFT foi expresso em rutina (mg flavonoide/g de planta seca). Esta metodologia foi validada quanto à linearidade e a precisão intermediária.

2.3.3 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante (AA) foi mensurada pelo método de sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (15). Foram utilizados os extratos diluídos (Concentração de 50mg sólidos/L). Em microplacas, 40 μL dos extratos diluídos, do padrão (quercetina) ou do branco (metanol) foram adicionados de 250 μL de DPPH (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e foram incubados por 25 minutos no escuro. A absorvância foi lida a 517nm. O percentual de sequestro de radicais livres (SRL) foi mensurado pelo decaimento da absorvância da amostra (A_{am}) em relação ao controle (A_{c}) pela seguinte equação:

$$\% \text{ SRL} = [A_{\text{c}} - A_{\text{am}} / A_{\text{c}}] * 100$$

2.4 Estudo químico direcionado a identificação de flavonoides

As espécies *Annona crassiflora* (EAC) e *Caryocar brasiliense* (ECB) foram selecionadas para estudo químico direcionado à identificação de flavonoides.

Inicialmente, a análise cromatográfica destes extratos foi realizada empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de rearranjo de diodos (CLAE-DAD) (Cromatógrafo Líquido Dionex® Ultimate 3000 equipado com detector de rearranjo de diodos 3000 RS, bomba Ultimate 3000 e software Chromeleon® 7.1). A coluna utilizada foi de fase reversa modelo Acclaim™120 C18 (5 µm, 120 Å, de dimensões 4,6x250mm) com pré-coluna Acclaim 120 C18 (5 µm, de dimensões 4,3x10mm) da marca ThermoScientific®.

Os extratos EAC e ECB foram diluídos em metanol e 20 µL destes foram submetidos a um gradiente exploratório de 30 minutos, sob vazão de 1 mL min⁻¹, utilizando-se como fase móvel H₂O (pH 3,0, ajustado com ácido o-fosfórico): acetonitrila (95:5, v/v) até acetonitrila 100%. Foram realizados testes para estabelecer as melhores condições cromatográficas de fase móvel, fluxo e tempo de eluição para os extratos, visando à identificação de componentes com perfis de flavonoides, avaliado pela obtenção dos espectros ultravioleta dos componentes dos extratos pelo detector DAD.

A fim de identificar as estruturas químicas dos flavonoides presentes nos extratos, um novo extrato de cada espécie foi preparado. 20 g de folhas de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* foram extraídas com etanol por maceração à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), por três dias. Os extratos foram filtrados e o resíduo extraído exaustivamente com etanol, sendo os filtrados reunidos e concentrados a secura por evaporação. Os extratos foram submetidos à partição com metanol:água 9:1 (v/v) (500mL), hexano (3x150mL), clorofórmio (3x150mL) e acetato de etila (3x150mL). As fases obtidas (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica) foram concentradas a secura e analisadas por CCDA, empregando placas de sílica gel 60F₂₅₄, revelador NP-PEG/luz ultravioleta e fase móvel acetato de etila:metanol:ácido fórmico 4,5:1,5:0,1 (v/v/v) e padrões quercetina e rutina.

As fases de ambos os extratos com indicativo de flavonoides nas CCDAs reveladas com NP-PEG/UV foram submetidas à cromatografia em coluna (diâmetro: 5 cm e altura: 30 cm) de Sephadex LH-20 (100µm, Sigma) eluída com metanol. As frações obtidas foram monitoradas por CCDA nas condições citadas e selecionadas aquelas que apresentaram indicativo de flavonoides.

Para a identificação estrutural dos flavonoides, as amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) ou metanol deuterado (CD₃OD) e submetidas às técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C) e DEPT 135° em espectrômetro Bruker DPX-300, a 300 MHz e 75 MHz para RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente, localizado no Instituto de Química da UFMS. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ¹H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de ¹³C.

2.5 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) por espectrofotometria no ultravioleta

O Fator de Proteção Solar (FPS) de EAC e ECB foi determinado por método espectrofotométrico de Mansur (17) utilizando Espectrofotômetro Thermo Scientific @ Evolution 60. As amostras foram diluídas com etanol até a concentração de 0,2 mg.mL⁻¹ e realizada varredura na região UVB e UVA com comprimento de onda entre 290 a 320 nm, em intervalos de 5nm. A leitura das amostras foi realizada em triplicata, utilizando etanol como branco, sendo aplicada a equação de Mansur para determinação do FPS:

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Onde *FC* é o fator de correção (=10), *EE* é o espectro de efeito do eritema, *I* é o espectro de intensidade de energia solar, *Abs* é a absorvância da amostra. Os valores de *EE* x *I* são constantes e foram determinados por Sayre, 1979 (18).

Esta metodologia foi adotada para avaliar o FPS dos extratos e também das formulações cosméticas desenvolvidas.

2.6 Formulações estudadas

As formulações foram desenvolvidas a partir de creme não iônico (19) com modificações. As matérias-primas e suas concentrações estão listadas na Tabela I. Para fins comparativos, um extrato de rutina foi produzido e incorporado a uma formulação.

Tabela I. Componentes das formulações estudadas

Componentes	Quantidade dos componentes nas formulações						
	V	FQ	RUT	CAC	CCB	FQAC	FQCB
Fase A (%)							
Solução conservante de metil, propil, etil e butilparabeno e fenoxietanol	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicerina	3	3	3	3	3	3	3
Água destilada (qsp 100g)							
Fase B (%)							
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Triglicerídeos cáprico e caprílico	3	3	3	3	3	3	3
Propilenoglicol	3	3	3	3	3	3	3
Cera autoemulsionante aniônica	4	4	4	4	4	4	4
Monoestearato de glicerila	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Álcool cetosteárfílico	6	6	6	6	6	6	6
Fase C (%)							
Metoxicinamato de octila	-	3,5	-	-	-	3,5	3,5
Benzofenona-3	-	2	-	-	-	2	2
Fase D (1mg de sólidos do extrato/g emulsão)							
Extrato de <i>Annona crassiflora</i>	-	-	-	28,57	-	28,57	-
Extrato de <i>Caryocar brasiliense</i>	-	-	-	-	5,76	-	5,76
Extrato de rutina	-	-	5	-	-	-	-

V (veículo), FQ (formulação com filtros orgânicos), RUT (formulação com extrato de rutina), CAC (formulação com extrato de *Annona crassiflora*), CCB (formulação com extrato de *Caryocar brasiliense*), FQAC (formulação com filtros orgânicos e extrato de *Annona crassiflora*), FQCB (formulação com filtros orgânicos e extrato de *Caryocar brasiliense*).

2.6 Teste de toxicidade dérmica aguda e determinação do FPS *in vivo* em modelo animal

Os testes de toxicidade dérmica aguda e determinação do FPS *in vivo* foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMS, sob protocolo 477/2012. Foram utilizados camundongos (espécie *Mus musculus* linhagem Balb/C) fêmeas com peso de 30g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (12 animais) e submetidos a um ciclo de luz claro/escuro 12h. Foram alimentados com ração balanceada para ratos e camundongos (NUVITAL® CR1) e água *ad libidum*.

O teste de toxicidade dérmica (19) foi realizado com grupos de seis animais para as seguintes formulações: veículo, filtros orgânicos, extrato de *Annona crassiflora* (10%), extrato de *Caryocar brasiliense* (10%) e extrato de rutina (5%). A tricotomia do dorso foi realizada 24h antes da aplicação das emulsões (20) e as reações (edema, eritema ou escaras) foram observados nos tempos de 60 minutos, 24 horas, 72 horas e 7 dias.

A determinação do FPS *in vivo* foi realizada por adaptação da metodologia utilizada em seres humanos (21; 22). Foi determinada a Dose Eritematosa Mínima (DEM) na pele não protegida (DEM_{np}) e na pele protegida (DEM_p) com todas as formulações produzidas. O FPS é calculado pela razão entre a DEM_p/DEM_{np}. Como fonte de radiação, foi utilizada uma câmara de radiação ultravioleta (fonte de luz lâmpada fluorescente espectro de emissão 400-700nm e lâmpada TL40W/12RS Philips com espectro de emissão 270-400nm).

Os animais também foram divididos em grupos (6 animais) e realizada a tricotomia no dorso 24h antes do ensaio. Em cada animal, foi aplicada 2mg/cm² da formulação na área depilada, e estes foram expostos em grupos à câmara de radiação ultravioleta (distância de 35cm da fonte de luz) para estabelecer a DEM_p. O eritema foi observado após 20h e o ensaio foi repetido após 10 dias em novo grupo de animais para avaliar a repetibilidade intergrupo.

2. Resultados

3.1 Seleção do(s) extrato(s) com potencial fotoprotetor

Os resultados obtidos nas análises de seleção do(s) extrato(s) com maior potencial fotoprotetor estão demonstrados na Tabela II.

Tabela II. Comprimento de onda máximo de absorção no ultravioleta (λ_{\max}); Atividade antioxidante (AA) e Teor de Flavonoides Totais (TFT).

Espécie	λ_{\max} (nm)	AA* (%SRL)	TFT*	TFT - Precisão Intermediária*	TFT - Linearidade
<i>Annona crassiflora</i>	360	52,58 ± 0,80	177,67 ± 3,41	170,36 ± 6,24	y = 0,0024x + 0,0376 (R ² = 0,9996)
<i>Campomanesia adamantium</i>	220	26,09 ± 2,85	75,60 ± 1,03	73,26 ± 4,69	y = 0,0031x - 0,0667 (R ² = 0,9996)
<i>Caryocar brasiliense</i>	280	50,51 ± 2,93	190,58 ± 3,70	181,24 ± 7,30	y = 0,0024x + 0,0376 (R ² = 0,9996)
<i>Vitex cymosa</i>	230	50,26 ± 2,27	103,47 ± 1,34	101,53 ± 4,64	y = 0,0026x + 0,0203 (R ² = 0,9996)
<i>Quercetina</i>	-	58,91 ± 1,55	-	-	-

SRL - percentual de sequestro de radicais livres (%SRL); TFT expressos em rutina (mg de flavonoide/g planta seca). *valores apresentados como média ± desvio-padrão

3.2 Estudo químico direcionado a identificação de flavonoides

A análise do potencial fotoprotetor dos extratos etanólicos das folhas de *Annona crassiflora*, *Campomanesia adamantium*, *Caryocar brasiliense* e *Vitex cymosa*, mostraram que os extratos de *Caryocar brasiliense* e *Annona crassiflora* apresentaram resultados promissores quanto ao TFT e AA e também apresentaram capacidade de absorção na região ultravioleta de interesse (280-400nm), sendo, portanto, as espécies selecionadas para estudo de identificação dos flavonoides.

As fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica dos extratos etanólicos das folhas de *Annona crassiflora* e de *Caryocar brasiliense* foram avaliadas por CCDA com revelador NP-PEG, sendo encontrados indicativos de flavonoides nas fases clorofórmica do extrato de *Annona crassiflora* (ACC) e acetato de etila do extrato

de *Caryocar brasiliense* (CBA). O rendimento de cada fase obtido no processo de partição está demonstrado na Tabela III.

Tabela III. Rendimento das fases obtidas no processo de partição dos extratos de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense*.

Fase	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Caryocar brasiliense</i>
Fase hexânica	497,6 mg	1543 mg
Fase clorofórmica	1930,4 mg	769 mg
Fase acetato de etila	298 mg	945 mg
Fase hidrometanólica	421 mg	4470 mg

A fase ACC após a cromatografia em coluna e análise das frações obtidas por CCDA/NP-PEG resultou na obtenção de três frações positivas para flavonoides: ACC1 (22 mg), ACC2 (15 mg) e ACC3 (5 mg). A fase CBA após a cromatografia em coluna e análise das frações obtidas por CCDA/NP-PEG resultou na obtenção de duas frações positivas para flavonoides: CBA1 (179 mg), CBA2 (6 mg).

A análise destas frações por CLAE-DAD revelou que todas eram compostas majoritariamente por flavonoides de esqueleto tipo flavonol ou flavona, o que foi constatado pelos espectros ultravioleta de seus constituintes (Figuras 1 e 2).

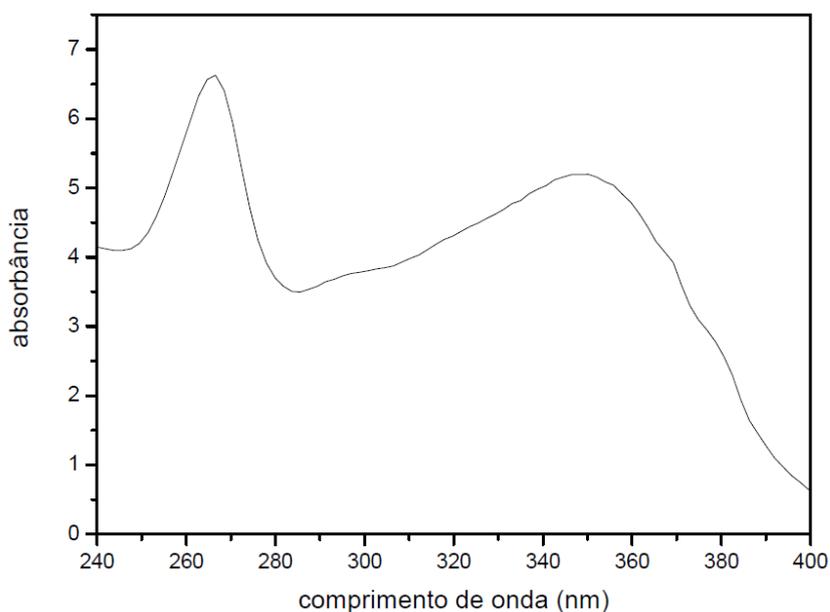


Figura 1. Espectro UV de substância da fração ACC2.

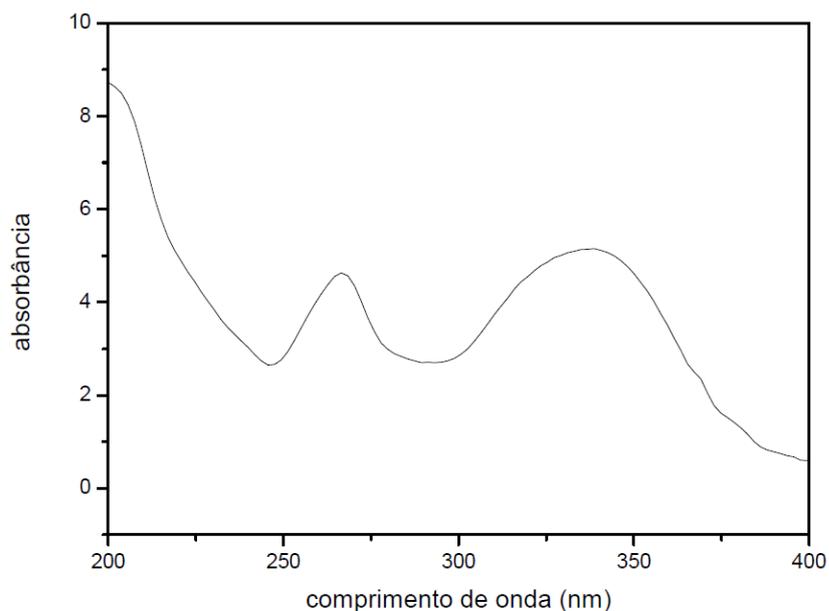


Figura 2. Espectro UV de substância da fração CBA1.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das frações ACC e CBA corroboraram com a presença de flavonoides glicosilados na composição dessas frações, sendo possível identificar por comparação com dados da literatura uma mistura de flavonóis glicosilados na fração ACC2 (quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo e quercetina-3-O- β -D-glucosídeo) e o flavonol quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo (conhecido como guajaverina) na fração ACC3 (Tabela IV). Estes resultados vêm complementar os resultados previamente obtidos com o estudo químico da fração hidroalcoólica das folhas de um espécime de *Annona crassiflora*, que resultou no isolamento dos flavonoides quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-O- α -L-arabinosídeo, conhecido como peltatosídeo, campeferol-3-O- β -D-galactopiranosídeo (2), quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- β -L-arabinopiranosídeo e também (-)-epicatequina (23).

Tabela IV. Dados de RMN de ^{13}C de ACC2 e ACC3 e comparação com flavonóis da literatura (^aMiranda et al, 2012; ^bShahat et al, 2005; ^cFraisse et al, 2000).

C	RMN ^{13}C (CD_3OD)			RMN ^{13}C (DMSO-d_6)		
	Rutina ^a	Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo ^a	Quercetina-3-O- β -D-glucosídeo ^b	ACC2	ACC3	Quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo ^c
C-2	158,5	159,2	158,40	158,98/ 158,50	156,47	156,3
C-3	135,6	136,2	135,60	135,61/ 135,41	133,71	133,6
C-4	179,4	179,6	179,40	179,49/ 179,45	177,39	177,4
C-5	162,9	163,1	163,00	163,06	161,24	161,1
C-6	100,0	99,8	99,80	100,04	99,09	98,7
C-7	166,3	165,9	166,00	166,45/ 166,38	165,41	164,6
C-8	94,9	94,7	94,70	94,82	93,81	93,5
C-9	159,3	158,4	159,00	158,98/ 158,50	156,16	156,1
C-10	105,6	105,8	105,70	105,65/ 105,57	103,57	103,7
C-1'	123,1	122,9	123,10	122,87/ 123,04/ 123,20	120,90	120,8
C-2'	117,7	116,3	117,50	117,78/ 117,55	115,76	115,6
C-3'	145,8	146,3	145,90	146,44	145,13	144,9
C-4'	149,8	149,7	149,80	149,88	148,85	148,6
C-5'	116,0	116,9	116,00	116,94/ 116,39/ 116,02	115,46	115,3
C-6'	123,5	122,8	123,20	123,59	122,08	122,0
C-1''G	104,6		104,30	104,45/ 104,35	101,57	101,4
C-2''G	75,7		75,70	75,73/ 75,03	70,84	70,7
C-3''G	78,1		79,10	78,39/ 78,12	71,79	71,6
C-4''G	71,3		71,20	71,22	66,24	66,0
C-5''G	77,1		79,3	77,27	64,46	64,2
C-6''G	68,5		62,50 CH ₂	70,01/ 62,55CH ₂ / 62,19 CH ₂		
C-1R	102,4	103,5		103,55		
C-2'''R	72,0	71,8		71,92		
C-3'''R	72,2	72,0		72,04		
C-4'''R	73,9	73,2		73,27/ 73,18		
C-5'''R	69,7	72,0		70,01		
C-6'''R	17,8	17,6		17,66		

^a(24); ^b(25); ^c(26). G = glucose; R = ramnose

3.4 Determinação do FPS *in vitro* e *in vivo* e ensaio de toxicidade dérmica

Na avaliação da toxicidade dérmica das formulações pelo ensaio *in vivo* não foram observados efeitos adversos visíveis na pele dos animais do tipo de eritema, escaras ou queimaduras. Os resultados obtidos na determinação do FPS *in vitro* e *in vivo* estão apresentados na Tabela V.

Tabela V. Dados de FPS obtidos para os estratos vegetais e formulações estudadas.

Amostra	FPS <i>in vitro</i>*	FPS <i>in vivo</i>
EAC	10.66 ± 0.94	-
ECB	22.21 ± 0.07	-
ER	27.71 ± 0.13	-
Veículo	0,20 ± 0,02	0,0
FQ	7,05 ± 0,22	7,0
RUT	0,26 ± 0,13	2,0
CAC	0,21 ± 0,02	1,5
CCB	0,22 ± 0,04	2,0
FQAC	6,61 ± 0,27	7,0
FQCB	7,04 ± 0,15	7,0

*valores apresentados como média ± desvio-padrão. EAC – Extrato de *Annona crassiflora*, ECB – Extrato de *Caryocar brasiliense*, ER – Extrato de Rutina, FQ – Formulação com filtros orgânicos, RUT – formulação com extrato de rutina, CAC – formulação com extrato de *Annona crassiflora*, CCB – formulação com extrato de *Caryocar brasiliense*, FQAC – Formulação com filtros orgânicos e extrato de *Annona crassiflora*, FQCB – Formulação com filtros orgânicos e extrato de *Caryocar brasiliense*.

4. Discussão

A absorção de uma substância em regiões diferentes do espectro ultravioleta é resultante de sua natureza química, sendo que as plantas que se destacam por possuírem uma ampla absorção de radiação na região ultravioleta são, em sua maioria, produtoras de uma mistura complexa de compostos fenólicos, tais como flavonoides, taninos e antraquinonas (13). O extrato etanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* apresentou

banda de absorção máxima próxima a 280nm, região de radiação UVB, causadora de eritema, que é um marcador biológico de danos à pele. (27). O extrato de *Annona crassiflora*, apresentou banda de absorção máxima próxima a 360 nm, região de radiação UVA, cujos raios têm sido extensivamente relacionados ao câncer de pele, fotoimunossupressão e fotoenvelhecimento (28).

A procura por ativos de origem vegetal ricos em substâncias de núcleo flavonoide tornou-se uma vertente em fotoproteção, visto que estes constituintes são formados por um núcleo benzopirano ou cromano, unido a anel aromático, caracterizado por um esqueleto C6-C3-C6, cuja semelhança estrutural aos filtros químicos torna possível a absorção de radiação na região do ultravioleta (6; 29; 30).

A avaliação da capacidade de absorção de radiação na região ultravioleta das espécies estudadas demonstra que *C. brasiliense* e *A. crassiflora* apresentam constituintes químicos com capacidade de absorver no comprimento de onda da região ultravioleta. No estudo químico adaptado à detecção/identificação dos flavonoides, tanto os espectros UV, quanto de RMN de ^1H e ^{13}C apresentaram sinais compatíveis com esqueletos do tipo flavonol e flavona.

No estudo químico do extrato de *Caryocar brasiliense* os espectros de RMN indicaram tratar-se de flavonoides glicosilados devido a presença de sinais no espectro de RMN de ^1H entre 3,0 e 5,0 e no espectro de ^{13}C entre 60 e 104 ppm, compatíveis com hidrogênios e carbonos carbinólicos. Os flavonoides glicosilados isolados do extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* confirmam os dados obtidos na avaliação do teor total de flavonoides, bem como com as atividades observadas, pois se tratam de compostos capazes de exercer atividade antioxidante e de ampla absorção na região do ultravioleta.

O espectro ultravioleta de flavonóis e flavonas apresenta duas bandas de absorção na região de 240-400nm, sendo a banda I (300-380nm) e banda II (240-280 nm). A banda I está associada à absorção da radiação UV pelo anel B do esqueleto flavonoide, enquanto a banda II está associada à absorção pelo anel A da estrutura. A banda I fornece informações sobre o tipo de esqueleto do flavonoide, bem como sobre o seu padrão de oxidação (33).

Os espectros de UV obtidos pela análise por CLAE-DAD das frações ACC1, ACC2 e ACC3, mostraram-se compatíveis a flavonóis glicosilados na hidroxila ligada ao carbono-3, com máximo de absorção para a banda I do espectro de UV próximo a 360 nm. A análise das bandas I dos componentes das frações CBA não foi conclusiva quanto aos tipos de esqueletos de flavonoides que compõem estas frações, uma vez que o máximo de absorção foi próximo a 350 nm, podendo tratar-se de um esqueleto flavonol glicosilado ou de uma flavona (33).

O TFT apresentado pelos extratos etanólicos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Vitex cymosa* foram próximos e podem ser relacionadas à atividade de sequestro de radicais livres apresentada por estas espécies. Existem diversos métodos para avaliar a capacidade de um extrato/substância em promover a atividade antioxidante, sendo que a metodologia adotada enfoca a capturação de um radical livre.

O organismo humano é capaz de defender-se contra os danos UV em virtude da ação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, mas a exposição excessiva e crônica a radiações UV e outros radicais livres pode lesar esse mecanismo de defesa natural (31). Estas moléculas atuam principalmente no espectro da região UVA (320-400nm), gerando proteção contra danos moleculares no DNA e danos relacionados ao estresse oxidativo celular (32).

O papel de substâncias naturais em fotoproteção tem sido associado à capacidade de absorção na região do UVB e UVA, à habilidade de neutralizar radicais livres e/ou compostos oxidantes e geração de mediadores químicos que inibem os danos causados pela excessiva exposição à radiação solar. Ao longo do processo evolutivo é notada a permanência da expressão de genes que regulam o metabolismo de constituintes como os flavonoides que exercem estas funções nas plantas (30).

Dentre os flavonoides, alguns requisitos estruturais chave são necessários para que a molécula apresente essa multiplicidade de atividades: grupo OH na posição 3 como em flavonóis, dupla ligação em C2 e C3 e o grupo catecol em C3' e C4'. Estes requisitos são satisfeitos pela aglicona quercetina (30), sendo que esta aglicona está comprovadamente presente no extrato das folhas de *Annona crassiflora*, como identificado na fração ACC3.

As espécies estudadas apresentaram flavonoides em sua composição e quando avaliados os extratos isoladamente, o FPS apresentado foi bastante promissor, justificando sua incorporação em formulações cutâneas. Após a incorporação, foi observado um decréscimo no FPS *in vitro*, que pode ser devido às características físico-químicas do extrato e ao método de incorporação às formulações cosméticas. Vale ressaltar que o método espectrofotométrico quantifica a capacidade absorptiva na região UVB e pode ser que a maior parte das substâncias encontradas absorvam mais na região UVA (29). Outras espécies que também apresentaram potencial fotoprotetor e após incorporação em formulação cosmética tiveram um decréscimo de atividade podem ser citadas como o *Ginkgo biloba* (35), extrato do vinho de uvas *Jacquez* (36) e a rutina (37).

No ensaio *in vivo*, o FPS encontrado foi superior ao observado *in vitro*, atividade esta que pode ser relacionada à capacidade de sequestro de radicais livres ou absorção na região UVA apresentada pelos flavonoides presentes nos extratos. Os benefícios da incorporação de antioxidantes em fotoprotetores estão relacionados diretamente a capacidade de neutralização de radicais livres e incluem redução do eritema, da incidência de câncer cutâneo, do fotoenvelhecimento e de fotoimunossupressão, sendo estas atividades biológicas estritamente relacionadas à proteção contra a radiação UVA (34).

5. Conclusão

Conclui-se que as espécies *A. crassiflora* e *C. brasiliense* mostraram-se com potencial atividade fotoprotetora, sendo que nas folhas de *A. crassiflora* foi identificado o flavonoide guaijaverina, cuja aglicona apresenta ação fotoprotetora; e nas folhas de *C. brasiliense* os resultados sugerem a presença de flavonoides com esqueleto do tipo flavonol ou flavona. Sugere-se que estes extratos apresentem maior capacidade fotoprotetora quanto a radiação UVA, pois o FPS *in vitro*: dos extratos foi superior ao apresentado após a incorporação nas formulações, porém o FPS *in vivo* após a incorporação dos extratos foi superior ao observado *in vitro*.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a FUNDECT/MS pelo suporte financeiro.

7. Referências bibliográficas

1. Araújo TS, Souza O. Protetores solares e o efeito da radiação ultravioleta. *Scientia plena*, v. 4, n.11, 2008.
2. Maw KL, Caton-Williams J, Salon J, Huang Z. Simple ultraviolet and high-performance liquid chromatography for the evaluation of sunscreen efficacy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 65, n. 2, p.328-335, ago., 2011
3. Sambandan DR, Ratner D. Sunscreens: an overview and update. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.64, n.4, abr., p.748-758, 2011
4. Machado H, Nagem TJ, Peters VA, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Bol. Cent. Biol. Reprod., Juiz de Fora*, v.27, n.1/2, p.33-39, jan./dez., 2008
5. Silva GM. Potencial antioxidante de frutos do Cerrado e do Pantanal, no estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado) – Campo Grande, 77f. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010
6. Munhoz VM; Lonni AASG; Mello JCP; Lopes GC. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2012;33(2):225-232
7. Wang SQ, Osterwalder U, Jung K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.25, n.6, p.525-530, set., 2011
8. Aquino R, Morelli S, Tomaino A, Pellegrino M, Saija A, Grumetto L, Puglia C, Ventura D, Bonia F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (2002) 183–191
9. Roesler R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 31, n.1, p.93-100, jan.-mar., 2011
10. Almeida ACA. Análise dos mecanismos antioxidantes na atividade antiulcerogênica de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae). 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em

Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010

11. Coutinho ID, Coelho RG, Kataoka VMF, Honda NK, Silva JRM, Vilegas W, Cardoso CAL. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. Ecl. Quím., São Paulo, n. 33, v.4, p.53-60, 2008

12. Miranda-Vilela AL. Avaliação dos efeitos antígenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa e fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB.). Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 2009

13. Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.19,n.2A, p.452-457, Abr./Jun. 2009

14. Chabariberi RAO, Pozzi ACS, Zeraik ML, Yariwake JH. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(4): 860-864, Out./Dez. 2009

15. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(2): 446-452, abr.-jun. 2006

16. Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCD, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. Anal Bras Derm, 61 (3), p. 121-124, 1986

17. Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. *Photochem. Photobiol.*, Oxford, v. 29, p. 559-566, 1979

18. Brasil, Ministério da Saúde, Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2ª edição – Revisão 02, Brasília, 2012, 224 pgs

19. Hubinger SZ. Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (LEGUMINOSAE-

CAESALPINIOIDEAE). Dissertação (Mestrado). Araraquara, 150f. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009

20. Zakzewski CA, Wasilewski J, Cawley P, Ford W. Transdermal delivery of regular insulin to chronic diabetic rats: effect of skin preparation and electrical enhancement. *Journal of Controlled Release*, 50: 267-272, 1998

21. Colipa Guidelines. International sun protection factor (SPF) test method. Colipa, CTFA SA, JCIA, CTFA, maio, 2006

22. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Controle de qualidade de Produtos cosméticos. 2ª edição, revista – Brasília, ANVISA, 2008

23. Lage GA, Medeiros Fda S, Furtado Wde L, Takahashi JA, de Souza Filho JD, Pimenta LP. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. *Nat. Prod. Res.* 2014; 28 (11): 808-11. doi 10.1080/14786419.2014.885518. Epub 2014 Feb 26

24. Miranda MLD, Souza AF, Rodrigues ED, Garcez FR, Garcez WS. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (LEGUMINOSAE). *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 7, 1306-1311, 2012

25. Shahat AA, Nazif NM, Abdel-Azim NS, Pieters L, Vlietinck AJ. Flavonoids from *Cressa Cretica*. *Qatar Univ. Sci. J.* (2005), 25:72-77

26. Fraisse D, Heitz A, Carnat A, Carnat AP, Lamaison JL. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora* *Fitoterapia* 71 2000. 463-464

27. Aguilera J, Gálvez MV, Sánchez C, Herrera-Ceballos E. Changes in photoinduced cutaneous erythema with topical application of a combination of vitamins C and E before and after UV exposure. *Journal of Dermatological Science* 66 (2012) 216–220

28. Polonini HC, Dias RMP, Souza IO, Gonçalves KM, Gomes TBB, Raposo NRB, Silva AD. Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.046>

29. Velasco MVR, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto Caso, Kaneko TM, Baby AR. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (1): 23-7 (2008).
30. Agati G, Brunetti C, Ferdinando MD, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>
31. Gregoris E, Fabris S, Bertelle M, Grassato L, Stevanato R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics* 405 (2011) 97–101
32. Gálvez MV. Antioxidants in Photoprotection: Do They Really Work?. *Actas Dermosifiliogr.* 2010; 101(3):197-200
33. Mabry TJ; Markham KR; Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York Inc. 1970. 354P.
34. Chen L, Hu JY, Wang SQ. The role of antioxidants in photoprotection: A critical Review. *J Am Acad Dermatol*, p. 1-12, mar., 2009
35. Belo SD. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Gingko biloba*. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.
36. Spagna G, Tomaino A, Cimino F, Barbagallo RN, Ventura D, Bonina F, Saija A. Chemical analysis and photoprotective effect of an extract of wine from *Jacquez* grapes. *J Sci Food Agric* 82:1867–1874 (online: 2002)
37. Balogh TS, Velasco MVR, Pedriali CA, Kaneko TM, Baby AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(4):732-42

6. Anexos

6.1 Testes de controle de qualidade físico-químico e microbiológico

Foram realizados testes de controle de qualidade preliminar (período de 20 dias) das formulações produzidas (1). Os testes de estabilidade físico-química (Tabela 1) avaliam a qualidade da formulação quanto a alterações reológicas e de separação de fases. Pode-se observar que o pH manteve-se dentro dos limites adequados ao pH cutâneo (entre 5,5 e 6,5). Quanto à estabilidade física, não houve separação de fases de nenhuma formulação durante a exposição aos períodos de centrifugação.

Tabela 1. Testes de estabilidade físico-química preliminar.

Formulação	pH					Centrifugação					Estresse térmico				
	1	5	10	15	20	1	5	10	15	20	1	5	10	15	20
V	5,7	5,6	5,9	6,1	6,1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FQ	6,0	5,9	5,9	6,5	6,1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CAC	5,7	5,7	5,9	6,4	6,1	N	N	N	N	N	A	A	A	A	A
CCB	5,7	5,9	5,9	6,3	6,1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FQAC	5,7	5,6	5,6	5,9	6,1	N	N	N	N	N	A	A	A	A	A
FQCB	5,8	5,8	6,0	6,4	6,0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N = não houve separação de fases. A = separação de fases

. Foi observada instabilidade no teste de estresse térmico, onde as formulações contendo extrato de *Annona crassiflora* não foram estáveis e ocorreu solubilização da formulação com conseqüente separação de fases. A concentração de extrato vegetal adicionada às formulações foi na proporção de 1mg de sólidos/g de emulsão. O extrato de *A. crassiflora* teve de ser adicionado em maior proporção e a instabilidade neste ensaio pode ser devido a este fato.

Durante o período de 20 dias, também foi realizada medida do FPS das formulações (Tabela 2), a fim de avaliar se os ativos presentes e os extratos apresentavam o valor de FPS encontrado no início dos testes. É preconizada a dosagem do teor de ativo numa formulação cosmética como um dos testes de controle de qualidade e optou-se por fazer a medida do FPS das formulações.

Tabela 2. Teste do FPS por espectrofotometria durante o controle de qualidade preliminar.

Formulação	FPS*				
	1	5	10	15	20
V	0,22±0,07	0,21±0,12	0,17±0,07	0,21±0,12	0,17±0,10
FQ	7,44±0,10	7,07±0,07	7,19±0,11	7,04±0,14	6,64±0,16
CAC	0,22±0,05	0,22±0,07	0,21±0,01	0,22±0,06	0,21±0,06
CCB	0,26±0,09	0,22±0,08	0,20±0,01	0,21±0,06	0,20±0,04
FQAC	6,75±0,11	6,38±0,08	6,31±0,12	6,91±0,12	6,37±0,15
FQCB	7,19±0,07	6,86±0,38	7,09±0,08	7,14±0,12	6,97±0,17

*valores expressos como média ± desvio-padrão.

As características organolépticas das formulações estão demonstradas na Tabela 3. Pode-se notar que o aspecto observado nas formulações foi dependente do extrato vegetal, e que o extrato etanólico de *Annona crassiflora* adicionado em maior volume a formulação também alterou as características de odor. Não foram observadas alterações das características durante os dias da análise de controle de qualidade preliminar.

Tabela 3. Características organolépticas das formulações.

Formulação	Características organolépticas		
	Cor	Odor	Aspecto
V	branco	inodoro	opaco
FQ	branco	característico	opaco
CAC	Esverdeado	Levemente alcoólico	opaco
CCB	bege	característico	opaco
FQAC	Esverdeado	Levemente alcoólico	opaco
FQCB	bege	característico	opaco

O controle de qualidade microbiológico foi realizado pelo Teste do Desafio frente aos microorganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) e *Escherichia coli* (ATCC8739) (1). As

formulações produzidas e uma formulação ausente de conservantes foram inoculadas com os micro-organismos descritos e incubadas por período de no mínimo 72 horas. Segundo a legislação, mesmo após a contaminação da amostra com os micro-organismos, estas não podem apresentar crescimento microbiano. Foi observado crescimento dos respectivos microorganismos apenas na formulação sem conservantes, sendo, portanto considerado como eficaz o sistema conservante escolhido para as formulações.

6.2 Construção da câmara de simulação da radiação ultravioleta

Com o objetivo de determinar o FPS *in vivo*, foi construída uma câmara de simulação da radiação solar. A fonte de radiação de um simulador solar deve abranger tanto o espectro visível quanto o ultravioleta (2; 3; 4; 5; 6). A figura 2 mostra o espectro solar padrão em um dia de pouca nebulosidade.

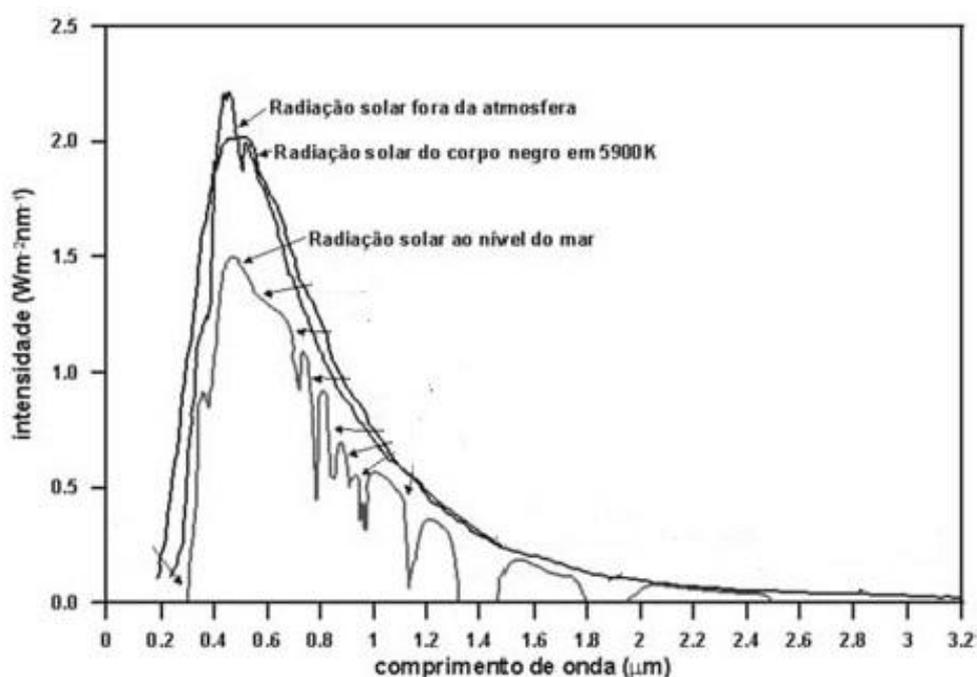


Figura 2. Curva do espectro de emissão da radiação solar. (7)

O valor de FPS de um protetor solar pode ser alterado dependendo da fonte de luz utilizada, portanto recomenda-se o uso de fontes que emitam um espectro o mais próximo ao da luz natural para que o resultado obtido possa ser relacionado *in vivo* (8).

Para os testes de determinação do FPS in vivo, foi construída uma câmara de simulação de radiação ultravioleta. Esta foi construída em material de MDF nas dimensões de 35cm (altura) x 35cm (largura) x 110cm. Foram utilizadas uma lâmpada fluorescente branca, que emite a luz no espectro visível e uma lâmpada ultravioleta modelo Philips TL40/RS (40W) que emite luz no espectro ultravioleta. A Figura 3 demonstra o espectro de emissão das lâmpadas utilizadas, mensurado no Instituto de Física da UFMS.

A câmara de simulação da radiação solar montada foi eficaz em ocasionar o eritema na pele dos animais, possibilitando a padronização de ensaio em modelo animal para a determinação do FPS.

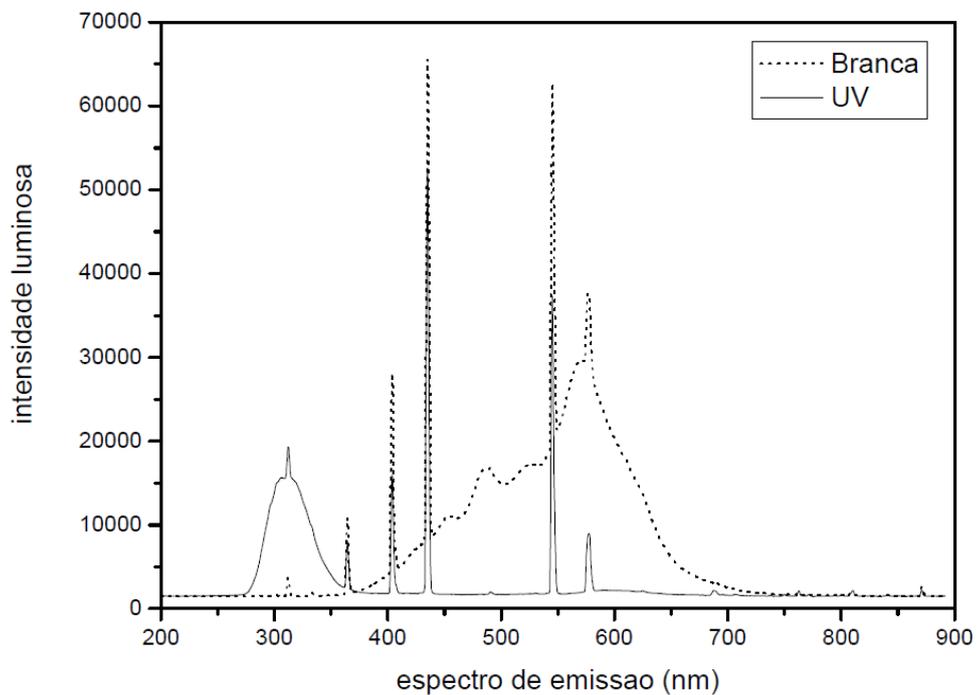


Figura 3. Espectro de emissão de radiação da caixa de simulação da radiação ultravioleta.

Referências bibliográficas

1. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Controle de qualidade de Produtos cosméticos. 2ª edição, revista – Brasília, ANVISA, 2008
2. VILELA FMP, FONSECA YM, JABOR JR, VICENTINI FTMC, FONSECA MJV. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80 (2012), 387-392
3. MCVEAN M, LIEBLER DC. Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Molecular Carcinogenesis*, 24: 169-176, 1999
4. MARTORANA M, ARCORACI T, RIZZA L, CRISTANI M, BONINA FB, SAIJA A, TROMBETTA D, TOMAINO A. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia* 85 (2013) 41–48
5. HILLEBRAND GG, WINSLOW MS, BWNZINGER MJ, HEITMEYER DA, BISSET DL. Acute and chronic ultraviolet radiation induction of epidermal ornithine decarboxylase activity in hairless mice. *Cancer Research*, 50: 1580-1584, mar., 1990
6. VINCENTINI FTMC, SIMI TRM, DEL CIAMPO JO, WOLGA NO, PITOL DL, IYOMASA MM, BENTLEY MVLB, FONSECA MJV. Quercetin in w/o microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2008) 948-957
7. ECHER MPS, MARTINS FR, PEREIRA EB. A importância dos dados de cobertura de nuvens e de sua variabilidade: Metodologias para aquisição de dados. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 28, n. 3, p. 341-352, (2006)
8. MIURA Y, SUZUKI S, HIRAO T, HATAO M. Light Source Spectrum Strongly Influences the In Vitro Estimation of Sun Protection Factor. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88: 1005–1011

6.3 Determinação do FPS in vivo - Fotos

a) Antes da exposição à radiação ultravioleta



b) Efeito eritematogênico da Dose Eritematosa Mínima – pele não protegida

