

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIEGUE HENRIQUE NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOQUIMIOPREVENTIVA DAS ESPÉCIES
VEGETAIS PROVENIENTES DO CERRADO BRASILEIRO: *Erythroxylum*
daphnites Mart. E *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.**

BRASÍLIA, 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIEGUE HENRIQUE NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOQUIMIOPREVENTIVA DAS ESPÉCIES
VEGETAIS PROVENIENTES DO CERRADO BRASILEIRO: *Erythroxylum*
daphnites Mart. E *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

**Orientadora: Prof. Dra. Yris Maria
Fonseca-Bazzo.**

BRASÍLIA, 2019

DIEGUE HENRIQUE NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOQUIMIOPREVENTIVA DAS ESPÉCIES
VEGETAIS PROVENIENTES DO CERRADO BRASILEIRO: *Erythroxylum
daphnites* Mart. E *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.**

Tese apresentada como requisito para obtenção do Título de
Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____ de _____ de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo - Presidente

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB

Dr. Christopher William Fagg – Suplente

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB

Dra. Pérola Oliveira Magalhães

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB

Dra. Maria de Fátima Borin

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB

Dra. Liana Guimarães Sachett Peterson

União Pioneira de Integração Social - UPIS

BRASÍLIA, 2019

Dedico esse trabalho a minha amada avó Bernadete (*in memoriam*) por todo o seu amor e apoio ofertado ao seu neto “Dedê”. A minha mãe Elizabete Ferreira por ser um exemplo de caráter e dedicação, ao meu “paidrasto” Luiz José pelo exemplo de perseverança e ao meu irmão Matheus por serem a melhor base familiar que eu poderia ter. Amo todos vocês.

Em momentos de crise, só a imaginação é mais

Importante que o conhecimento

Massoud Hassani

O importe é não deixar de fazer perguntas

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo por todas as oportunidades que me foram atribuídas e por enriquecer os meus dias com tamanho conhecimento. Sou grato por toda dedicação, responsabilidade, compromisso, competência, humildade e por ter acreditado em mim do início ao fim, sinto um carinho imenso por ti. A bagagem de conhecimento que eu obtive por intermédio dos seus conselhos e ensinamentos serão levados comigo para sempre. Muito obrigado por tudo.

A professora Dra. Damaris Silveira por ter sido a pessoa responsável por abrir as portas desse mundo científico e por seu acolhimento e todos os conselhos quando iniciei os meus primeiros passos como pesquisador, até os dias de hoje.

A professora Dra. Pérola Oliveira Magalhães por todos os votos de confiança e pelo incentivo e estímulos, além dos conselhos sobre a vida.

Aos professores Maurício Homem de Melo, Luiz Simeone e Maria de Fátima Borin pelo incentivo e sugestões para a melhora deste trabalho.

Referente a coleta do material botânico, deixo os meus mais sinceros agradecimentos aos amigos Patrícia Marques Rodrigues, Juliana Freitas Ferreira, Lorena Ferreira Gomes e a Ana Beatriz, que me acompanharam nas aventuras pela Fazenda Água Limpa (FAL – UnB). Aproveito para deixar os meus agradecimentos em especial ao professor Dr. Christopher William Fagg e mais uma vez a professora Dra. Yris por toda disposição em me acompanhar nas coletas e dividir todos os seus conhecimentos durante essas aventuras.

Aos alunos de estágio que passaram pelo nosso Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos e Laboratório de Produtos Naturais: Priscila de Barros Veiga, Victória Baggi, Ana Beatriz Alves de Oliveira, Eduardo de Jesus Lima Nepomuceno, Tamiris Rodrigues da Cista Aguiar, Luana Rossi, Victor Hugo S. Bezerra, Ana Júlia Barbosa, Beatriz Martins e Letícia L. Abrunhosa. O meu aprendizado só foi mais enriquecedor porque tive a oportunidade de trabalhar ao lado de todos vocês.

Aos meninos da Iniciação Científica Andressa Ândria Marrins Ribeiro, Ana Beatriz Alves de Oliveira e Eduardo de Jesus Nepomuceno. Além do privilégio de co-orientar meninas incríveis, esforçadas e meninas muito dedicadas como a Carina

Freitas França e Carolina Matos. O aprendizado obtido ao trabalhar com vocês foi imensurável e a minha jornada tornou-se uma aventura inesquecível.

Aos amigos Matheus Kiyoshi Silva Alimura, Frederico Milhomem, João Pedro de Oliveira Dutra e João Henrique de Oliveira Dutra, Renan Ferreira Costa, Blenda da Silva Martins, Yann Martins, Luana Bernades e Daniele Bernardes por toda paciência, comprometimento e esforço para manter nossa amizade intacta. Obrigado por não desistirem de mim enquanto eu estava tão ausente. Todo meu tempo ao lado de vocês sempre é maroto e sensacional. Grato a Deus por tê-los em minha vida.

Aos colegas de bancada dos Laboratórios de Controle da Qualidade e Laboratório de Produtos Naturais: Marcela Medeiros de Freitas, Amanda de Assis Carneiro, Gabriela Werneck, Marline Dassoler, Luana Lima da Cunhas, Raquel Dall Agnol, Julia Muller, Thais Barros, Kellen Cruvinel, Gislane Santos, Gabriela Rosso, Amanda Torres, Manuel Mera, João Victor Dutra, Mayara Leão que contribuíram de forma direta e indireta.

Aos amigos Renata P. C de Almeida, Patrícia Marques Rodrigues, Juliana Freitas, Samuel Cardoso Leite, João Victor Dutra, Paula Monteiro de Souza e Dalila R. de Lima Pádua, deixo os meus sinceros agradecimentos por tudo o que aprendi sendo companheiro de bancada de todos vocês. Foi muito importante ter vocês para dividir a alegria das novas descobertas e frustrações das coisas que sempre “precipitavam”. Quero perdurar a nossa amizade por toda a vida.

Preciso agradecer em especial a dois membros do grupo “Gnomos da Yris” Lorena Ferreira Gomes e Yuri Yabu de Barros. Sinto muita saudade das nossas aventuras e gargalhadas do dia-a-dia. A vida nos deu novos rumos, mas o importante é que sempre carreguei vocês no coração. Vlws

A toda minha família, por acreditarem em minha capacidade e por não me abandonarem nos meus momentos mais difíceis. Passamos por muitas coisas, mas vencemos unidos e amo os meus pais (Elizabeth e Luiz) e irmão (Matheus) mais que sorvete de flocos. Vocês são a minha base e as minhas inesgotáveis fontes de motivação. Sou extremamente abençoado por tê-los sempre ao meu lado.

Aos professores e companheiros da UPIS Esp. Diogenes A. de Moraes, Felipe Augusto Snel, Msc. Guizelle A. de Alcantara, Dra. Liana G. S. Petresen e a minha coordenadora extremamente paciente, tolerante e compreensível Dra. Fernanda Mulinari Fontana. Meus mais sinceros agradecimentos por todas as oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) sob projeto 6059 - FAP – “Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva de *Erythroxylum suberosum* proveniente do Cerrado brasileiro” e a Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC) pelo suporte financeiro.

Aproveito para dizer que os dias que passei dentro do laboratório com os meus amigos de trabalho foram inesquecíveis. Não me importa a parte difícil neste momento, eu só consigo me recordar das coisas boas, sinto-me inteiramente privilegiado por ter conhecido tantas pessoas inteligentes e incríveis, que dividiram um pouco de seus conhecimentos comigo. Sinto-me inteiramente grato a Deus por esta oportunidade e privilégio.

RESUMO

A exposição à radiação ultravioleta é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças que acometem a pele. As radiações UVA e UVB são responsáveis pela diminuição de sistemas antioxidantes cutâneos, pelo aumento de sistemas oxidantes e influenciam na alteração do balanço redox celular. Pensando-se em prevenir e criar terapias para doenças envolvidas com radiação solar, busca-se formas para restabelecer a homeostasia celular utilizando substâncias antioxidantes e sequestradoras de espécies reativas oxidativas. Extratos aquosos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum* foram padronizados em relação aos: conteúdo de polifenóis, cromatografias de camada delgada CCD (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE), atividade antioxidante por DPPH[•] e inibição da formação de complexo fosfomolibdênio. O IC_{50} capaz de inibir a atividade doadora de DPPH[•] foi estabelecido e a equivalência de ácido ascórbico dos lotes capazes de inibir a formação do complexo fosfomolibdênio foi avaliada. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT em fibroblastos (3T3-L1). Formulações tópicas foram produzidas com a incorporação desses extratos e o FPS foi avaliado. O IC_{50} da atividade antioxidante avaliada variou de 5,15 a 7,97 $\mu\text{g/mL}$ (*E. daphnites*) e 5,46 a 6,31 $\mu\text{g/mL}$ (*E. suberosum*). Entre os lotes padronizados, a variação do equivalente de ácido ascórbico foi de 4,87 a 5,49 $\mu\text{g/mL}$ (*E. daphnites*) e 4,02 a 6,17 $\mu\text{g/mL}$ (*E. suberosum*). A CCD e a CLAE revelaram mesmo perfil cromatográfico para os lotes de *E. daphnites* com presença de ácido neoclorogênico. Os lotes de *E. suberosum* apresentaram mesmo perfil cromatográfico com presença de hiperosídeo em CCD e mesmo perfil cromatográfico por CLAE com presença de ácido neoclorogênico e hiperosídeo. De acordo com as diretrizes do RE N.º 899/03 da Anvisa, em consonância com a RDC 166/2017 e com base na IN N.º 4/14, a metodologia foi validada para os lotes de *E. suberosum* com o marcador hiperosídeo. Não foi observada citotoxicidade frente a linhagem celular quando utilizada a faixa de concentração variando de 0,02 a 1 mg/mL para as duas espécies de *Erythroxyllum*. Ambas formulações apresentaram ~1 de FPS. Mesmo esses extratos não apresentando FPS satisfatório, foi observado potencial antioxidante dos extratos padronizados dessas espécies.

Palavras-chave: *Erythroxyllum daphnites*, *Erythroxyllum suberosum*, antioxidante, padronização.

ABSTRACT

Exposure to ultraviolet radiation is risk factor for the development of skin diseases. The UVA and UVB radiations can be responsible for reduction of skin antioxidant systems, by the increase of oxidizing systems, influencing the cellular redox balance movement. In order to prevent and create therapies for diseases involving solar radiation, we looked for ways to restore cellular homeostasis, using antioxidant substances and hijacking reactive oxidative species. Thus, aqueous extracts of *Erythroxyllum daphnites* and *Erythroxyllum suberosum* were standardized for their total solids content, yield, polyphenol content, antioxidant activity by DPPH[•] inhibition and by inhibition the formation of phosphomolybdenum complex, Thin Layer Chromatography TLC and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The IC_{50} capable of DPPH[•] inhibiting activity and ascorbic acid equivalence of inhibiting phosphomolybdenum complex were also established. Cytotoxicity was assessed by MTT assay in fibroblasts (3T3). Antioxidant activity evaluated in IC_{50} ranged from 5.15 to 7.97 $\mu\text{g/mL}$ (*E. daphnites*) and 5.46 to 6.31 $\mu\text{g/mL}$ (*E. suberosum*). Among the standard lots, a variation of ascorbic acid was 4.87 to 5.49 $\mu\text{g/mL}$ (*E. daphnites*) and 4.02 to 6.17 $\mu\text{g/mL}$ (*E. suberosum*). The TLC showed the same chromatographic profile for *E. daphnites* lots and the presence of neochlorogenic acid. *E. suberosum* lots presented the same chromatographic profile with the presence of hyperoside and the same result was achieved for the chromatographic profiles by HPLC for both species, plus the presence of neochlorogenic acid for *E. suberosum* batches. According to the ANVISA guidelines N. 899/03 and based on RDC 166/17 on IN N. 4/14, the validated methodology for *E. suberosum* lots with the hyperoside standard. No cytotoxicity was observed for this cell when used concentrations ranging from 0.02 to 1 mg/mL here used *Erythroxyllum* species and viability was about 100%. Both formulations showed ~ 1 FPS. Even though extracts did not present satisfactory FPS, the antioxidant potential of the standardized extracts of these species was observed.

Key words: *Erythroxyllum daphnites*, *Erythroxyllum suberosum*, antioxidant activity, standardization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	CERRADO	23
1.2	FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE E GÊNERO <i>ERYTHROXYLUM</i>	25
1.3	<i>ERYTHROXYLUM DAPHNITES</i>	26
1.4	<i>ERYTHROXYLUM SUBEROSUM</i>	28
1.5	PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS	29
1.6	RADIAÇÃO SOLAR E EFEITOS DELETÉRIOS	32
1.6.1	<i>Protetores solares</i>	36
1.6.2	<i>Desafio para o mercado de consumidores frente aos protetores solares</i>	40
2	OBJETIVOS	45
2.1	OBJETIVO GERAL	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS	47
3.1.1	<i>Obtenção do material vegetal</i>	47
3.1.2	<i>Obtenção dos extratos brutos</i>	49
3.1.3	<i>Preparo dos extratos aquosos brutos de <i>Erythroxyllum daphnites</i> e <i>Erythroxyllum suberosum</i></i>	49
3.1.3.1	<i>Determinação de teor de extraíveis</i>	51
3.1.3.2	<i>Determinação de Rendimentos Extrativos (%)</i>	51
3.1.3.3	<i>Polifenóis Totais</i>	52
3.1.4	<i>Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos</i>	53
3.1.4.1	<i>Definição do perfil cromatográfico</i>	53
3.1.4.2	<i>Perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	53
3.1.4.3	<i>Perfil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	54
3.1.5	<i>Validação da metodologia de determinação dos teores de ácido neoclorogênico em <i>Erythroxyllum daphnites</i>. Ácido neoclorogênico e hiperosídeo em <i>Erythroxyllum suberosum</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	55
3.1.5.1	<i>Linearidade</i>	56
3.1.5.2	<i>Limite de Detecção</i>	56
3.1.5.3	<i>Limite de Quantificação</i>	56
3.1.5.4	<i>Seletividade</i>	57
3.1.5.5	<i>Precisão</i>	57
3.1.5.6	<i>Exatidão</i>	58
3.1.6	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	59

3.1.6.1 Atividade redutora do radical DPPH [*]	59
3.1.6.2 Atividade de inibição da formação do complexo Fosfomolibidênio	60
3.2 CITOTOXICIDADE	60
3.2.1 Linhagem celular e cultivo	60
3.2.2 Curva de densidade celular	62
3.2.3 Citotoxicidade celular	62
3.2.3.1 Avaliação da influência dos extratos frente ao reagente MTT	63
3.2.3.2 Determinação da porcentagem de viabilidade celular	63
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO <i>IN VITRO</i>	64
3.3.1.1 Fonte ultravioleta	64
3.3.1.2 Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 frente a exposição UV	65
3.3.1.3 Determinação do nível de glutathiona reduzida	66
3.3.2 Avaliação da atividade enzimática	67
3.3.2.1 Inibição de tirosinase	67
3.3.2.2 Preparo das formulações	68
3.3.2.3 Determinação da atividade antioxidante das formulações	69
3.3.3 Determinação de FPS	70
3.3.3.1 Determinação de FPS por guia COLIPA	70
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS	73
4.1.1 Teor de umidade	73
4.1.2 Teor de extraíveis	73
4.1.3 Determinação do rendimento	76
4.1.4 Polifenóis totais	78
4.1.5 Perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	81
Perfil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	85
4.1.6 Validação CLAE - DAD	87
4.1.6.1 Limite de detecção (LD e limite de quantificação (LQ)	87
4.1.6.2 Linearidade	88
4.1.6.3 Precisão	89
4.1.6.4 Seletividade	90
4.1.6.5 Exatidão	101
4.1.6.6 Quantificação dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum daphnites</i> e <i>Erythroxyllum suberosum</i>	103
4.1.7 Avaliação da atividade antioxidante	113
4.1.7.1 Atividade redutora do radical DPPH [*]	113

4.1.7.2 Atividade de inibição da formação do complexo Fosfomolibidênio	116
4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO IN VITRO	119
4.2.1 Inibição de tirosinase.....	119
4.2.2 Citotoxicidade celular	121
4.2.2.1 Avaliação da influência dos extratos frente ao reagente MTT.....	121
4.2.2.2 Curva de densidade celular da linhagem 3T3-L1	123
4.2.2.3 Determinação da porcentagem de viabilidade celular.....	123
4.2.2.4 Caracterização da fonte ultravioleta	125
4.2.2.5 Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 frente a radiação UV.....	127
4.2.2.6 Determinação de depletados de glutathiona reduzida	127
4.2.2.7 Caracterização das formulações	129
4.2.2.8 Determinação de FPS	133
4.2.2.9 Determinação da atividade antioxidante da formulação gel	135
CONCLUSÃO	137
PERSPECTIVAS	139

FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de moléculas utilizadas em protetores solares de classificação de filtros orgânicos.....	38
Figura 2 - Árvore, arbusto, flores e frutos de <i>Erythroxylum daphnites</i> . Amostras provenientes da Fazenda Água Limpa (FAL – UnB) do Distrito Federal – DF.	48
Figura 3 – Árvore e folhas de <i>Erythroxylum suberosum</i> . Amostras provenientes do Campus Darcy Ribeiro – UnB, Brasília – DF.....	49
Figura 4 - Processo de infusão utilizado para obtenção de extratos aquosos do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	51
Figura 5 – Linhagem celular 3T3-L1.....	61
Figura 6 – Fonte ultravioleta.....	65
Figura 7 - Limite de variação dos teores de sólidos totais dos lotes de extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	74
Figura 8 - Teores de sólidos totais dos extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	75
Figura 9 - Limite de variação dos rendimentos dos lotes de extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	77
Figura 10 - Teores de polifenóis totais dos extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>E. suberosum</i>	79
Figura 11 - Avaliação do limite de variação a partir do teor de polifenóis dos lotes relativos aos extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	79
Figura 12: Subclasses de compostos químicos pertencentes ao grupo de químico dos polifenóis.	81

Figura 13: Estruturas químicas dos marcadores identificados por Cromatografia de Camada Delgada para os lotes de extratos do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	82
Figura 14 - Perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para os lotes de extratos provenientes do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	83
Figura 15 - Perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para os lotes de extratos provenientes do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum suberosum</i>	83
Figura 16 - Perfil cromatográfico representativo para extrato de <i>Erythroxylum daphnites</i>	86
Figura 17 - Perfil cromatográfico representativo para extrato de <i>Erythroxylum suberosum</i>	86
Figura 18 - Curva de regressão linear obtidas para os padrões ácido neoclorogênico e hiperosídeo.....	89
Figura 19 - Seletividade analisada por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para o extrato (Lote 2) de <i>Erythroxylum daphnites</i> por hidrólise induzida.....	92
Figura 20 - Análise da seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxylum suberosum</i> por hidrólise induzida.....	97
Figura 21 - Perfil cromatográfico e espectros obtidos de extrato de <i>Erythroxylum daphnites</i>	104
Figura 22 - Teores de ácido neoclorogênico dos lotes de extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i>	106
Figura 23 - Perfil cromatográfico e espectros obtidos de extrato de <i>Erythroxylum suberosum</i>	108

Figura 24 - Teores de hiperosídeo dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	110
Figura 25 - Teores de ácido neoclorogênico dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	112
Figura 26 - Atividade antioxidante por redução do radical DPPH' dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum daphnites</i>	114
Figura 27 - Atividade antioxidante por redução do radical DPPH' dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	115
Figura 28 - Atividade antioxidante por inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum daphnites</i>	117
Figura 29 - Atividade antioxidante por inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	118
Figura 30 - Atividade de inibição da tirosinase pelos extratos padronizados de <i>Erythroxyllum daphnites</i> (ED) e <i>Erythroxyllum suberosum</i> (ES) e do controle positivo ácido kójico (AK)..	120
Figura 31 - Efeito das concentrações obtidas a partir do extrato padronizado de <i>Erythroxyllum daphnites</i> submetidos ao tetrazólico brometo azul de tetrazólio (MTT) à 37° C por 4 horas.	122
Figura 32 - Efeito das concentrações obtidas a partir do extrato padronizado de <i>Erythroxyllum suberosum</i> submetidos ao tetrazólico brometo azul de tetrazólio (MTT) à 37° C por 4 horas.	122
Figura 33 - Curva de densidade celular para linhagem 3T3-L1 em placa de 48 poços para determinação do ensaio de viabilidade celular com MTT.....	123
Figura 34 - Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 versus lote de extrato padronizado de <i>Erythroxyllum daphnites</i> por MTT - tetrazólico brometo azul de tetrazólio.	124

Figura 35 - Viabilidade celular da linhagem <i>3T3-L1</i> versus lote de extrato padronizado de <i>Erythroxyllum suberosum</i> por MTT - tetrazólico brometo azul de tetrazólio.....	125
Figura 36 - Caracterização da fonte ultravioleta com a avaliação das variáveis radiação (UVA, UVB e UVC), temperatura (°C) e tempo de irradiação (minutos).....	126
Figura 37 - Viabilidade celular da linhagem <i>3T3-L1</i> versus tempo de irradiação. ...	127
Figura 38 - Atividade de depleção de glutatona reduzida por linhagem celular <i>3T3-L1</i> frente ao extrato padronizados de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	129
Figura 39 - Aspecto geral das formulações tipo gel.	130
Figura 40 - Aspecto geral das formulações tipo gel-creme.	130
Figura 41 - Viabilidade celular por MTT da linhagem <i>3T3-L1</i> versus formulação gel e gel-creme sem a incorporação de extrato padronizado.	132
Figura 42 - Perfil de transmitância observada de 320 nm a 400 nm para as formulações gel contendo extrato de <i>Erythroxyllum suberosum</i> em comparação a formulações comerciais.	133
Figura 43 - Atividade antioxidantes das formulações tipo gel com extrato padronizado das espécies <i>Erythroxyllum daphnites</i> e <i>Erythroxyllum suberosum</i> em comparação com os os lotes de extratos padronizados e padrão ácido ascórbico.	136

TABELAS

Tabela 1 - Sinonímias da espécie <i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil.....	28
Tabela 2 - Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-DAD.....	55
Tabela 3 - Concentração teórica para análise da exatidão frente aos padrões utilizados para <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	58
Tabela 4 - Concentração teórica, posterior a adição do padrão na amostra para análise da exatidão para os extratos <i>Erythroxylum daphnites</i> e <i>Erythroxylum suberosum</i>	59
Tabela 5 - Composição das formulações	68
Tabela 6 - Teor de sólidos totais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	75
Tabela 7 - Teor de sólidos totais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum suberosum</i>	76
Tabela 8 - Rendimentos finais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	77
Tabela 9 - Rendimentos finais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de <i>Erythroxylum suberosum</i>	78
Tabela 10 - Limites de detecção e quantificação dos marcadores estabelecidos.	87
Tabela 11 - Precisão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para o marcador ácido neoclorogênico em extrato de <i>Erythroxylum daphnites</i> (Lote 2).....	90
Tabela 12 - Precisão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para os marcadores ácido neoclorogênico e hiperosídeo em extrato de <i>Erythroxylum suberosum</i> (Lote 2).	90

Tabela 13 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum daphnites</i> não submetido a hidrólise.	93
Tabela 14 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum daphnites</i> submetido a hidrólise à 60 °C por 60 minutos.	94
Tabela 15 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum daphnites</i> submetido a hidrólise ácida por 60 minutos à 60 °C.	95
Tabela 16 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum daphnites</i> submetido a hidrólise básica submetido a 60 °C por 60 minutos.	96
Tabela 17 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum suberosum</i> não submetido a hidrólise.	98
Tabela 18 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum suberosum</i> submetido a hidrólise por 60 minutos sob temperatura de 60 °C.	99
Tabela 19 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum suberosum</i> submetido a hidrólise ácida por 60 minutos sob temperatura de 60 °C.	100
Tabela 20 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum suberosum</i> submetido a hidrólise básica por 60 minutos sob temperatura de 60 °C.	101
Tabela 21 - Exatidão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum daphnites</i> para o marcador ácido neoclorogênico.	102
Tabela 22 - Exatidão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para extrato (Lote 2) de <i>Erythroxyllum suberosum</i> para o marcador hiperosídeo.	102
Tabela 23 - Tempo de retenção, área e teor de hiperosídeo nos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum daphnites</i>	105
Tabela 24 - Tempo de retenção, área e teor de hiperosídeo nos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	109

Tabela 25 - Tempo de retenção, área e teor de hiperosídeo nos lotes de extratos de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	111
Tabela 26 - Percentual de inibição da enzima tirosinase pelos extratos aquosos de <i>Erythorxylum daphnites</i> e <i>Erythroxyllum suberosum</i>	119

LISTA DE ABREVIATURAS

4-MBC - 4-metilbenzilideno cânfora

AA – Ácido ascórbico

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ANOVA - *Analysis of variance* (Análise de variância)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APG II – *Angiosperm Phylogeny Group* (Grupo de Filogenia de Angiospérmicas II)

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

CAE - Comissão de Assuntos Econômicos

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-*Diode Array Detector* (Detector de matriz de diodos)

COLIPA – *The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (Associação Europeia da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria)

CV – Coeficiente de variância

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfoxido

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

DPI – Desvio padrão do intercepto

DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DPR – Desvio padrão relativo

EAG - equivalentes de ácido gálico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetra-acético

EGTA – *Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) – N, N, N', N' – tetraacetic acid*

EPR – Erro padrão relativo

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS)

EUA – Estados Unidos da América

FAL – Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília

FDA- *Food and Drug Administration*

FPS – Fator de Proteção Solar

GSH – Glutathiona reduzida

HMS – Homosalato

IC₅₀ – *Inhibition Concentration 50%* (Concentração inibitória de 50 %)

IF – Infravermelho

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

NP/PEG - Difenilboriloxietilamina/Poli(etil)enoglicol

O/A – Óleo em água

OD-PABA - Octil-dimetil-PABA

OMS – Organização Mundial da Saúde

PABA – Ácido para-aminobenzóico

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

PEC - Proposta de Emenda à Constituição

PL - Projeto de Lei

PMMA - [*Poly(methylmethacrylate)*] - Polimetilmetacrilato]

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE Nº – Resolução número

Rf – *Retention fator* (Fator de retenção)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SB 2571 - *Senate Bill 2571* (Projeto de Lei 2571)

SFB – Soro Fetal Bovino

SSI - *Solar Spectral Irradiance* (Irradiância Solar Espectral)

TSI - *Total Solar Irradiance* (Irradiância Solar Total)

UA - Unidade Astronômica

UV - Ultravioleta

UVA – Radiação Ultravioleta A (315 a 400 nm)

UVB – Radiação Ultravioleta B (280 a 315 nm)

UVC – Radiação Ultravioleta C (100 a 280 nm)

V – *Volts*

VIS - Visível

VTF – Valores Teóricos Finais

W – *Watts*

1 INTRODUÇÃO

1.1 CERRADO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, com cerca de 2 milhões de Km² de área (22% do território brasileiro), compreendido pelos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal e partes do Amapá, Roraima e Amazonas. O Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo, contendo 11.627 espécies de plantas nativas catalogadas e uma grande diversidade de habitats. O que determina uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias. O Cerrado também tem grande importância social, pois diversas populações sobrevivem de seus recursos naturais, incluindo etnias indígenas, quilombolas, geraizeiros, ribeirinhos, babaçueiras, vazanteiros, que juntas, são constituídas como pertencentes ao patrimônio histórico e cultural brasileiro (1).

Em 2010 foi aprovada a Proposta de Emenda à Constituição – PEC 51/03, que passou a incluir o Cerrado e a Caatinga como biomas reconhecidos como patrimônio nacional. Deste modo, o Art. 1º O § 4º do art. 225 da Constituição Federal (2) passou a vigorar com a seguinte redação:

“Art. 225...

§ 4º A Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, a Serra do Mar, o Pantanal Mato-Grossense, o Cerrado, a Caatinga e a Zona Costeira são patrimônio nacional, e sua utilização far-se-á, na forma da lei, dentro de condições que as segurem a preservação do meio ambiente e a melhoria da qualidade de vida da população.”

Essa inclusão não está ligada somente ao fato do bioma Cerrado ocupar cerca de um quarto do território nacional, mas também porque engloba uma ampla variedade de ecossistemas e elevada diversidade biológica, que manifesta-se tanto na flora quanto na fauna (2).

O Cerrado trata-se de um complexo vegetacional composto por três tipos de formações: florestais, savânicas e campestre (3). É caracterizado por clima estacional com o período de chuva predominante de outubro a março, seguido de um período de

seca (abril a dezembro). A precipitação média anual é de aproximadamente 1.500 mm, com temperaturas amenas médias ao longo do ano de 22 °C à 27 °C, e fenômenos como queimadas são frequentes e de grande destaque durante a transição entre os períodos de seca e chuva (4).

Este bioma também se encontra incluso na lista dos *hotspots* mundial. Sendo a sua inserção um aspecto positivo, pois significa o reconhecimento a nível mundial de sua rica biodiversidade, principalmente de espécies endêmicas que, segundo Myers (1988; 1990) e Mittermeier *et al.* 1998) são características necessárias para a classificação de áreas e inclui-las em uma lista de *hotspots*. Sob outra perspectiva, essa classificação também significa que a região pertence a uma área crítica para as espécies, tanto da flora quanto da fauna que a compõem, uma vez que o fator crucial para que ocorra classificação de uma determinada área como um *hotspots* de biodiversidade trata-se da elevada concentração de espécies endêmicas e intensa perda do habitat original (5-7).

É importante destacar que espécies nativas importantes, comercialmente e ecologicamente, estão desaparecendo em função da ocupação desordenada, da expansão urbana, da agropecuária e da exploração irracional. Deste modo, a sobrevivência destes fazem-se dependentes da conservação e preservação do ambiente em que vivem (8).

Segundo Neto e Morais (2003), é dito que mesmo que fossem realizados estudos extensos de revisão bibliográfica sobre plantas medicinais do Cerrado, diversas espécies ainda estariam fora do alcance dos olhares da ciência. Pois, já é grande o número de espécies citadas como medicinais, ainda maiores devem ser a relação com as plantas que ainda não foram listadas e que podem ser utilizadas pela humanidade (9).

Assim, é importante a realização de estudos que envolvam espécies vegetais do Cerrado, não apenas como um fator de preservação da biodiversidade desse *hotspot*, mas também como uma ferramenta para a identificação e registro de plantas com potencial terapêutico, alimentício e cosmético, salientando também a sustentabilidade.

1.2 FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE E GÊNERO *ERYTHROXYLUM*

O Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero *Erythroxylum* por possuir o registro de 116 espécies relatadas na América tropical. No nordeste brasileiro foram registradas 66 espécies, demonstrando também ocorrência de representantes de *Erythroxylum* na região semi-árida do Brasil (10).

Stebbins (1974) e Thorne (2000) classificaram a família Erythroxylaceae como pertencente à ordem Geraniales. Cronquist (1981) classificou-a como pertencente a ordem Linales, utilizando os critérios de morfologia foliar, hábito arbóreo a herbáceo e presença de vasos escalariformes. Em estudos moleculares mais recentes foi evidenciada grande afinidade entre as famílias Erythroxylaceae e Rhizophoraceae e recomendaram a sua transferência para a ordem Malpighiales. A APG IV (*Angiosperm Phylogeny Group – Grupo de Filogenia de Angiospérmicas*) propôs uma classificação que baseou-se no conjunto de caracteres compartilhados pelas duas famílias (alcaloides propanoicos e pirrolidínicos), o que contribuiu para que Erythroxylaceae e Rhizophoraceae fossem consideradas como uma só família, atribuindo a Rhizophoraceae, opcionalmente, como a família destas (11).

A família Rhizophoraceae compreende aproximadamente 250 espécies divididas em quatro gêneros, que são: *Aneulophus*, *Nectaropetalum*, *Pinacopodium* e *Erythroxylum*, sendo que as espécies pertencentes ao gênero *Erythroxylum* estão distribuídas nas regiões tropicais da América do Sul, África e na ilha Madagascar e como características apresentam presença de alcaloides tropânicos, taninos, terpenos, diterpenos e triterpenos (com esqueleto oleanano e lupano), fenilpropanoides e flavonoides (12).

O gênero *Erythroxylum*, em relação a sua morfologia, apresenta dimorfismo floral denominado de heterostilia do tipo distilia, mostrando flores com estiletes longos (longistiladas) e flores com estiletes curtos (brevistiladas), ambas com filetes de comprimentos correspondentes. A heterostilia em *Erythroxylum* foi relatada pela primeira vez por Charles Darwin (1877), que agregou este mecanismo à polinização cruzada. Posteriormente Ganders (1979), documentou o mesmo tipo de dimorfismo em *Erythroxylum coca* Lam. e associou-a ao mecanismo de proteção à autofecundação (13).

Este gênero começou a despertar interesse durante o século XIX, posterior a descoberta das atividades farmacológicas das folhas de *E. coca*, que quimicamente caracteriza-se pela presença de alcaloides do grupo tropano, destacando-se a cocaína que é produzido por esta espécie vegetal e foi utilizado como anestésico local em pequenas cirurgias (10).

As espécies de *Erythroxylum* são comumente empregadas como: antibacterianos, antiinflamatórios, diuréticos; nos tratamentos de disfunções hepática, vesiculares, renais e respiratórias; e também como tônico com propriedades estimulantes (12).

Em levantamento bibliográfico feito por Oliveira (2010) foi revelado que das 267 espécies presentes dentro do gênero *Erythroxylum*, somente 61 foram estudadas quanto à sua composição química, que acarretaram no isolamento e caracterização de 449 compostos, cujas classes de maior prevalência foram alcaloides tropânicos, terpenóides e flavonoides, com baixa presença de outras classes como alcaloides, benzenoides, cumarinas, quinonas, alcinos, esteroides, proteínas e lipídios (14).

1.3 ERYTHROXYLUM DAPHNITES

Erythroxylum daphnites Mart. é pertencente à família Erythroxylaceae e é classificada quanto a sua fitofisionomia/habitat (tipo de vegetação) como pertencente ao Cerrado (*latu senso*), mata de galeria, cerradão e campo rupreste. Sua referência, até então, mais antiga é proveniente de 1843 tratando-se de uma catalogação dessa espécie vegetal. Quanto à sua nomenclatura popular no Brasil, é comumente chamada de “chapadinho” (Goiás e Minas Gerais), “fruta-de-tucano” (Minas Gerais), “mercúrio” (Mato Grosso) e “pimenta” (Minas Gerais) (15). A espécie *E. daphnites* encontra-se distribuída no Distrito Federal e estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo, e comumente é encontrada em áreas abertas do Cerrado, campo rupestre, mata mesófila semidecídua e nos bordos mais secos de áreas de mata ciliar (16).

Quando realizada busca nos bancos de dados: Lista de Espécies da Flora do Brasil (REFLORA) (17), Trópicos (18) e *The Plant List* (19) não foram encontradas

sinonímias para a espécie vegetal *E. daphnites* Mart. Também é importante salientar que foram poucos os estudos científicos com relação a esta espécie vegetal.

Com base na literatura foi observado que o extrato aquoso obtido a partir das folhas de *E. daphnites* apresentou citotoxicidade com ou sem combinação de radioterapia para FaDu (linhagem celular de carcinoma de hipofaringe), e extrato etanólico apresentou citotoxicidade para as linhagens: FaDu (carcinoma de hipofaringe), HaCaT (células imortalizadas de queratinócitos humanos), SCC-9 (carcinoma espinocelular de cavidade oral) (20, 21). Em estudo realizado por Correia *et. al.* (2016) foi observado atividade antifúngica por extrato aquoso de *E. daphnites* frente a cepa de *Candida gabrata* (22). O extrato hexânico de *E. daphnites* mostrou-se seletivo para as células de queratinócitos (HaCaT) e seletivo para o aumento das proporções de células SSC-9 nas fases G0 e G1 (75%) com redução na proporção da fase S (21%), sendo esse tratamento associado ao aumento do nível de expressão dos inibidores de CDK p21 em 21% e diminuição dos níveis de p27, ciclina D1 e ciclina E (23).

Em estudo realizado por Simas (2013), foram relatados isolamento e identificação de compostos provenientes dos galhos e folhas de *E. daphnites*, sendo estes representados por: esteroides, triterpenos, diterpenos, flavonoides, glicerídeo e lignana (24). Em estudo realizado por Elias *et. al.* (2015). Foram identificados a presença de compostos triterpenos como lupenona, friedelanol e friedelan-3-ona e esteroidal b-sitosterol. Também foram identificados palmitato de metilo, estearato de metilo, 18-metil nonadecanoato de metilo, docosanoato de metilo, lignocerato de metilo e hexacosanoato de metilo (23).

Em estudo realizado por Martins (2015) (25) com a utilização de extratos aquosos, etanólicos e hexânicos das folhas da espécie vegetal *E. daphnites* foi observado que estes extratos apresentaram atividade antioxidante frente ao método de inibição do radical DPPH* (*2,2-difenil-1-picrilhidrazil*), sendo que, as melhores atividades encontradas expressas em IC_{50} , corresponderam a 4,91; 5,17 e 10,34 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos etanólicos, aquoso e hexânico respectivamente. Também foram observados a presença de compostos fenólicos em sua composição sugeridos por cromatografia de camada delgada como hiperosídeo, rutina e de ácido clorogênico.

1.4 ERYTHROXYLUM SUBEROSUM

A espécie vegetal *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil é conhecida popularmente como “cabelo-de-negro”, “azougue-do-campo”, “sessenta e dois” e “mercúrio do campo”. Quanto a sua distribuição, têm suas ocorrências confirmadas no Brasil nas regiões norte (Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), nordeste (Bahia, Maranhão e Piauí), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) (26), sendo encontrada também nos países: Bolívia, Guiana Francesa, Paraguai e Venezuela (16). Trata-se de uma espécie bem característica dos domínios fitogeográficos: Savana amazônia e Cerrado.

E. suberosum é uma espécie arbórea que apresenta cauliflora e suas flores encontram-se agrupadas em fascículos, comumente nas axilas das folhas. Suas flores são pequenas (4,5 mm) hermafroditas, pentâmeras, actinomorfas, de coloração creme-claro e suavemente perfumadas. A antese ocorre no período dentre as 6 horas da manhã até as 18 horas. As flores ficam receptivas por um dia e no segundo dia as pétalas sofrem mudança em sua cor, tornando-se creme-escuro e caem (13). Quanto a fenologia, a espécie floresce entre os meses de agosto e setembro e frutifica entre os meses de setembro a janeiro (27).

As sinonímias para a espécies vegetal *Erythroxylum suberosum* foram buscadas nos bancos de dados: Lista de Espécies da Flora do Brasil (REFLORA) (17); Trópicos (18); e *The Plant List* (19) e são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sinonímias da espécie *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.

Espécie vegetal	Sinonímias encontradas
<i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil	<i>Erythroxylum areolatum</i> Vell. <i>Erythroxylum testaceum</i> Peyr. <i>Erythroxylum areolatum</i> L. <i>Erythroxylum suberosum</i> f. <i>brevipetiolatum</i> O.E.Schulz

Relacionado ao uso popular (povo indígena Kayapó - Brasil), a espécie *E. suberosum* é utilizada como analgésico, anti-reumático e para má digestão (28).

Com base na literature são poucos os estudos científicos relatados. Entretanto, em revisão realizada para esta espécie, foi observado que extratos aquosos e

etanólicos obtidos a partir das folhas de *E. suberosum* apresentaram citotoxicidade quando submetido as linhagens celulares com ou sem combinação de radioterapia: FaDu (carcinoma de hipofaringe), HaCaT (células imortalizadas de queratinócitos humanos), SCC-9 (carcinoma espinocelular de cavidade oral), (20, 21) e SCC-25 (carcinoma espinocelular de cavidade oral – morfologia epitelial) (21).

Em estudo realizado por Violante *et. al.* foi observado atividade antifúngica de extratos obtidos da casca do tronco da espécie *E. suberosum* contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Também foi observado atividade antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* (29).

Quanto a prospecção fitoquímica, segundo Rodrigues *et. al.* (2015) (30), as folhas da espécie *E. suberosum* são caracterizadas pela presença de compostos químicos como: heterosídeo saponínicos, flavonoides e taninos. Barros *et. al* (31). Isolou e identificou flavonoides como rutina e isoquercitrina por RMN.

Em estudo realizado por Morais (2015) (32) foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência a presença dos compostos isoquercitrina e hiperosídeo para extratos aquosos e etanólicos obtidos a partir das folhas da espécie *E. suberosum*. Também foi observado atividade antioxidante de inibição do radical DPPH[•] e da formação do complexo de fosfomolibdênio para esses extratos. O IC_{50} frente ao método em que se utiliza o radical DPPH[•], mostrou que a atividade dos extratos etanólicos dentre as coletas realizadas variam de 5,08 à 18,93 µg/mL, enquanto que os extratos aquosos apresentaram uma variação da atividade de 4,45 à 5,28 µg/mL (32).

1.5 PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS

Recursos naturais, principalmente os de origem vegetal, consistem em importantes fontes de fármacos devido a extensa variedade e complexidade de metabólitos com potencial medicinal (33). Um dos empecilhos na aceitabilidade deste tipo de produto está comumente relacionada a falta de um perfil de controle da qualidade padrão (34). Porém, a transformação de uma planta em produto

tecnicamente elaborado, exige estudos de validação das espécies vegetais visando a comprovação da segurança, eficácia e qualidade (33).

A época em que um material vegetal é coletado em conjunto com horário, local de obtenção, assim como a variação de temperatura, distribuição hídrica, exposição à radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, ataques de patógenos, etc, são fatores importantes, pois a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos (que são produzidos pelas espécies vegetais) podem não apresentar a produção de metabólitos de forma constante no decorrer do ano (35) e até mesmo no decorrer (36).

Outro ponto a ser destacado é a necessidade de uma referência para a identificação da espécie vegetal com o qual se está trabalhando (37). Desta forma deve-se coletar pequenos ramos com folhas, flores e frutos da planta de interesse, sendo que estas amostras devem ser representativas. Posteriormente deve-se confeccionar as exsicatas que serão catalogadas em um herbário e confirmarão a identificação científica da espécie vegetal (38).

Quanto ao modo de preparo faz-se importante a determinação do teor de umidade da droga vegetal a ser tratada assim como o devido armazenamento das amostras, levando em consideração o método de extração aplicável com base nos produtos almejados ao final do processo (39). É importante destacar que a normalização deve abranger toda a área de estudo, desde o cultivo da planta até a sua aplicação clínica, assim a padronização de um extrato torna-se essencial para a garantia dos requisitos solicitados pelo mercado consumidor (37, 40).

A produção e a comercialização de fitoterápicos por indústrias farmacêuticas provocou a necessidade da formulação de diretrizes provenientes de órgãos governamentais, fundamentais para os pedidos de autorização da produção e comercialização dos medicamentos fitoterápicos. Deste modo, monografias sobre plantas medicinais começaram a ser publicadas com o objetivo de estabelecer padrões de qualidade que os medicamentos devem obrigatoriamente obedecer, tendo como finalidade agrupar, padronizar e sistematizar o conhecimento das características e propriedade das plantas medicinais, tanto para auxiliar os profissionais de saúde quanto para orientação da população (41). Exemplos: Monografias de plantas medicinais da OMS, formulários de fitoterápicos da farmacopeia brasileira entre outros.

Padronização tem como objetivo a uniformização de qualquer processo ou atividade, tratando-se de um instrumento fundamental para o processo de controle da qualidade de fitoterápicos. Trata-se do processo para preceituar um conjunto de normas ou características inerentes, parâmetros constantes, valores qualitativos e quantitativos definitivos que carregam uma garantia de qualidade, eficácia, segurança e reprodutibilidade, em concordância com as normas técnicas. Sendo a descrição um conjunto de características exibidas pelo fitoterápico originadas pela experimentação e observações que trabalham nas normas específicas (37).

É importante levar em consideração os parâmetros já citados: período de coleta da espécie vegetal, horário de coleta, local de coleta, variações climáticas onde a planta encontra-se, disponibilidade hídrica e de nutrientes, a confirmação da identificação da espécie, a determinação de teores de umidade para droga vegetal assim como a determinação de teores de compostos presente na planta, além da padronização da forma de extração desses teores que podem estar diretamente ou indiretamente ligados a atividade biológica.

Tais parâmetros mostram-se então importantes, pois podem ser utilizados como controles para a comprovação de segurança, qualidade e eficácia de produtos obtidos a partir de espécie vegetais, onde fraudes e/ou problemas na qualidade podem ocorrer por meio: da substituição de uma espécie por outra semelhante, podendo não ter atividade farmacológica similares; adulteração de parte ou de todas as partes da planta, ou até mesmo a utilização de outros materiais; desconsideração do prazo de validade do fitoterápico; contaminação exógena com micotoxinas, metais pesados ou pesticidas (40).

O uso de marcadores fitoquímicos também é importante, não somente por estar relacionado a atividade farmacológica da planta, mas também por ser reconhecido como a *fingerprint* (digital - perfil cromatográfico) da espécie vegetal.

O marcador é a substância ou a classe de substâncias (exemplos alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.), é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e dos fitoterápicos. O marcador pode ser classificado quanto a sua relação com o efeito terapêutico (marcador ativo) ou quanto a seu efeito terapêutico em relação ao constituinte ou ao(s) grupo(s) de constituintes (marcador analítico) e quando não for demonstrada relação do constituinte ou grupo(s) de constituintes com atividade terapêutica do fitocomplexo (marcador analítico) (42).

Portanto devido à grande variabilidade na composição química das plantas medicinais, faz-se fundamental a padronização de fitoterápicos. Assim, espera-se que o teor dos princípios ativos ou dos marcadores fitoquímicos sejam conhecidos e se enquadrem nos critérios estabelecidos para a planta em questão (40, 42).

1.6 RADIAÇÃO SOLAR E EFEITOS DELETÉRIOS

A radiação solar é o fluxo de energia enviada pelo Sol e transmitida na forma de radiação eletromagnética. As medidas de radiação são denominadas como Irradiância Solar Total (*TSI - Total Solar Irradiance*) e Irradiância Solar Espectral (*SSI - Solar Spectral Irradiance*). A *TSI* é definida como a potência total da energia proveniente do Sol por unidade de área a 1 UA (distância entre o Sol e a Terra conhecida como Unidade Astronômica). As medidas podem ser realizadas em função do comprimento de onda [$W m^{-2} nm^{-1}$] e integradas para determinar a *TSI* (43).

Muitas funções vitais de animais e humanos, assim como a energia utilizada pelas plantas durante a fotossíntese estão associados à luz solar (44). A radiação solar, pode influenciar nos tons da pele humana (45), sendo que esta influência na pigmentação da pele está relacionada, principalmente, à melanina (46).

A radiação solar também é responsável, de modo indireto, a estimular a formação de vitamina D (47) (hormônio esteroide), uma vez que a pigmentação da pele influencia na produção deste hormônio, cuja a principal função, consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea (por intermédio da sua interação com as paratireoides), regulação da homeostase dos rins e dos intestinos (48).

A exposição aos raios solares está tornando-se cada vez mais perigosa, podendo ser associada a diversos efeitos agudos e crônicos perniciosos à pele, contribuindo inclusive no desenvolvimento de câncer (44).

A radiação eletromagnética pode ocorrer em diferentes faixas espectrais de acordo com o tipo de interação com a matéria. O espectro eletromagnético é classificado em diferentes regiões: Raios γ , Raios-X, Ultravioleta (UV), Visível (VIS), Infravermelho, micro-ondas ou ondas de rádio (43).

Neste estudo serão abordados fatos referentes aos raios emitidos pelo Sol que apresentam um amplo espectro de comprimentos de ondas eletromagnéticas que são classificadas em distintas zonas espectrais conhecidas como: radiação ultravioleta (UVA – 315 a 400 nm, UVB – 280 a 315 nm e UVC – 100 a 280 nm), visível (380 – 770 nm) e infravermelho (IF) (770 – 1000 nm) (44). Destas zonas espectrais, a faixa entre 100 e 295 nm proveniente da luz solar mostra-se mais prejudicial e citotóxica (49).

A radiação UV possui capacidade de ativar cascatas complexas de reações bioquímicas envolvendo a pele humana, sendo a inflamação e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio EROs – *Reactive oxygen species (ROS)* – as principais causas de danos ocasionados por esse fator (50).

A radiação UVA apresenta menos energia que a UVB, porém possui mais poder de penetração, onde fotossensibilizantes endógenos (DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos) quando excitados produzem *ROS*, devido a captura de fótons da radiação UVA (51). Oitenta por cento dos raios UVA atingem a junção dermoepidérmica e penetram mais profundamente na derme papilar e cerca de dez por cento dos raios UVA atingem a hipoderme (52).

A radiação UVB trata-se da principal radiação solar absorvida pela epiderme e cerca de 70% desta é bloqueada pelo estrato córneo (52), sendo que os raios UVB possuem energia suficiente para induzir lesões ao DNA e gerar *ROS*. Os danos voltados ao DNA são, principalmente dirigidos aos sítios dipirimidínicos, contribuindo para a dimerização das bases pirimidínicas por um anel ciclobutano nas posições cinco e seis, formando um dímero ciclobutano pirimidino, ou pela ligação da sexta posição de uma base na quarta posição próxima da base, formando o fotoproduto 6-4 pirimidino-pirimidona (6-4PP) (53).

A epiderme possui antioxidantes como forma de defesa, incluindo enzimas como o superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase, sequestradores de radicais livres como a vitamina C e E, carotenoides e glutatona reduzida (GSH) (54).

As *ROS* são formadas nas células como consequência de reações químicas oxidativas e por fatores externos. O aumento da produção dessas espécies reativas pode ser causado por fatores anormais que envolvem processo inflamatório, isquemia, presença de íons ferro catalíticos e exposição a radiação UV. Com o

aumento da produção de ROS, pode ocorrer a depleção das defesas antioxidantes naturais, deixando a pele mais vulnerável (54).

Assim, relacionado ao processo de inflamação e produção de ROS, a irradiação UV é responsável por esgotar os antioxidantes celulares e diminuir a eficiência dos sistemas de enzimas antioxidantes, o que pode resultar em danos ao DNA (55). Além de corroborar para prejuízos oxidativos em proteínas celulares, lipídios e carboidratos, contribuindo para o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (56) (57-59).

Os efeitos deletérios (Quadro 1) da radiação UV proveniente de raios solares podem depender da duração e frequência de exposição ao indivíduo, da intensidade da radiação solar (com base na latitude) e da reação relacionada a constituição genética, cor e fototipo da pele. Entre os efeitos nocivos (60) estão:

- Efeitos agudos - queimadura solar e fototoxicidade induzida por medicamentos;
- Riscos de longo prazo por exposição descontrolada repetida – desenvolvimento de modificações actínicas ou dermatohelioses (rugas, envelhecimento precoce da pele e adelgaçamento irregular da epiderme);
- Lesões pré-malignas – ceratoses solares;
- Lesões malignas - carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanomas;
- Dano fotoquímico acumulativo aos olhos – escurecimento das lentes (envelhecimento das lentes) e formação de catarata nuclear;
- Alteração da resposta imune e da função e distribuição dos componentes do sistema imunológico – incompetência imune seletiva.

Quadro 1 - Efeitos deletérios da radiação UV provenientes de raios solares.

Doenças	Característica
Lentigo solar	Lesão presente na pele ocorrente em 90% dos caucasianos > 70 anos de idade. Lesões rasas, de coloração marrom e especialmente proeminentes no dorso da mão.
Cutis rhomboidalis nuchae	Mudanças profundas de textura e pigmento do pescoço do indivíduo.
Doença de Favre-Racouchot	Elastose nodular com cistos e comedões. Ocorre principalmente na face de pessoas idosas, sendo a dermatoheliose um pré-requisito para o desenvolvimento dos comedões solares.

Continuação - Quadro 1 - Efeitos deletérios da radiação UV provenientes de raios solares.

Púrpura solar (Púrpura senil de Bateman)	Ocorre freqüentemente no antebraço de idosos posterior ao trauma em peles severamente danificadas pelo sol.
Lago venoso	Trata-se de uma ectasia venosa que aparece como uma pápula macia marrom-azulada, tipicamente no lábio inferior e em outras regiões expostas ao sol como a hélix da orelha, face e pescoço.
Cicatrizes estreladas das mãos e antebraços	Pseudo-cicatrizes (de Coulomb) causadas pelo deslizamento da pele frágil fotodanificada. Têm sido erroneamente atribuídas à púrpura pré-existente.
Dermatite crônica actínica	Caracterizada por erupção persistente de caráter eczematoso, possivelmente associado a pápulas infiltradas e placas, afetando predominantemente a pele exposta. Algumas vezes pode se estender a áreas cobertas, como a eritroderma. As síndromes da reação persistente à luz, reticulóide actínica, eczema fotossensível e dermatite fotossensível, são consideradas variantes dessa dermatite.
Reações a drogas	Medicações sistêmicas podem aumentar a suscetibilidade à radiação UV. Podendo ocorrer com o uso de antibióticos orais, anti-hipertensivos, psoralens, agentes imunossupressores, anti-inflamatórios não-esteroidais e outros agentes, incluindo um grande número de medicações tópicas e químicos industriais. Estes incluem os psoralens tópicos, tretinoína, e outros agentes despigmentantes e fotosensibilizantes.
Xeroderma pigmentoso	Doença rara autossômica recessiva dos humanos caracterizada por uma acelerada degeneração crônica das áreas da pele expostas ao sol, incluindo um elevado risco do desenvolvimento de câncer de pele.
Urticária solar	Condição incomum na qual a radiação UV ou radiação visível ocasiona um vergão na pele exposta. Muito comum em mulheres, entre os 20 e 40 anos e persiste indefinidamente, após 5 a 10 minutos de exposição solar, os pacientes experimentam prurido, eritema malhado, vergões confluentes.
Lupus eritematoso discóide crônico	Inflamação discóide na pele, ocorrendo freqüentemente em áreas expostas à radiação UV. As lesões consistem de placas (simples ou múltiplas), vermelho-escuras, bem localizadas, de 5 a 20 mm de diâmetro, ocorrendo usualmente na face (distribuição em borboleta). Ouvido externo, couro cabeludo e membranas da mucosa oral podem estar envolvidas. Há atrofia, telangectasias e tamponamento folicular. A lesão é geralmente coberta por escamas secas, duras e aderidas.
Envelhecimento solar	Trata-se de alterações macro e microscópicas na pele como consequência da irradiação solar crônica.

Continuação - Quadro 1 - Efeitos deletérios da radiação UV provenientes de raios solares.

Catarata	Causado mais facilmente por raios UVB. É visto frequentemente em trabalhadores ao ar livre do que naqueles que trabalham sob proteção.
Pelagra	A dermatite é precipitada pela radiação solar e freqüentemente se assemelha à queimadura solar, porém o eritema é prolongado e usualmente seguido de pigmentação e descamação.

Fonte: Juchem PP, Hochberg J, Winogron A, Ardenghy M, English R. Health Risks of Ultraviolet Radiation. Rev Soc Bras Cir Plas. 1998;13(2):31-60.

A pele humana é constantemente exposta à irradiação UV proveniente da luz solar e esse fator pode induzir alterações celulares. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas depende de mais compreensão sobre os mecanismos moleculares ocasionados por lesões relacionadas a esse tipo de radiação UV (61).

1.6.1 Protetores solares

A RDC nº 30, de junho de 2012 (62), publicada pela ANVISA. Quanto a definição, informa que protetor solar é:

“Adendo II; Definições...

qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação.”

O uso de protetores solares (fotoprotetores) trata-se da utilização de uma forma farmacêutica para a obtenção de um cosmético com a finalidade de conter os efeitos nocivos induzidos por radiação UV. Deste modo, estas preparações cosméticas podem possuir distintas apresentações (63), como por exemplo:

- Loções hidroalcoólicas – comumente apresentam proteção reduzida, com formação de filme protetor irregular e podem contribuir para o ressecamento da pele;

- Óleos – apresentam proteção superior às loções hidroalcoólicas, porém não alcançam valores de Fator de Proteção Solar (FPS);
- Géis oleosos – Possuem composição oleaginosa gelificada com proteção superior aos óleos fluidos; e
- Emulsões – são as formas que apresentam maior proteção frente à radiação UV;

Os protetores solares são conhecidos como orgânicos e inorgânicos, e podem ser classificados como filtros químicos e físicos. Segundo Flor *et. al.* (2007) (64) é dito que essa classificação poderia ser melhor denominada, pois processos de absorção e reflexão de radiação são considerados fenômenos físicos, desde que não haja reação química. Deste modo, uma molécula que absorve radiação UV não deve ser chamada de filtro químico. Portanto, classificar os filtros como orgânicos e inorgânicos mostra-se mais sensato, pois em filtros orgânicos existe a presença de compostos orgânicos e nos inorgânicos tem-se a presença de óxidos metálicos (64).

Assim, filtros orgânicos possuem moléculas que irão interferir na radiação incidente por meio de mecanismos de absorção, podendo atuar como um cromóforo exógeno, que quando absorve um fóton de energia, aumenta o estado de excitação da molécula e ao retornar para o estado estável (não excitado) ocorre a liberação de energia em um comprimento de onda maior (faixa do visível ou no infravermelho) (65).

De acordo com a região de proteção UV, os filtros orgânicos comumente são filtros de radiação UVA e UVB. Esta atuação está envolvida com uso de compostos que geralmente não possuem um amplo espectro de proteção, como os cinamatos e salicilatos, que agem principalmente contra os raios UVB e as benzofenonas e as avobenzonas que protegem somente raios UVA (66).

Em pesquisa bibliográfica realizada por Cabral *et. al.* (2011) (67) foi observado que os filtros orgânicos possuem em suas composições moléculas que podem ser utilizadas para filtros solares de radiação UVA e UVB, e que estas moléculas (ácido para-aminobenzóico – PABA, cinamatos, salicilatos, benzimidazóis e benzofenonas – (Figura 1) mesmo apresentando ação de protetores solares, podem se comportar como causadores de efeitos alérgicos em usuários, podendo possuir interações com fármacos e até mesmo com radiação UV (Quadro 2).

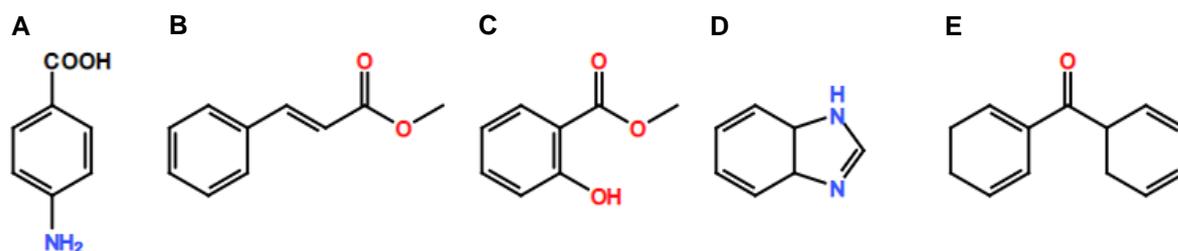


Figura 1: Estruturas químicas de moléculas utilizadas em protetores solares de classificação de filtros orgânicos. **A** – Ácido para-aminobenzóico; **B** – Cinamatos; **C** – Salicilatos; **D** – Benzimidazóis; **E**- Benzofenas.

Quadro 2 – Classificação e características de filtros orgânicos.

Classificação	Característica
Para-aminobenzóico (PABA e derivados)	O PABA (ácido para-aminobenzóico) é uma das moléculas mais antigas utilizadas como filtro solar UVB. Porém possui diversos inconvenientes: facilmente oxidável e mancha os tecidos; pode recristalizar no produto acabado; tendência em formar ligações de hidrogênio com certos solventes podendo diminuir a atividade; capaz de induzir a eczema de contato e sensibilização cruzada com outros derivados para-aminados, como anestésicos locais (benzocaína e procaína), sulfamidas, anti-histamínicos e até mesmo tinturas capilares.
Cinamatos	A presença de ligações duplas conjugadas permite maior deslocamento eletrônico. O máximo de absorção se situa próximo a 308 nm. Quando utilizados sozinhos não atingem coeficiente de proteção elevado porque são pouco estáveis fotoquimicamente. O <i>p</i> -metoxicinamato de octila, sob efeito da radiação UV, transforma-se no isômero CIS, cujo pico de absorção é mais baixo (265 nm), diminuindo sua eficácia. Por isto, geralmente são associados a filtros com espectro mais amplo ou aos filtros, quando se deseja maior proteção.
Salicilatos	São compostos orto dissubstituídos lipossolúveis. Devem ser utilizados em quantidades elevadas para atingir uma certa eficácia. Absorvem na zona de 300 nm. São muito estáveis, não interagem com os solventes e são bem tolerados. Apresentam melhor ação quando associados com outros filtros. O salicilato de octila é um salicilato substituído, que efetivamente absorve luz no espectro do UVB, absorve pouco ou não absorve UVA. Trata-se do éster do 2-álcool-etilhexil e ácido salicílico.
Benzimidazóis	O representante mais importante deste grupo, por sua grande utilização e hidrossolubilidade é o ácido-2-fenil-benzimidazol 5-sulfônico. São filtros hidrossolúveis eficazes para UVB. Adicionado à fase aquosa das formulações, pode completar a atividade dos filtros lipossolúveis. Seu uso necessita neutralização a pH 7,0.

Continuação - Quadro 2 – Classificação e características de filtros orgânicos.

Derivados do benzilideno cânfora	Compostos de estrutura bicíclica. São excelentes filtros UVB cujo máximo de absorção situa-se perto de 300 nm. Permitem a absorção de FPS elevado com baixas concentrações. Reações negativas são raras.
Benzofenonas	As benzofenonas cobrem a totalidade das UVB e grande parte das UVA. A oxibenzona (benzofenona-3) apresenta excelente estabilidade fotoquímica. São pouco toleradas e responsáveis por inúmeras reações alérgicas ou dermatite de contato.

Fonte: Cabral LDS, Pereira SO, Partata AK. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. Rev Cient ITPAC. 2011;4(3): ISSN 1983-6708.

Os filtros inorgânicos possuem óxidos metálicos capazes refletir ou dispersar a radiação incidente por mecanismo óptico, tendo como principais características sua baixa permeação cutânea e sua elevada fotoestabilidade, ou seja, capacidade do filtro em manter sua capacidade fotoprotetora mesmo após longos períodos de exposição à radiação solar (65). Assim, os filtros inorgânicos agem com uma barreira física que impede a passagem da radiação (68).

Exemplos de substâncias inorgânicas empregadas como fotoprotetores são: o óxido de zinco (ZnO) e o dióxido de titânio (TiO₂), que apresentam proteção contra os raios UV e baixo potencial de irritação. Porém, devido ao tamanho das partículas sólidas do ZnO e do TiO₂, o produto apresenta uma característica estética desfavorável, pois pode deixar uma película branca sobre a pele (64), além do seu alto índice de refração, que acabam refletindo a radiação UV e a luz visível, sendo que tais características mostram-se desvantajosas, pois comprometem a aceitação do produto pelo público consumidor, contribuindo para uma diminuição do uso do filtro solar e aumentando os riscos da exposição à radiação UV (69). Assim, a ANVISA, por meio da RDC Nº. 47, de 16 de março de 2006, restringiu o uso destes fotoprotetores inorgânicos em uma concentração máxima de 25% para a presença destes óxidos (70).

Em estudo bibliográfico realizado por Cabral *et. al* (67), foi observado que outra forma de obtenção de formulações fotoprotetoras está relacionado a associação de agentes químicos e físicos, uma vez que existe a necessidade da adição de uma quantidade menor de cada tipo de filtro para alcançar valores de FPS maior, contribuindo assim, para a diminuição dos efeitos indesejados de cada filtro. Porém a

adição de um fotoprotetor físico ao produto pode não melhorar o seu desempenho e até mesmo prejudicá-lo, sendo que para filtros químicos, comumente utiliza-se combinações, pois, sozinhos, não alcançam as determinações de FPS determinadas pelo FDA, sendo que muitas das vezes ocorrem mecanismos de sinergismo entre os componentes presente na fórmula.

Em estudo realizado por Saluccic *et. al.* (2014) (71), é relatada que a utilização tópica de antioxidantes pode contribuir para prevenção ou retardar os danos à pele induzidos por radiação UV, proporcionando assim efeitos fotoquimioprotetor e fortalecimento do sistema de proteção endógeno além de corroborar para a redução do dano oxidativo na pele. Com isso, os produtos naturais passaram a ganhar mais atenção, desde que estes possuam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que podem contribuir para proteção da pele frente aos fotodanos (72).

Pensando-se em prevenir e criar terapias para doenças envolvidas com danos causado por raios UV (73), iniciou-se discussões sobre formas de restabelecer a homeostasia celular com a utilização de produtos antioxidantes e sequestradores de ROS com a utilização de extratos vegetais (74), pois, os danos causados pela radiação solar podem ser acarretados devido à geração de radicais livres. Assim, substâncias capazes de inibir a ação ou produção destes radicais livres podem ser capazes de evitar ou minimizar os danos provocados.

1.6.2 Desafio para o mercado de consumidores frente aos protetores solares

A Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), disponibilizou em 2018 o panorama sobre o setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, onde é informado que o Brasil foi 8º maior consumidor de produtos para a pele, o 4º principal mercado de consumo (6,2% - US\$ 30 bilhões), e frente a contribuição do setor para a movimentação da economia, encontrou-se em 3º lugar no mercado global frente ao lançamento de produtos por ano (1º Estados Unidos e 2º China) (75).

ABIHPEC indica que no cenário frente aos anos de 2019 e 2020, o mercado irá continuar sua busca por produtos com ingredientes de origem natural, segmento que vem crescendo de 8 a 25% ao ano no mundo inteiro. Mais esforços tendem a ser

direcionado ao uso mais consciente desses ingredientes, assim como uso de tecnologias mais sustentáveis (76).

Outro ponto destacado trata-se do *Clean-Living* (Vida limpa), conceito que está se espalhando entre os consumidores, onde as pessoas expressam suas preocupações sobre um consumo ético e consciente de produtos em geral, sendo que suas principais preocupações estão ligadas a: Não degradação ambiental; qual é a procedência do produto que se pretende comparar e; discussões sobre testes em animais (70% dos consumidores globais possuem opiniões contra). Também é previsto novos produtos com presença de antioxidantes na fórmula, devido as suas propriedades benéficas complementares contra os danos provenientes de raios solares (76).

Outro ponto salientado é que o produto também atenda as necessidades estéticas do consumidor, assim, esse produto também precisa manter a pele com textura seca e sem brilho, onde a exigência do consumidor tende a aumentar e inicia-se uma nova busca de filtros aquosos, fluidos em sérum ou leitosos que tornem a pele não somente protegida, mas também aveludada (76).

Diante desse cenário, a classe de produtos com ação de proteção solar, deve não somente atender as necessidades estéticas do consumidor, mas também deve apresentar eficácia e a segurança. Essa classe de cosmético, por sua vez deve apresentar capacidade de proteção da pele com penetração epidérmica limitada, evitando assim, o risco de absorção sistêmica. Além disso, devem ser fotoestáveis e dissipar, de forma eficiente, a energia absorvida dos raios UV por meio de vias fotofísicas e fotoquímicas, impedindo também a formação de EROs (77).

Um dos desafios iniciais no mercado de filtros solares está vinculado aos produtos que contenham, em sua composição, óxido de zinco e dióxido de titânio. Outro problema está relacionado ao efeito durante a aplicação de protetores solares na pele, pois, produtos com a presença de filtros físicos como os citados acima, podem causar um fenômeno, conhecido popularmente, como “branqueamento”, o que afeta seriamente a estética e a eficácia do protetor solar (64, 78).

Segundo o relato apresentado por Korac e Khambholja (2011), nos EUA – Estados Unidos da América, as combinações de avobenzona e protetores solares físicos não são permitidas, isso porque a avobenzona tem se apresentado instável quando presente em formulações com filtros solares físicos (78).

Schlumpf e colaboradores 2004, apresentaram dados de toxicologia dos filtros UV: benzofenona-1 (Bp-1), benzofenona-2 (Bp-2), benzofenona-3 (Bp-3), benzofenona-4 (Bp-4), 3-benzilideno cânfora (3-BC), 4-metilbenzilideno cânfora (4-MBC), homosalato (HMS) e octil-dimetil-PABA (OD-PABA). Esses filtros foram testados e apresentaram atividade endócrina, sendo que o filtro 4-MBC, por exemplo, durante a vida pré e pós-natal, afetou o desenvolvimento do sistema hipotalâmico-pituitário-gonadal, no sistema nervoso central e no nível periférico de filhotes de ratos machos e fêmeas, resultando em alterações na expressão de genes regulados por estrogênio em órgãos reprodutivos e regiões do cérebro sexualmente dimórficas. De modo geral, tais dados, indicam que tanto os órgãos reprodutivos, quanto o sistema nervoso central, representam alvos sensíveis para efeitos de desenvolvimento de xenobióticos ativos endócrinos frente a filtros com esses feitos toxicológicos (79).

Outro problema relacionado ao uso de filtros orgânicos, trata-se do seu efeito alérgico indesejável que ocorre em alguns indivíduos. Além disso, alguns desses produtos podem ser caracterizados como fotossintéticos, ou seja, podem se decompor sob luz UV, produzindo EROs e/ou compostos derivados tóxicos, e inclusive podem perder suas propriedades de filtro UV (77). Com relação as formulações que utilizam combinações de filtros orgânicos e inorgânicos, são relatadas complicações relacionadas a fotoestabilidade e possíveis interações sinérgicas desfavoráveis.

Os protetores solares devem possibilitar ao consumidor um maior tempo de exposição, de forma segura, aos raios solares, além de evitar danos provenientes de seus próprios componentes. Em consequência, surgiu maior interesse do uso de filtros UV inorgânicos que apresentassem propriedade hipoalergênica, principalmente na obtenção de produtos voltados para uso infantil e em pessoas de pele sensível (77).

Frente ao conceito *Clean-Living*, os consumidores têm expressado críticas a produtos que, de alguma forma, causem degradação ambiental. Frente a isso, entrou em análise na Comissão de Assuntos Econômicos (CAE) o Projeto de Lei – PL 616/2019 que altera a Lei nº 6.360, de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências, para dispor sobre a regulação ambiental de cosméticos, e dispõe sobre a proibição de protetores solares considerados tóxicos para os recifes de corais. (80).

Em estudo conduzido por He *et. al* (2018), foi observado morte de 33,33% e o branqueamento de 83,3% dos corais da espécie *Seriatopora caliendrum* quando essas colônias tiveram contato direto com 1000 mg/L de filtro UV orgânico (etilexilmetoxicinamato - EHMC). Quando os corais das espécies *S. caliendrum* e *Pocillopora damicornis* foram expostas a protetor solar contendo os filtros EHMC e octocrileno (OC) em concentrações de aproximadamente 420 e 30 mg/L, respectivamente (diluídos em água), foi possível observar alta mortalidade das colônias de corais da espécie *S. caliendrum* (66,7 a 83,3 %) enquanto que para a espécie de corais *P. damicornis* foi observada mortalidade de 33,3 a 50%. Tais resultados confirmaram o potencial de bioacumulação de EHMC e OC e mostram que outros ingredientes em produtos de proteção solar também podem contribuir para um acúmulo destes ingredientes ativos em corais e exacerbar a toxicidade dos produtos de proteção solar (81).

A PL 616/2019 não está vinculada somente ao desejo de consumir produtos com baixa degradação ambiental como explicitado pelos consumidores de cosméticos, mas também trata da reavaliação do uso de produtos que podem comprometer as questões de preservação e conservação ambiental. Essa Projeto de Lei proíbe registro, fabricação, importação, exportação, publicidade, comercialização, transporte, armazenamento, guarda, posse e uso de protetores solares considerados tóxicos para os recifes de corais. Caso o projeto seja aprovado pelo Congresso, os produtos nocivos a saúde ou ao meio ambiente que ainda estiverem à venda quando a lei for promulgada devem ser retirados imediatamente do comércio (80).

No dia 3 de junho de 2018, foi assinado o projeto de lei - *Senate Bill 2571 (SB 2571)*, que transformou o Havaí – EUA, na primeira região do mundo a proibir oficialmente alguns tipos de filtros solares, sendo que em maio de 2018, o Legislativo desse estado norte-americano adotou o primeiro projeto de proibição de protetores solares com oxibenzona ou octinoxato em formulação. Frente a promulgação da lei, a venda e a distribuição de protetores solares que contenham esses produtos serão proibidos no Havaí a partir de 1º de janeiro de 2021 (82).

Com base nos relatos apresentados, um dos focos deste trabalho está ligado justamente ao estudo e desenvolvimento de um produto que possa apresentar ação de proteção solar a base de extratos vegetais provenientes do Cerrado, pensando-se não somente em um produto que seja eficaz na proteção contra os raios ultravioletas

solares, mas também que não cause danos ambientais e atenda as necessidades estéticas e de prevenção a esses danos o público consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e caracterizar extratos aquosos obtidos das folhas das espécies *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum* e avaliar o potencial fotoquimiopreventivo dos extratos padronizados das folhas *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos das folhas de *E. daphnites* e *E. suberosum*;
- Determinar o teor de polifenóis presentes nos diferentes extratos das folhas de *E. daphnites* e *E. suberosum*;
- Realizar estudo fitoquímico da *E. daphnites* e *E. suberosum*: determinar conteúdo de polifenóis totais e avaliar perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Padronizar o extrato aquoso bruto de *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum*;
- Desenvolver formulações tópicas contendo os extratos das espécies *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum*;
- Avaliar o efeito fotoquimiopreventivo *in vitro* dos extratos por atividade antioxidantes:
 - Inibição do radical DPPH;
 - Inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio;
- Avaliar o efeito fotoquimiopreventivo *in vitro* dos extratos por atividade enzimática:
 - Inibição da enzima L-tirosinase;
- Avaliar o efeito de morte celular induzida pela irradiação UV em cultura de células da linhagem 3T3;
 - Avaliar o efeito da formulação na recuperação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) depletados em cultura de células expostas à radiação UV;
- Avaliar o efeito fotoquimiopreventivo *in vitro* das formulações:

- Determinar a atividade funcional da formulação por atividade antioxidante;
- Determinar o FPS *in vitro* por método espectrofotométrico;
- Determinar a segurança biológica por citotoxicidade em cultura de células da linhagem 3T3.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS

Objetivou-se realizar a padronização dos extratos aquosos de *E. daphnites* e *E. suberosum* quanto aos teores de sólidos totais, rendimentos, teor de umidade, teor de polifenóis totais, perfis cromatográficos por CCD e CLAE-DAD e atividade antioxidante pelos métodos de redução do radical DPPH^{*} e inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio.

3.1.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal da espécie *E. daphnites* foi coletado na área de borda da mata de galeria (Cerrado) da Fazenda Água Limpa – FAL (15° 58 01. 1" S 47° 53. 16. 2" W) entre os horários de 9h30min às 10h30min (Horário Oficial de Brasília – DF/Brasil) no dia 19 de maio de 2015 (Figura 1). Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade de Brasília (UnB) pelo botânico Prof. Dr. Christopher Fagg do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília sob o *voucher* Fagg CW2305.



Figura 2 - Árvore, arbusto, flores e frutos de *Erythroxylum daphnites*. Amostras provenientes da Fazenda Água Limpa (FAL – UnB) do Distrito Federal – DF.

O material vegetal da espécie *E. suberosum* foi coletada na área de Cerrado *sensu stricto* no campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília – UnB ($15^{\circ} 46' 22,72'' S$ $47^{\circ} 52' 7,09'' W$) entre os horários de 12h00min e 13h00min (Horário Oficial de Brasília – DF/Brasil) no dia 30 de maio de 2015 (Figure 2). Uma exsicata foi depositada no herbário da UnB pelo botânico Prof. Dr. Christopher Fagg do Instituto de Biologia da UnB sob *voucher* Fagg CW2192.



Figura 3 – Árvore e folhas de *Erythroxylum suberosum*. Amostras provenientes do Campus Darcy Ribeiro – UnB, Brasília – DF.

O período da coleta para *E. daphnites* e *E. suberosum* foram escolhidos com base em estudo realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa dos Laboratórios de Produtos Naturais e de Controle da Qualidade de Medicamento, pois os extratos aquosos brutos obtidos das folhas dessas espécies mostraram-se mais ativos frente a atividade antioxidante quando realizada a coleta das folhas nos meses de maio (*E. daphnites*) e agosto (*E. suberosum*) (25) (32).

3.1.2 Obtenção dos extratos brutos

3.1.3 Preparo dos extratos aquosos brutos de *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum*

O preparo dos extratos ocorreu nos laboratórios de Controle da Qualidade de Medicamentos e de Produtos Naturais da Universidade de Brasília (UnB) a partir das folhas das espécies *E. daphnites* e *E. suberosum*. Os procedimentos foram realizados segundo Azevedo *et. al.* (2010) (39). As folhas foram submetidas ao processo de seleção e o material obtido de quatro espécimes de *E. daphnites* foram misturados para a obtenção dos extratos, sendo o mesmo processo aplicado para cinco espécimes de *E. suberosum*.

Todas as folhas passaram pelo processo de secagem em estufa (37° C). Posteriormente, as mesmas foram selecionadas e analisadas em analisador de umidade infra-vermelho, responsável pela determinação de umidade (%), sendo consideradas secas as folhas que apresentaram umidade entre 6 e 15 %. Sendo esse o teor máximo de água aceitável para as drogas vegetais presentes nas diferentes monografias da Farmacopeia Brasileira V (83).

A trituração das folhas de *E. daphnites* e *E. suberosum* foi realizado com uso de moinho de facas (Marconi MA-580®) com peneiro de *mesh* 30. Os produtos obtidos foram armazenados em recipientes de vidros distintos para cada espécie vegetal sob abrigo da luz e umidade.

Para a obtenção dos extratos aquosos realizou-se infusão na proporção de 1:5 com uso do pulverizado das folhas das espécies *E. daphnites* e *E. suberosum*, em separado. Neste procedimento, a água deionizada foi aquecida até seu ponto de ebulição, esperou-se que atingisse a temperatura de 70 °C e então esta foi vertida sobre o material seguida de agitação mecânica. Posteriormente, o recipiente foi coberto e esperou-se arrefecer até 50 °C para iniciar filtração (83). O extrato aquoso obtido foi armazenado em potes de vidros protegidos da luz e armazenados -20 °C. Posterior ao congelamento, os extratos aquosos foram submetidos ao processo de liofilização, cujo o condensador foi ajustado para -70 °C e o vácuo para 15 mTorr. Após sublimação do solvente por processo de liofilização, os extratos aquosos secos foram armazenados à -20 °C (Figura 4).

Os Extratos Aquosos Brutos de *Erythroxylum daphnites* (Lotes), receberam a sua frente os números de 1 a 7 (Lote 1, Lote 2 etc), correspondentes a cada uma das “replicatas” dos extratos que foram obtidos neste trabalho, sendo o mesmo aplicado para os Extratos Aquosos Brutos de *Erythroxylum suberosum* (Lotes).

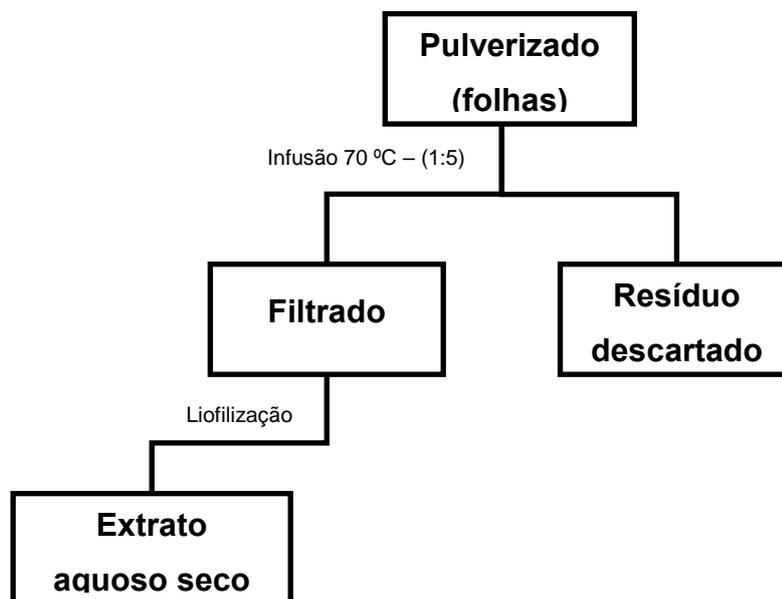


Figura 4 - Processo de infusão utilizado para obtenção de extratos aquosos do pulverizado das folhas de *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum*.

3.1.3.1 Determinação de teor de extraíveis

A determinação dos sólidos totais (83) foi realizada para os extratos brutos aquosos de *E. daphnites* e *E. suberosum*. Onde, 2 mL dos respectivos extratos foram submetidos à balança termogravimétrica por infra-vermelho para avaliação do teor (%) de sólidos totais presentes em cada um dos extratos.

3.1.3.2 Determinação de Rendimentos Extrativos (%)

Para o cálculo de rendimento foi utilizado o peso (g) do rasurado das folhas de *E. daphnites* e *E. suberosum* como sendo 100% do material utilizado. Após os processos de extração e secagem do material, os produtos foram pesados e uma relação entre o peso do produto final e peso das folhas inicial foi estabelecida.

$$\text{ReF (\%)} = \frac{100 \times \text{ReF (g)}}{\text{FoS}}$$

Em que:

ReF (%) = Rendimento Final (%)

ReF (g) = Rendimento Final (g)

FoS = Peso de folha seca rasurada

3.1.3.3 Polifenóis Totais

O ensaio para determinação do teor de polifenóis totais foi realizado com as amostras dos lotes dos extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum*. Para esta análise foi utilizado o método de Kumazawa *et. al.* (2004) adaptado (84). Em tubos de ensaios foram adicionados 0,5 mL do ácido gálico (Sigma) (3, 9, 12, 15, 18, 21 e 27 µg/mL), 0,5 mL de carbonato de sódio - Na₂CO₃ (10%) e 0,5 mL de Folin Ciocauteau 1N (Sigma). Posterior a adição do reagente de Folin aguardou-se por uma hora à temperatura ambiente (25 °C) para iniciar leitura em espectrofotômetro (760 nm). A partir das absorbâncias obtidas das concentrações do ácido gálico foi construída curva analítica para aplicação de regressão linear, objetivando a obtenção da equação da reta. Para determinação da concentração de polifenóis nas amostras foram adicionados 0,5 mL das amostras (15 µg/mL), 0,5 mL de Na₂CO₃ (10%) e 0,5 mL de Folin Ciocauteau 1N. Para branco das amostras foram adicionados 0,5 mL das amostras (15 µg/mL), 0,5 mL de Na₂CO₃ (10%) e 0,5 mL de água deionizada. Para zerar o aparelho utilizou-se água deionizada. A partir da equação obtida foi possível calcular a concentração (µg/mL; mg/g e %) de polifenóis totais equivalentes de ácido gálico (EAG) nas amostras.

3.1.4 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos

3.1.4.1 Definição do perfil cromatográfico

Os perfis cromatográficos dos extratos de *E. suberosum* e *E. daphnites* foram obtidos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.1.4.2 Perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As amostras dos extratos brutos aquosos foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, tanto para *E. daphnites* quanto para *E. suberosum*.

As análises preliminares dos perfis cromatográficos para os extratos brutos de *E. daphnites* e *E. suberosum* foram feitas em placas de vidro com espessura de 2 mm, com tamanhos de 10 x 7 cm impregnadas com suspensão de sílica gel 60G preparada em água deionizada (1:2). As placas foram levadas para estufa para ativação à 110 °C por uma hora. As aplicações das amostras foram executadas imediatamente após a retirada das placas da estufa (85). Posterior a esse processo utilizou-se então placas de alumínio definitivas para CDD em sílica gel.

Para detecção de compostos polifenóis (86) foi utilizado como eluente os solventes acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:05) para os lotes de *E. suberosum* e (100:11:11:26) para os lotes de *E. daphnites*. Posterior a aplicação das amostras, estas foram colocadas em uma cuba saturada com a solução eluente para detecção de polifenóis. Ao término da eluição, as cromatoplasmas (folhas de alumínio em sílica gel – Fluka Analytical) foram reveladas com NP/PEG (difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol), apresentando assim o perfil cromatográfico por CCD para os extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum*. A revelação das

cromatoplaças foi realizada com o auxílio de capela de exaustão e câmara de UV (365 nm).

Após a eluição foi calculado o fator de retenção (*Retention factor - Rf*) para cada banda, com manchas referentes aos compostos presentes, para uma posterior comparação com padrões de referência. Os perfis obtidos para cada amostra foram comparados entre si.

3.1.4.3 Perfil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para determinação do perfil cromatográfico por CLAE e avaliação da padronização dos lotes dos obtidos dos extratos aquosos secos das espécies vegetais *E. daphnites* e *E. suberosum*, foi utilizado como base o método desenvolvido e validado por Leite *et al.* (2014) (34).

Foi utilizado cromatógrafo de CLAE LaChrom Elite (Hitachi, Tokyo, Japan) contando com bomba L2130, injetor L2200, forno para coluna (L2300), mantido a 25 °C e detector L2455 DAD (Hitachi, Tokyo, Japan). O detector foi ajustado para coletar dados na faixa de 220 a 400 nm. A fase móvel foi constituída de ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B) (Tabela 2). Fluxo de fase móvel foi de 0,6 mL/min e a injeção de amostra foi de 10 µL. Com utilização da coluna PurospherStar RP C18e (150 x 4,6 mm, 5 mm, Merck, Germany) (Part. nº 945681), acoplada a pré-coluna de mesmas características (4 x 4; 5 mm particlesize, Merck, Germany). Os dados foram adquiridos por EZChrom Elite software (version 3.3.2 SP1 Scientific Software.Inc.). Os extratos de *E. daphnites* foram preparados na concentração de 5 mg/mL na proporção de água:metanol (8:2). As amostras de *E. suberosum* foram preparadas na concentração de 2 mg/mL na proporção de água:metanol (6:4). Todas as amostras foram submetidas ao sonicador sob potência 220W e frequência de 40kHz por 20 min. Após solubilizarem, as amostras foram filtradas em filtro Millex (Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill Co. Cork - Irlanda) 0,45 µm, 13 mm. Os eluentes utilizados eram de grau HPLC, sendo que a eluição gradiente na bomba A utilizou-se ácido

fosfórico 1% (Dinâmica) e na bomba B utilizou-se acetonitrila (Tédia) conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0	90	10
40	70	30
50	50	50
55	90	10

Eluentes: Bomba A (ácido fosfórico 1%), Bomba B (acetonitrila).

Os teores de ácido neoclorogênico para *E. daphnites*, e ácido neoclorogênico e hiperosídeo para *E. suberosum* encontrados nos extratos das folhas das respectivas espécies foram quantificados baseado nos valores das áreas dos picos correspondentes ao tempo de retenção na eluição destes marcadores. A concentração de cada marcador na amostra foi calculada através da equação da reta obtida pela regressão linear das áreas dos picos em relação as concentrações dos padrões.

3.1.5 Validação da metodologia de determinação dos teores de ácido neoclorogênico em *Erythroxyllum daphnites*. Ácido neoclorogênico e hiperosídeo em *Erythroxyllum suberosum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A metodologia analítica foi validada de acordo com as especificações do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE N.º 899, de 29 de maio de 2003 da Anvisa (87) em consonância com a RDC N.º 166, de 24 de julho de 2017 (88), com base nas exigências do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico, Instrução Normativa N.º 4, de 18 de junho de 2014 (42).

3.1.5.1 Linearidade

A linearidade (88) foi avaliada com utilização do método de regressão linear, sendo feitas três curvas de calibração autênticas, com uso de seis concentrações diferentes (2,5; 5,0; 10; 25; 50; e 100 µg/mL) do padrão hiperosídeo para cinco concentrações distintas (5,0; 10; 25; 50; e 100 µg/mL) do padrão ácido neoclorogênico. O coeficiente de correlação (r), intercepto, inclinação, desvio padrão relativo (DPR) e a soma residual dos quadrados foram determinados pelo *software GraphPad Prism® 6.0*.

3.1.5.2 Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) foi calculado com base em parâmetros obtidos da curva analítica dos padrões hiperosídeo e ácido neoclorogênico (88), sendo o LD expresso a partir da equação a seguir:

$$LD = \frac{3,3}{S} \times DPI$$

DPI = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de três curvas de calibração construídas a partir da linearidade.

S = inclinação da curva de calibração.

3.1.5.3 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) foi calculado com base nos mesmos critérios para o LD (88), sendo o LQ expresso a partir da equação a seguir:

$$LD = \frac{10}{S} \times DPI$$

DPI = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de três curvas de calibração construídas a partir da linearidade.

S = inclinação da curva de calibração.

3.1.5.4 Seletividade

A seletividade foi verificada pela análise de produtos gerados por degradação da amostra induzida por hidrólise, hidrólise ácida e básica, todas submetidas à 60 °C (88). Assim, foram pesadas quantidades suficientes para preparo das amostras nas concentrações de 2 mg/mL para os lotes de *E. suberosum* e 5 mg/mL para *E. daphnites*.

Para indução de hidrólise ácida foi adicionado 1 mL de HCl 1 M. Para indução de hidrólise básica foi adicionado 1 mL de NaOH 1 M, sendo estas submetidas a aquecimento de 60 °C por 60 minutos. Foram feitos dois controles: controle de amostras não submetidas à 60 °C e submetidos à 60 °C, nesses controles foram adicionados 1 mL de água MilliQ. Posteriormente, as amostras submetidas ao HCl 1 M foram neutralizadas com 1 mL de NaOH 1 M e as amostras que foram submetidas ao NaOH foram neutralizados com 1 mL de HCl 1 M. Após, foi realizada a solubilização em água:MeOH (6:4) para *E. suberosum* e água:MeOH para *E. daphnites* (8:2).

A análise por CLAE-DAD foi realizada em triplicata para cada um dos controles e as amostras foram submetidas a hidrólise ácida e básica. O tempo de retenção (TR) e as áreas dos picos referente ao ácido neoclorogênico e hiperosídeo nas amostras foi comparada ao controle que foi preparado sem a indução de hidrólise ácida e básica.

3.1.5.5 Precisão

Para a repetibilidade (88), seis replicatas do extrato de *E. suberosum* (2 mg/mL) e *E. daphnites* (5 mg/mL) foram analisadas por CLAE-DAD no mesmo dia. A precisão inter-dia foi determinada em triplicata e analisada em três dias diferentes pelo mesmo

analista. A repetibilidade e precisão inter-dia expressa como desvio padrão relativo (DPR), determinado pela equação:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

DP= Desvio padrão; CMD= Concentração média determinada.

3.1.5.6 Exatidão

Para avaliar a exatidão, foram feitas determinações de baixa, média e alta concentrações para os Valores Teóricos Finais (VTF) desejados (80, 100 e 120%, respectivamente) em triplicata (88), sendo a exatidão expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente e pelo Erro Padrão Relativo (EPR):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A exatidão foi verificada a partir da adição de padrão aos extratos. Deste modo, as concentrações necessárias para alcançar os valores teóricos a serem analisados foram calculadas com base na Tabela 3:

Tabela 3 - Concentração teórica para análise da exatidão frente aos padrões utilizados para *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*.

Padrão	Amostra	Teórico final
60%	100%	80%
100%	100%	100%
140%	100%	120%

Assim, foram adicionado 0,5 mL do extrato de *E. daphnites* (2 mg/mL) mais 0,5 mL do padrão ácido neoclorogênico nas concentrações equivalentes de 60, 100 e 140 % encontrados na amostra. O mesmo foi aplicado para o extrato de *E. suberosum* (5

mg/mL). O procedimento foi realizado desta forma, pois ao adicionar padrão na amostra, ocorre uma diluição de 1:1 para ambas as partes, que quando somados, resultará na concentração teórica final desejada (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração teórica, posterior a adição do padrão na amostra para análise da exatidão para os extratos *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*.

Padrão	Amostra	Teórico final
30%	50%	80%
50%	50%	100%
70%	50%	120%

Posterior a adição de padrão às amostras de extrato, estes foram analisados por CLAE, seguindo as condições analíticas descritas anteriormente.

3.1.6 Avaliação da atividade antioxidante

Foi realizado a determinação da atividade funcional dos lotes de *E. daphnites* e *E. suberosum*, de modo a observar a reprodutibilidade da atividade antioxidante com uso dos métodos de atividade redutora do radical DPPH^{*} e atividade de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio.

3.1.6.1 Atividade redutora do radical DPPH^{*}

Em tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de tampão acetato de sódio/ácido acético (100 mM) pH 5,5, 1 mL de etanol (95 %), 0,1 mL da amostra e 0,5 mL solução alcoólica de DPPH^{*} (250 mM) (Sigma). Depois de 15 minutos foi realizada a leitura em 517 nm em espectrofotômetro Hitachi U2001 (89). Assim foram utilizadas as seguintes concentrações finais dos extratos: 0,96; 1,92; 2,88; 3,85; 5,77; 7,69; 9,62 e 11,54 ug/mL. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição

versus a concentração de extrato no meio reacional. A porcentagem de inibição foi estabelecida pela fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{100 - (\text{Absorbância Amostra} - \text{Absorbância Branco}) \times 100}{\text{Absorbância Controle}}$$

O IC_{50} foi determinado por meio da regressão linear dos dados, sendo obtida uma equação da reta ($y=ax+b$) obtida para cada uma das amostras de acordo com Locatelli *et al.* (2009) (90).

3.1.6.2 Atividade de inibição da formação do complexo Fosfomolibidênio

Foi adicionado 0,1 mL da amostra à 1 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M (Sigma), fosfato de sódio 28 mM (Merck) e molibdato de amônio 4 mM (Sigma)). E incubados em banho-maria a 95°C por 90 min. Após aferreecer, as absorbâncias das soluções foram avaliadas em 695 nm contra um branco (1mL de solução reagente e 1mL de diluente das amostras, preparado nas mesmas condições que as amostras testes) (91). A atividade antioxidante foi expressa em equivalente de ácido ascórbico (Sigma) e os dados obtidos foram analisados por regressão linear e obteve-se a equação da reta que posteriormente foi utilizada para calcular a atividade na amostra.

3.2 CITOTOXICIDADE

3.2.1 Linhagem celular e cultivo

Historicamente, as células 3T3 são oriundas de uma linhagem celular estabelecida pelos cientistas George Todaro e Howard Green (Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Nova York) em 1962. Eles

obtiveram as células 3T3 de tecido de embrião de camundongo suíço albino. A nomenclatura “3T3” se refere ao fato de que esta linhagem celular foi cultivado em uma concentração original de de 3×10^5 células por cm^2 , com um intervalo de Transferência de 3 dias em 3 dias (92).

A amostra de células de fibroblastos de rato - *Mus musculus* (3T3-L1) (Figura 5) foi adquirida do Banco de Células Do Rio de Janeiro sob o código BCRJ code 0019. São células de tecido embrionário, do tipo fibroblasto com propriedade de aderência A derivação L1 é uma sub-rotina contínua de 3T3 (albino suíço) desenvolvida por meio do isolamento clonal. Estas células podem sofrer uma conversão pré-adiposa à adiposa à medida que progridem de um estado de divisão rápida para um estado confluyente. Assim, houve uma maior preocupação para que não fossem realizados ensaios com esta linhagem células acima de 90 % de confluência. A linhagem 3T3-L1 foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, mais 1% de antibióticos (penicilina G - 100 U/mL e estreptomicina - 0,1 mg/mL. As células foram incubadas em 5% de CO_2 à 37°C em frascos de cultura celular de 75 cm^2 . Foram cultivadas a cada 2-3 dias e utilizou-se tripsina 0,5% em Ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 1 mM, para desagregá-las do frasco para inoculação em placas de 96 poços com densidade de 3×10^4 células/poço. Posterior ao descongelamento das células, três passagens foram realizadas antes de iniciar os ensaios, sendo os testes realizados até a 10^{a} passagem.

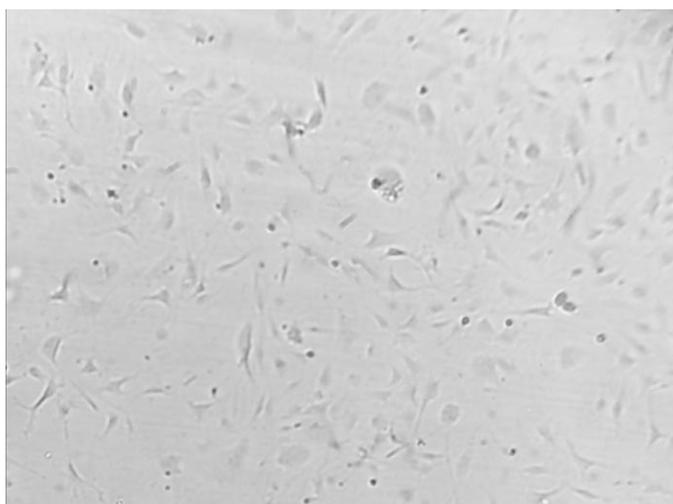


Figura 5 – Linhagem celular 3T3-L1. Cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% e 1% de antibióticos (penicilina G - 100 U/mL e estreptomicina - 0,1 mg/mL). Células incubadas em 5% de CO_2 à 37°C em frascos de cultura celular de 75 cm^2 .

A COLIPA (*The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* - Associação Europeia da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria) representa a indústria cosmética europeia, onde a associação representa fabricantes de produtos cosméticos e de cuidados pessoais. Além disso, o cumprimento da legislação estabelecida na Europa exige a presença de um órgão coordenador para garantir a qualidade e certificação de produtos cosméticos (93).

A COLIPA está comprometida com a eventual eliminação de testes em animais sobre os componentes de qualquer produto de consumo, assim, seus testes voltados para avaliação de fototoxicidade são realizadas em linhagens celular 3T3. De modo a se adaptar e se adequar ao guia COLIPA frente aos estudos *ex vivo* utilizou-se então a linhagem celular 3T3 neste estudo.

3.2.2 Curva de densidade celular

Para determinar a quantidade de células da linhagem 3T3-L1 a serem utilizadas no ensaio de viabilidade celular com MTT, o estudo foi conduzido em diferentes densidades celulares, (3×10^4 a 10^5 células por poço em placa de 96 poços). Foram observadas as absorbâncias e optou-se por trabalhar com a densidade de células por poço que não estivessem próxima da absorbância de 1 quando realizada as análises e leitor de placas.

3.2.3 Citotoxicidade celular

O ensaio de citotoxicidade celular foi avaliado segundo o método MTT descrito por Mosmann (1983) (94), que consiste na conversão do sal de tetrazólio em formazan.

As células foram removidas do frasco de cultivo celular para serem cultivadas em placas de 96 poços utilização da densidade de 3×10^4 células/poço em volume

suficiente para 0,2 mL por poço de DMEM suplementado com SFB 10%. Posterior a 24 horas de incubação à 37 °C com 5% de CO₂, o meio foi aspirado, e a cada poço foram adicionados 0,1 mL de meio DMEM suplementado com SFB 10% e 0,1 mL das concentrações de extrato de *E. daphnites* e *E. suberosum*. As concentrações finais de extratos para ambas espécies nos poços foram de: 0,02; 0,05; 0,1; 0,14; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 e 1 mg/mL. Previamente os extratos foram solubilizados em água para a obtenção de uma concentração de 7 mg/mL em DMSO 0,5%. A percentagem de DMSO (Dimetilsulfoxido – Vetec) nos poços foram de 0,08%, não causando interferência no ensaio. Após 24 horas de tratamento, o meio contendo as concentrações de extratos foram retirados e fez-se a adição de 0,05 mL de solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - Sigma) - 1mg/mL, sendo a placa armazenada em incubadora sob mesmas condições. Posterior a 4 horas, foram adicionadas aos poços 0,15 mL de isopropanol acidificado. Também foram feitos brancos da amostra sem a presença de células, nas mesmas condições descritas. A absorbância foi medida em leitora de microplaca à 450 nm.

3.2.3.1 Avaliação da influência dos extratos frente ao reagente MTT

O ensaio de MTT pode acarretar em resultados falsos positivos quanto testado em amostras que contenham compostos naturais com potencial intrínseco redutor (95). Deste modo, um ensaio com as mesmas concentrações dos extratos testados foi preparado na presença de DMEM e MTT. O ensaio de interferência foi realizado sob as mesmas condições, porém sem a adição da linhagem celular aos poços, com a finalidade de avaliar a ocorrência de interferência do extrato com o reagente MTT, para evitar possíveis resultados de caráter falso-positivo.

3.2.3.2 Determinação da porcentagem de viabilidade celular

As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras e controle das células viáveis. As absorbâncias do controle de células viáveis referem-se à viabilidade máxima das células (100%), ou seja, refere-

se à capacidade máxima das células de formar cristais de formazan a partir do tetrazólio. As porcentagens foram calculadas da seguinte maneira:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{(\text{Absorbância Amostra} - \text{Absorbância Branco}) \times 100}{\text{Absorbância Controle de Viabilidade celular}}$$

3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO *IN VITRO*

Foi realizado a determinação dos depletados de glutathiona reduzida, avaliação da inibição da enzima L-tirosina e para os extratos aquosos padronizados obtido das folhas de *E. daphnites* e *E. suberosum*, e a determinação do FPS para as formulações incorporadas com os extratos padronizados dessas suas espécies de *Erythroxyllum*.

3.3.1.1 Fonte ultravioleta

Para os ensaios de atividade fotoquimiopreventiva, foi preciso elaborar um aparelho, construído com o objetivo de receber a lâmpada de UV para as aplicações técnicas relacionadas aos ensaios com uso de irradiação. Assim a lâmpada utilizada foi a Ultra-Vitalux (Osram®), de tensão nominal 230 V, tensão da lâmpada de 230 V com potência nominal de 300 W, os dados fotométricos foram de 13,6 W para comprimento de onda UVA (315 a 400 nm) e UVB (280 a 315 nm) com potência de 3 W.

O aparelho constitui-se de uma caixa de madeira com 45 cm de altura, 40 cm de largura e 40 cm de profundidade com abertura frontal. A Lâmpada foi afixada na central superior da caixa (Figura 6).



Figura 6 – Fonte ultravioleta

Para caracterizar a faixa de emissão de radiação pela lâmpada ultravioleta, foi realizada uma curva de tempo “versus” a potência de energia irradiada “versus” a temperatura emitida pelo equipamento. Assim, foi utilizado radiômetro para medida de intensidade de luz UV (Viber Loumart VLX-3.W) com o objetivo de mensurar a variação da radiação ($J/S/m^2$) nos comprimentos de onda específicos de 254 nm (200-290 nm - UVC), 312 nm (290-320 nm - UVB) e 365 nm (320-400 nm - UVA) durante 60 min. A variação de temperatura ($^{\circ}C$) dentro do compartimento ao qual a lâmpada foi instalada foi avaliada com auxílio de um termômetro de mercúrio.

3.3.1.2 Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 frente a exposição UV

O ensaio foi conduzido segundo Mosmann (1983) (94), onde as células foram removidas do frasco de cultivo celular para serem cultivadas em placas de 48 poços. A densidade de $6 \cdot 10^4$ células/poço em volume suficiente de DMEM com SFB 10% para 0,4 mL por poço. Posterior a 24 horas de incubação à $37^{\circ}C$ com 5% de CO_2 , o meio foi retirado e adicionou-se 0,4 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline* – Tampão fostato-salino) em cada um dos poços. Em seguida, quatro poços foram irradiados por 2 minutos (equivalente a $60 J/s/m^2$). Os poços subsequentes, também em

quadruplicatas, foram irradiados pelos tempos de: 4, 6, 8, 10 minutos. Esse ensaio, também contou com os controles de viabilidade e morte. Seguido da irradiação foi realizada a troca do *PBS* por 0,4 mL de meio *DMEM*, sendo a placa encaminhada para incubadora de CO_2 . Posterior a 24 horas, fez-se a adição de 0,1 mL de solução de MTT (1mg/mL), sendo a placa armazenada em incubadora sob mesmas condições por 4 horas. Em seguida foram adicionadas aos poços 0,3 mL de isopropanol acidificado. Também foram feitos brancos da amostra sem a presença de células, nas mesmas condições descritas. A absorbância foi medida em leitora de microplaca à 450 nm.

3.3.1.3 Determinação do nível de glutathiona reduzida

Para determinação da glutathiona reduzida seguiu-se a metodologia de Hissin et. al. com adaptações (96). O ensaio foi conduzido com a utilização de placa de 6 poços, utilizando-se 10^6 células por poços, com 3,0 mL de meio *DMEM* suplementado com 10 % de SFB. Posterior a aderência e com aproximadamente 80% de confluência da linhagem celular, o meio foi removido dos poços, adicionando-se 1,6 mL de *PBS* para que a placa fosse encaminhada para radiação por 2 minutos (equivalente a 60 J/s/m^2) para indução do estresse nas células. Em seguida, o *PBS* foi descartado e adicionou-se o meio *DMEM* incolor contendo as concentrações de extrato, sendo a placa incubada em estufa de CO_2 a 37°C por uma hora. O extrato foi solubilizado previamente em DMSO e meio *DMEM* sem vermelho de fenol (5 mg/mL), posteriormente foi realizada uma diluição na concentração de 2 mg/mL. A partir desta última concentração preparou-se diluições teste de 0,5 a 1 mg/mL, concentrações que foram utilizadas no ensaio.

Após 1 hora de incubação, o meio foi descartado e os poços lavados com *PBS*, sendo que em seguida com auxílio de *cell screper* as células foram removidas dos poços para que todo material presente nos poços fossem recolhidos em microtubos de 2 mL (sob banho de gelo) e encaminhado para processo de centrifugação a 10°C à 1000 rpm por minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 0,4 mL do tampão GSH (NaH_2PO_4 0,1 M com *EGTA* (*Ethylene glycol-bis* (β -aminoethyl

ether) – *N, N, N', N' – tetraacetic acid*) 5 mM – pH 8) e 0,1 mL de ácido tricloroacético 30%. Tais tubos foram centrifugados a 4°C a 10.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente em placa preta de 96 poços adicionou-se 0,1 mL de tampão GSH, mais 0,05 mL do sobrenadante das amostras que foram centrifugadas e 0,05 de solução de oftalaldeído preparada em metanol (1 mg/mL). A leitura foi realizada em leitor de placas com 350 de excitação e 450 de emissão por 10 minutos, com o ajuste de leitura de 1 em 1 minuto.

Foi utilizada glutatona reduzida (Sigma) como padrão, onde utilizou-se as concentrações finais de 0,008; 0,063; 0,125; 0,250; 0,500; 1,000; 10,000; 25,000 e 50,000 μ M. A partir dos dados obtidos com esse padrão, construiu-se um gráfico de concentração frente a resposta apresentado como fluorescência e foi estabelecido a regressão linear dos dados obtendo-se a equação da reta e coeficiente de correlação. Com a utilização desta equação foi possível calcular o teor equivalente de glutatona reduzida encontrada nas amostras testadas.

3.3.2 Avaliação da atividade enzimática

Foi realizado a determinação da atividade funcional por atividade de inibição enzimática dos extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum*.

3.3.2.1 Inibição de tirosinase

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 0,03 mL de solução de tirosinase 250U/mL (α -tirosinase de cogumelo – Sigma), 0,06 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 e 0,01 mL de amostra teste. A mistura foi incubada por 5 min a 25°C. Foram adicionados 100 μ L de solução de L-tirosina (Proquimios) e após 20 min, a absorbância foi medida a 475 nm (97).

3.3.2.2 Preparo das formulações

As formulações foram preparadas no Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Saúde – UnB, sendo preparadas 2 formulações, cuja as composições podem ser visualizada na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição das formulações

Componentes	Marca	Formulação 1 (%)	Formulação 2 (%)
Alcool cetosteárico etoxilado	Cromoline	-	1,00
Alcool cetosteárico	Cromiline	-	2,00
Ciclometicone	Cromoline	2,30	2,00
Ácido etilenodiaminotetraacético (Edta)	Sigma	-	0,10
Glicerina	Dinâmica	2,30	-
Metilparabeno (nipagin)	Synth	0,30	0,20
Hidroxietilcelulose (natrosol)	Aldrich	3,00	2,00
Propilenoglicol	Synth	15,30	1,00
Silicone		-	2,00
Tampão McIlvaine	-	76,68	72,30
Extrato vegetal	-	0,50	0,50

A formulação 1 foi preparada em duas fases (preparo A e preparo B). No preparo A foram misturados natrosol, nipagin, propilenoglicol e tampão McIlvaine pH 5,9 (ácido cítrico 0,1 M e Na₂HPO₄ 0,1 M) (98) sob agitação e aquecimento de 80 °C para garantir homogeneidade. No preparo B foram adicionados ciclometicone e glicerina sob agitação e aquecimento de 80 °C e o procedimento deu-se de forma igual ao do preparo A. Posteriormente foi adicionado o preparo B no preparo A e manteve-se a mistura sob agitação, até aumento da viscosidade do produto. Retirou-se o gel do agitador aferiu-se o pH (5,0), deixando-o em repouso por 24 horas. O mesmo foi envasado em pote branco de policloreto de vinila (PVC), protegido da luz, umidade e calor.

A formulação 2 foi preparada em três fases (fase A, fase B e fase C). Na fase A, o natrosol 250 foi diluído em tampão McIlvaine sob leve aquecimento (25 °C) até a formação do gel. Em seguida adicionou-se EDTA previamente diluído,

homogeneizando constantemente e aquecendo até 45 °C. Na fase B sob banho – maria, o propilenoglicol e o metilparabeno foram dissolvidos e imediatamente adicionados a fase A, sendo estes homogeneizados por 10 minutos. Na fase C, o álcool cetosteárico etoxilado e o álcool cetosteárico foram fundidos em banho – maria (80 °C). Esperou-se o resfriamento por 20 minutos, ou até que atingisse a temperatura de 45 °C. Posteriormente misturou-se o ciclometicone e o silicone, sendo adicionado as fases anteriores, homogeneizando por 10 min.

Tanto a formulação 1 quanto a formulação 2 foram divididas em três partes, onde em uma parte foi incorporado o extrato de *E. daphnites*, na outra parte incorporou-se o extrato de *E. suberosum* e a terceira parte serviu de controle (sem extratos vegetais).

3.3.2.3 Determinação da atividade antioxidante das formulações

A determinação da atividade antioxidante das formulações foi realizada de acordo com a metodologia aplicada durante a padronização dos extratos como descrito anteriormente, que aborda sobre a determinação desta atividade por meio da avaliação da redução do radical DPPH[•]. O método se consistiu na utilização de uma curva de concentrações finais dos extratos incorporados na formulação: 0,96; 1,92; 2,88; 3,85; 5,77; 7,69; 9,62 e 11,54 µg/mL.

3.3.2.4 Determinação da citotoxicidade das formulações

A determinação da citotoxicidade das formulações foi determinada de acordo com a metodologia segundo Mossmann (1983) (94). Neste método foi determinada a citotoxicidade das formulações placebo (sem extrato). As concentrações utilizadas foram baseadas nas concentrações de extrato utilizadas no ensaio de citotoxicidade dos extratos.

3.3.3 Determinação de FPS

3.3.3.1 Determinação de FPS por guia COLIPA

Para a determinação do FPS frente as formulações, foi utilizada a metodologia da COLIPA *in vitro* proveniente do guia “*In vitro method for the determination of the UVA protection factor and critical wavelength values of sunscreen products*”(99).

Nesta metodologia foi utilizado espectrometria de reflectância com esfera integrada e placa de *PMMA* [*Poly(methylmethacrylate)*-Polimetilmetacrilato] contendo as amostras aplicadas na forma de filme.

Três placas de *PMMA* (5x5 cm) foram utilizadas. Utilizou-se álcool 70% para a limpeza das placas. Posteriormente, com o auxílio de uma caneta permanente, foram feitas margens de 1 cm nas placas para demarcar a área de leitura a ser realizada no equipamento. As placas foram nomeadas como A, B e C. Em seguida, foram feitas leituras dessas placas (sem amostra), para obtenção de um branco. Mediu-se as placas em 4 pontos distintos, sendo que as placas foram giradas 3 vezes em sentido horário, para garantir que fosse aferida uma área de pelo menos 2 cm² (99).

As amostras foram aplicadas em uma placa de *PMMA* (triplicata), sendo utilizado o peso como medida de quantidade, colocando-se uma média de 1,3 mg/cm². Como a placa tem 5x5 cm, pesou-se 6,5 mg da amostra em cada placa, colocando frações do protetor espalhadas por toda a placa. Posterior, empregou-se movimentos leves com a utilização da ponta do dedo com luva “pré-saturada” com a amostra para espalha-la sobre toda a superfície da placa. Esse espalhamento foi feito em duas fases. Na primeira fase distribuiu-se o produto em toda a área com a ponta do dedo, sendo feita o mais rápido possível (menos de 30 segundos) sem aplicação de nenhuma pressão. Na segunda fase, esfregou-se durante 20 a 30 segundos, aplicando uma pressão (99).

Em seguida, a placa contendo amostra foi isolada no escuro à cerca de 20 °C por 15 minutos para a formação de uma película estável do produto. Posteriormente, a placa foi retirada do escuro e a amostra foi removida das margens que haviam sido previamente marcadas nas placas. A placa com a amostra foi colocada no

equipamento para a realização das leituras. As placas foram medidas em 4 pontos diferentes, girando a placa 3 vezes em sentido horário, para garantir que fosse aferida uma área de pelo menos 2 cm². O mesmo procedimento foi realizado com as demais placas. Para obtenção dos dados referentes as leituras realizadas o equipamento foi ajustado para realizar varredura entre 400 e 290 nm, com intervalo de 1 nm e o modo de ajuste foi expresso em porcentagem de transmitância (99). Também foi realizada a leitura de protetores solares que já existem no mercado, estes foram denominados de marca A (FPS rotulado 30, contendo os seguintes componentes em sua formulação: avobenzona, dióxido de titânio, hidróxido de alumínio, octocrileno, salicilato de 2-etilhexila) e marca B (FPS rotulado 50, contendo os seguintes componentes em sua formulação: ácido tereftalideno dicanfora sulfônico, avobenzona, octocrileno, bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, dióxido de titânio, etilhexil triazona, hidróxido de alumínio, homosalato, salicilato de 2-etilhexila).

Os dados foram tratados no software Excel® para que os cálculos adequados fossem realizados segundo a equação abaixo (Equação utilizada de acordo com o guia COLIPA (2011), onde os valores de $E(\lambda)$ e $I(\lambda)$ já estão padronizados e são apresentados no guia.

$$\text{SPF}_{in vitro} = \frac{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) * I(\lambda) * d\lambda}{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) * I(\lambda) * 10^{-A_0(\lambda)} * d\lambda}$$

Sendo:

$E(\lambda)$ = Espectro de ação do eritema;

$I(\lambda)$ = Irradiação da fonte UV;

A_0 = Medidas de absorvância monocromática por placa de produto teste antes da exposição ao UV.

d = Intervalo de comprimento de onda (1 nm).

Leitura espectrofotométrica da absorvância da solução preparada no comprimento de onda λ .

D = Wavelength step (1 nm)

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise estatísticas foram usados o software GraphPad Prism® Version 5.01.

Quando realizado comparação entre as amostras por meio de análise de variância, observou-se a distribuição dos dados, de modo que: para dados com distribuição normal, aplicou-se teste paramétricos como *ANOVA (Analysis of variance – Análise de variância)* – Tukey, sendo os dados representados por média e desvio padrão; e para dados de distribuição não-normal, aplicou-se teste não-paramétrico, como *Kruskal-Wallis – Dunn's*, sendo os dados representados por mediana e intervalo inter-quartis. Foram considerados diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS

Foram obtidos seis lotes de extratos aquosos do pulverizado das folhas de *E. daphnites* e sete lotes de extratos aquosos do pulverizado das folhas de *E. suberosum*.

4.1.1 Teor de umidade

É importante a preservação de fitoquímicos presentes na droga vegetal a ser estudada. Portanto, a secagem das folhas das espécies *E. daphnites* e *E. suberosum*, foi realizada objetivando melhor conservação do material vegetal, visando impedir o desenvolvimento de micro-organismos. Assim, com a redução de água nesses materiais, conseqüentemente serão reduzidas as atividades que envolvem reações químicas (hidrólises), bem como o desenvolvimento de micro-organismos (100).

A média do teor de umidade para as folhas de *E. daphnites* foi de 7,83 % \pm 0,47 (n=20). O teor de umidade para a essa espécie foi determinado levando em consideração o estudo de sazonalidade realizado por Martins (2015), em que a foi considerado o teor de umidade para as folhas secas em torno de 8% (25).

A média do teor de umidade para as folhas de *E. suberosum* foi de 10,14 % \pm 1,30 (n=20). Estes teores também mostram-se dentro da variação de porcentagem (6 a 15%) de teores máximos de água aceitáveis para as drogas vegetais presentes nas diferentes monografias da Farmacopeia Brasileira V (83).

4.1.2 Teor de extraíveis

Para avaliar a semelhança entre os teores de sólidos totais dos lotes de extratos de *E. daphnites* e de *E. suberosum* foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis – Dunns,

assim como também foi utilizado o coeficiente da variância para observar a variabilidade de teor entre os lotes de extratos obtidos, além de avaliar a variação desses teores em relação ao limite máximo de variação de 20% para as amostras analisadas (88).

O pulverizado das folhas de *E. daphnites* referentes aos seis lotes de extratos resultaram em teores de sólidos totais que variaram de 3,07 a 3,27%. (Tabela 6). Para os sete lotes de extratos de *E. suberosum* a variação foi de 2,60 a 2,83% (Tabela 7).

Foi calculado o quanto os teores de sólidos totais encontrados para cada lote de *E. daphnites* variaram em relação à média desses teores. O lote 5 (3,07% \pm 0,23), que apresentou o menor teor de sólidos totais variou 2,85% em relação à média, e o lote 3 (3,27% \pm 0,12), que apresentou o maior teor de sólidos totais apresentou uma variação de 3,48%. Entre os lotes de *E. suberosum*, o lote 1 (2,83% \pm 0,25), que apresentou menor teor de sólidos totais variou 4,05% em relação à média, e o lote 2 (2,60% \pm 0,22), que apresentou o maior teor de sólidos totais apresentou uma variação de 4,42% (Figura 7).

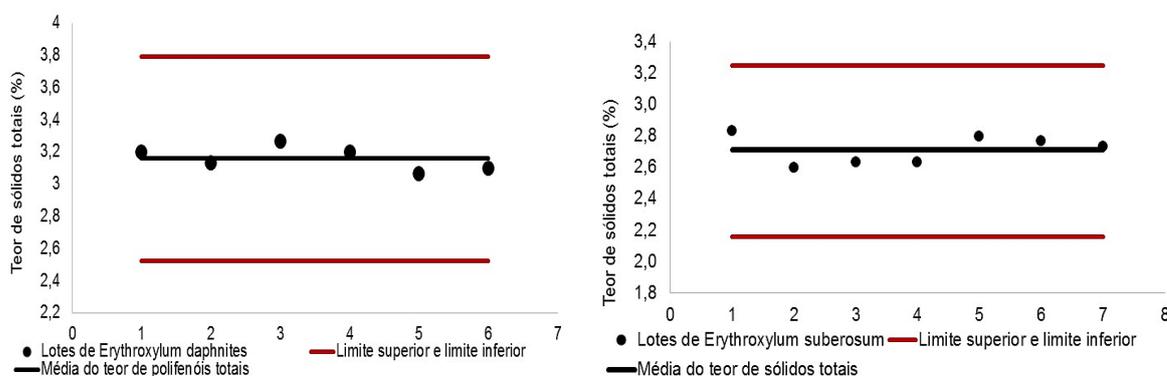


Figura 7 - Limite de variação dos teores de sólidos totais dos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*. Foi determinado \pm 20% como a variação máxima do teor de sólidos totais entre os lotes (n= 3).

Quando determinado o limite máximo de variação de 20% em relação à média dos teores de sólidos totais encontrados, pôde-se observar que todos os lotes de extratos, tanto de *E. daphnites* quanto de *E. suberosum* mantiveram-se dentro da faixa estipulada (Figura 7).

Quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis – Dunns, não foram observadas diferenças significativas entre os teores de sólidos totais encontrados para os lotes de extratos obtidos do pulverizado das folhas de *E. daphnites*, assim como também não

foram encontradas diferenças significativas entre os lotes de extratos de *E. suberosum* (Figura 8).

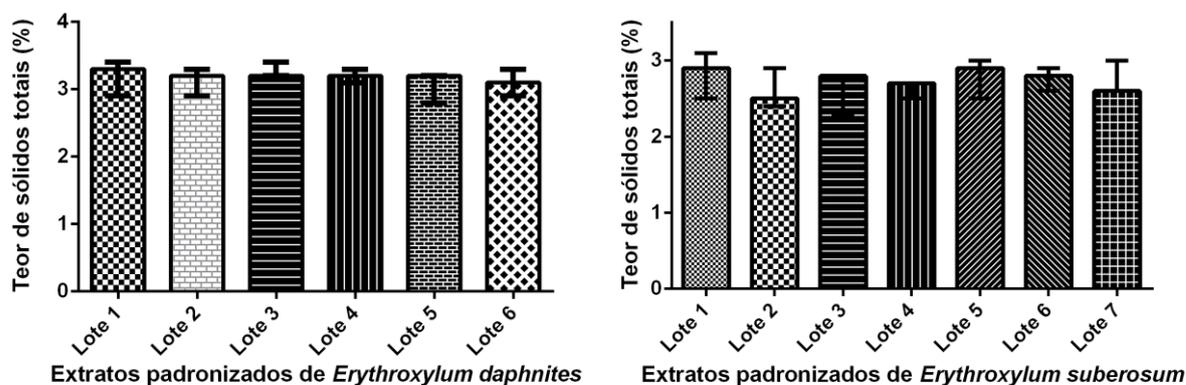


Figura 8 - Teores de sólidos totais dos extratos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*. O teste Kruskal Wallis – Dunns ($p < 0,05$). Dados representados pelas medianas seus respectivos intervalos ($n=3$).

Quando observado o coeficiente de variância dos teores de sólidos totais dos lotes de *E. daphnites*, foi observado que a variação desses teores foi de 2% (Tabela 6). Para os lotes de *E. suberosum* a variação foi de 3% (Tabela 7).

Tabela 6 - Teor de sólidos totais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de *Erythroxyllum daphnites*.

Lotes	% Sólidos (Média $n=3$)	Desvio Padrão	Coeficiente de variância (%)
ED Lote 1	3,20	0,26	8,00
ED Lote 2	3,13	0,21	7,00
ED Lote 3	3,27	0,12	4,00
ED Lote 4	3,20	0,10	3,00
ED Lote 5	3,07	0,23	8,00
ED Lote 6	3,10	0,20	6,00
Comparação dos lotes	3,16	0,07	2,00

Extratos obtidos do processo de infusão. ED = Extrato Aquoso Bruto de *Erythroxyllum daphnites*.

Tabela 7 - Teor de sólidos totais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de *Erythroxylum suberosum*.

Lotes	% Sólidos (Média n=3)	Desvio Padrão	Coefficiente de variância (%)
ES Lote 1	2,83	0,25	9,00
ES Lote 2	2,60	0,22	8,00
ES Lote 3	2,63	0,24	9,00
ES Lote 4	2,63	0,09	4,00
ES Lote 5	2,80	0,22	8,00
ES Lote 6	2,77	0,12	5,00
ES Lote 7	2,73	0,19	7,00
Comparação dos lotes	2,71	0,09	3,00

Extratos obtidos do processo de infusão. ES = Extrato Aquoso Bruto de *Erythroxylum suberosum*.

No que se refere aos teores de sólidos totais, as informações obtidas tornam-se importantes pois, com o uso delas foi possível observar que a mesma forma de extração utilizada para a obtenção de cada um dos lotes mostrou-se efetiva ao manter os teores de sólidos totais de forma semelhante, tornando assim esse critério como um fator de confirmação da padronização dos lotes obtidos para as espécies vegetais *E. daphnites* e *E. suberosum*.

4.1.3 Determinação do rendimento

Os lotes dos extratos obtidos do pulverizado das folhas de *E. daphnites* resultaram em rendimentos que variaram de 8,00 a 11,08 % (Tabela 8). Para os lotes de extratos de *E. suberosum*, os rendimentos variaram de 3,36 a 5,01% (Tabela 9).

Foi calculado o quanto os teores de sólidos totais encontrados para cada lote de *E. daphnites* variaram em relação à média desses teores. Assim, o lote 2, que apresentou o menor teor de sólidos totais variou 20,64% em relação à média. O lote 3, que apresentou o maior teor de sólidos totais apresentou uma variação de 13,93%. Entre os lotes de *E. suberosum*, o lote 5 (apresentou menor teor de sólidos totais) variou 22,75% em relação à média. O lote 6 (apresentou o maior teor de sólidos totais) apresentou uma variação de 15,17% (Figura 9).

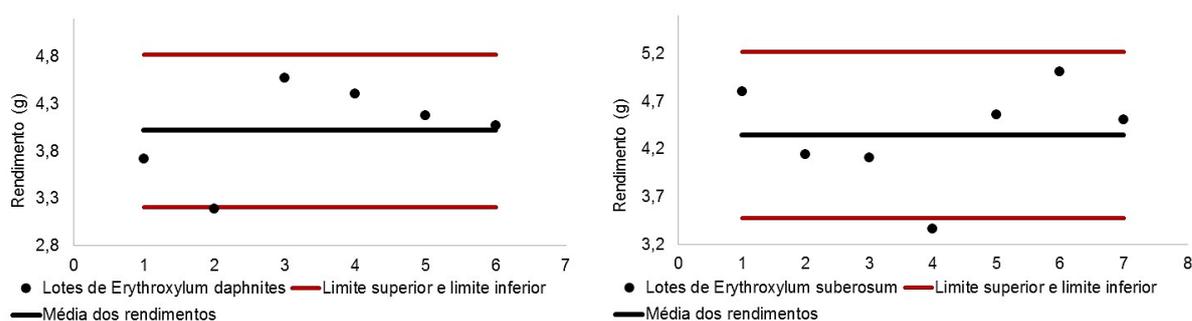


Figura 9 - Limite de variação dos rendimentos dos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*. Foi determinado $\pm 20\%$ como a variação máxima para os rendimentos entre os lotes.

Quando observado o coeficiente de variância dos rendimentos para os lotes de *E. daphnites* e *E. suberosum* foi observado que a variação desses teores foi de 13% (Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 8 - Rendimentos finais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de *Erythroxyllum daphnites*.

Extratos Brutos	Folhas secas pulverizadas (g)	Água (mL)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
ED Lote 1	100	500	3,72	3,72
ED Lote 2	100	500	3,19	3,19
ED Lote 3	100	500	4,58	4,58
ED Lote 4	100	500	4,41	4,41
ED Lote 5	100	500	4,18	4,18
ED Lote 6	100	500	4,07	4,07
Média	100	500	4,03	4,03
Desvio Padrão	0	0	0,50	0,50
Coeficiente de variação (%)	0	0	0,13	0,13

Extratos obtidos pelo processo de infusão. ED Lotes = Extrato de *Erythroxyllum daphnites*.

Tabela 9 - Rendimentos finais dos extratos aquosos brutos do pulverizado das folhas de *Erythroxylum suberosum*.

Extratos Brutos	Folhas secas pulverizadas (g)	Água (mL)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
ES Lote 1	100	500	4,80	4,80
ES Lote 2	100	500	4,14	4,14
ES Lote 3	100	500	4,11	4,11
ES Lote 4	100	500	3,36	3,36
ES Lote 5	100	500	4,56	4,56
ES Lote 6	100	500	5,01	5,01
ES Lote 7	100	500	4,51	4,51
Média	100	500	4,36	4,36
Desvio Padrão	0	0	0,55	0,55
Coeficiente de variação (%)	0	0	0,13	0,13

Extratos obtidos pelo processo de infusão. ES Lotes = Extratos de *Erythroxylum suberosum*.

4.1.4 Polifenóis totais

Essa análise é bem caracterizada pela formação de complexo de coloração azul. Esta cor é dependente do número de hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis (101, 102).

Com base nos dados obtidos a partir das absorbâncias foi possível calcular a regressão linear da curva analítica de ácido gálico obtendo-se a equação da reta ($y = 0,0386x + 0,014$, $r = 0,9954$) e a partir desta foi estabelecido os teores (%) de polifenóis totais em cada extrato.

Para a análise de diferenciação entre os lotes dos extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum* foi utilizado o método ANOVA – Tukey.

Os teores de polifenóis totais encontrados para os lotes dos extratos obtidos do pulverizado das folhas de *E. daphnites* variaram de 2,35 a 2,89 µg/mL (156 a 192 mg/g EAG - 31,45% a 38,64%). Para os lotes de *E. suberosum* a variação foi de 3,39 a 3,87 µg/mL (226 a 258 mg/g EAG - 45,25% a 51,63%).

Quando realizada a comparação dos lotes de extratos de *E. suberosum* não foram observadas diferenças significativas entres eles. Para os lotes de extratos de *E. daphnites* foi observado diferença significativa entre o lote 1 e lote 5. Entre os demais lotes não foram observadas diferenças significativas (Figura 10).

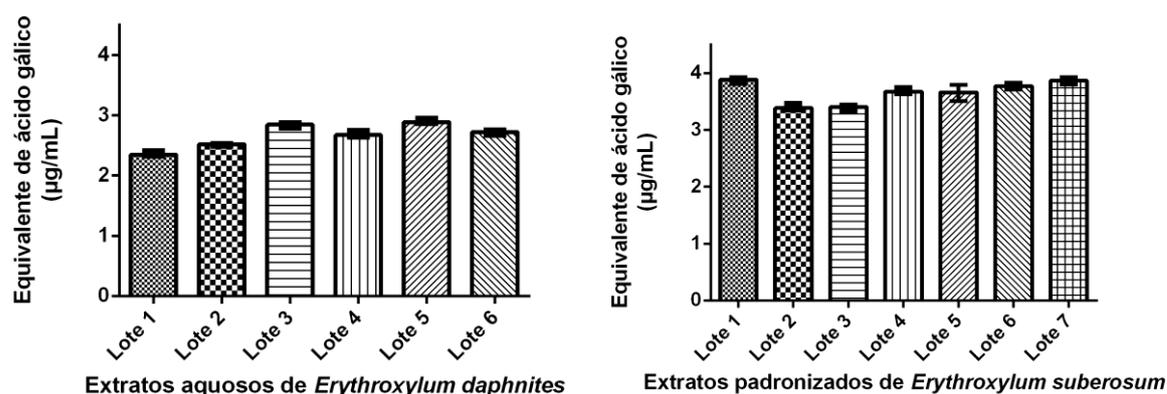


Figura 10 - Teores de polifenóis totais dos extratos de *Erythroxyllum daphnites* e *E. suberosum*. O teste Kruskal Wallis – Dunns ($p < 0,05$). Dados representados pelas medianas e seus respectivos intervalos ($n=3$)

Em relação aos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites*, foi observado que o lote 1 apresentou o menor teor de polifenóis, que variou 11,65% em relação à média, e o lote 5 apresentou o maior teor de polifenóis com variação de 8,64% (Figura 10).

Também foi calculado o quanto os teores de polifenóis encontrados para cada lote de extrato de *E. suberosum* variaram em relação à média desses teores. O lote 3, que apresentou menor teor de polifenóis variou 7,37% em relação à média. O lote 1, que apresentou maior teor de polifenóis apresentou uma variação de 5,73% em relação à média (Figura 10).

Quando traçado limites de variação de 20% em relação à média dos teores de polifenóis encontrados, pôde-se observar que todos os lotes de extratos, tanto de *E. daphnites* quanto de *E. suberosum* mantiveram-se dentro da faixa preconizada (Figura 11).

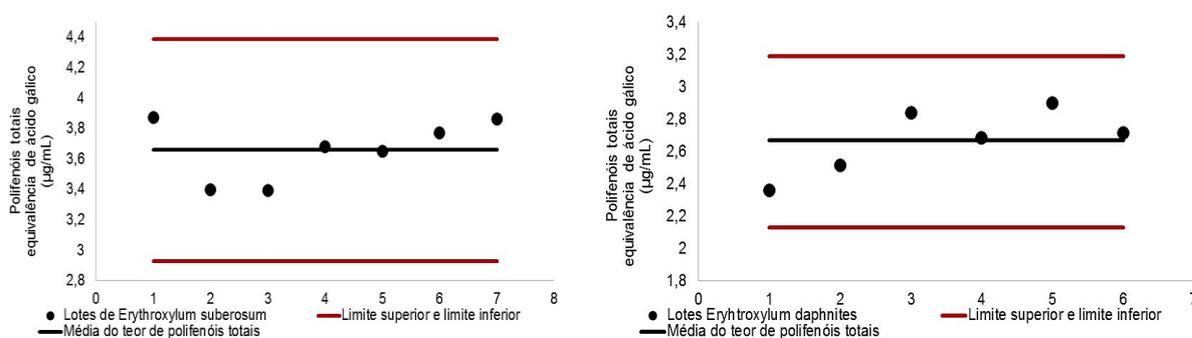


Figura 11 - Avaliação do limite de variação a partir do teor de polifenóis dos lotes relativos aos extratos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*. Foi determinado $\pm 20\%$ como a variação máxima do teor de polifenóis entre os lotes ($n=3$).

Essa faixa aplica-se para o limite de variação permitido da especificação do teor quando o marcador for analítico, sendo permitido uma variação total de 30%, isso com base no 20% de variação permitida para a liberação do lote mais os 10% de variação permitida para o estudo de estabilidade (42).

Quando aplicado teste de comparação entre os teores de polifenóis foi observada diferença entre o lote 1 e 5, referidos a espécie vegetal *E. daphnites*. Porém quando utilizado o limite de variação de 20% em relação à média dos teores encontrados, pôde-se observar que todos os lotes mantiveram-se dentro da faixa esperada. Tais resultados informam que a forma de extração utilizada mostrou-se efetiva e manteve os teores de polifenóis de forma semelhante entre os lotes obtidos. Tornando esse critério um fator de confirmação da padronização dos lotes obtidos, não somente para a espécie vegetal *E. daphnites*, mas também para *E. suberosum* (Figura 11).

Tais resultados também refletem que a padronização dos lotes não está relacionada somente a determinação de mesmos teores encontrados nos produtos (que podem ou não contribuir para a atividade biológica), mas sim na confirmação da presença destes, dentro de uma faixa pré-determinada. Assim, é importante a determinação de uma faixa de variação dos teores entre os lotes obtidos, que também visa auxiliar não só na garantia da atividade biológica do produto, mas também contribui para dificultar processos de fraudes, contribuindo assim para uma melhor garantia da qualidade do medicamento.

Além dos dados obtidos frente aos teores de polifenóis observados e utilizados como marcadores de padronização dos extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum*, é importante destacar que de acordo com revisão realizada por Perron e Brumaghim (2009) (103), inseridos na classe dos polifenóis existem subclasse com diversos tipos de compostos distintos e dentre essas subclasses, destacam-se os flavonóides, antocianinas e catequinas (Figura 12).

Por conseguinte, os polifenóis são amplamente estudados devido as suas propriedades antioxidantes, sendo essas propriedades ligadas não somente a capacidade de prevenção a danos causados por EROs, como também, para evitar a produção dessas espécies. Contudo, os polifenóis não são reconhecidos apenas por suas funções antioxidantes, mas também por outras atividades biológicas como

atividade anti-histamínica, antiinflamatória, antibacteriana e antivirais, além do seu uso frente a doenças neurodegenerativas e câncer (103).

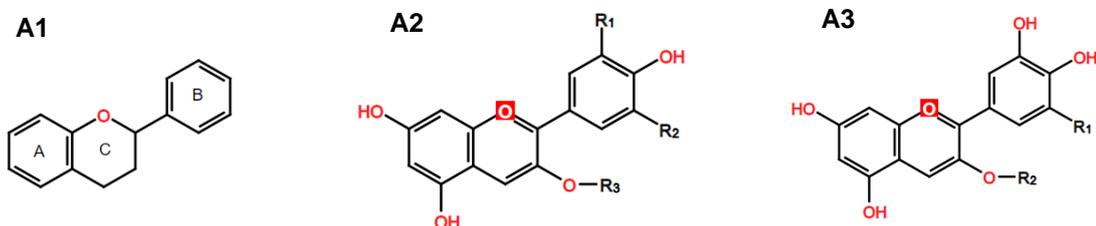


Figura 12: Subclasses de compostos químicos pertencentes ao grupo de químico dos polifenóis. **A1**: Estrutura básica de um flavonoide. **A2**: Antocianinas. **A3**: Catequinas. Os grupos R são tipicamente H, OH, OCH₃ ou grupos de hidratados de carbono, a depender do composto.

Quando realizada comparação dos teores de polifenóis encontrados para a média obtida para os lotes de *E. daphnites* (178 mg/g EAG - 35,60%) e *E. suberosum* (244 mg/g EAG - 48,80%) com os dados da literatura foi possível observar que os teores aqui encontrados foram superiores aos das seguintes espécies de *Erythroxyllum*: extrato aquoso das folhas de *Erythroxyllum macrocarpum* (40 mg/g EAG) (104); extrato aquoso das folhas de *Erythroxyllum sideroxyloides* (24 mg/g EAG) (105); extrato da fração alcaloidal das folhas de *Erythroxyllum coca* (48,5 mg/g EAG);

4.1.5 Perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O método em CCD é bastante difundido com o propósito da separação, identificação e quantificação de compostos em extratos brutos ou semi purificados (106). Sendo a obtenção do perfil cromatográfico importante como uma das garantias da identidade da droga vegetal, uma vez que a obtenção deste perfil seja obtida por meio de condições definidas que possibilite a identificação da espécie vegetal em questão e contribua para a diferenciação de outras espécies (107). Assim o perfil cromatográfico torna-se responsável por auxiliar na avaliação da consistência da qualidade da identidade dos lotes. O perfil cromatográfico é utilizado na identificação química do material vegetal, como um critério de exigência para a droga vegetal,

derivado vegetal e produto químico acabado no momento do registro, notificação ou renovação do registro, além de ser solicitado em algumas petições pós registro (42).

Previamente, tanto para os lotes de extratos de *E. daphnites* como para os lotes de *E. suberosum* foi aplicado a técnica de ponto misto, para verificar a semelhança entre os *Rf* dos padrões e as machas encontradas nas amostras. Deste modo, foram utilizados os padrões ácido neoclorogênico (3-O-cafeioquímico ácido) (Figura 13:A1) e hiperosídeo (Figura 13:A2) para as comparações. Posterior a confirmação por pontos mistos destes padrões, foram feitas CCD contendo cada um dos lotes das espécies de *Erythroxylum* com adição dos padrões respectivo nas placas cromatográficas.

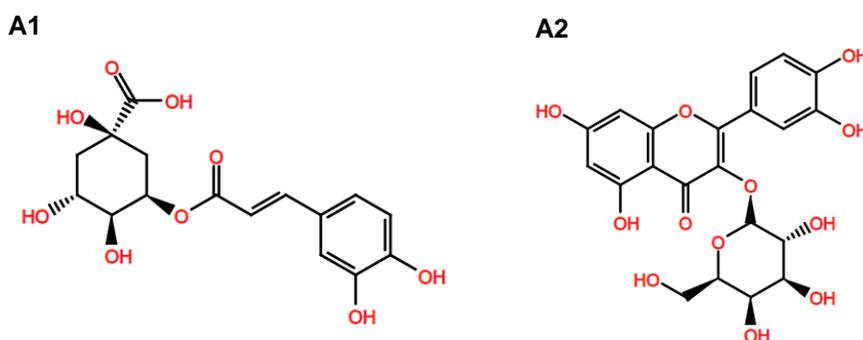


Figura 13: Estruturas químicas dos marcadores identificados por Cromatografia de Camada Delgada para os lotes de extratos do pulverizado das folhas de *Erythroxylum daphnites* e *Erythroxylum suberosum*. **A1**: Ácido neoclorogênico (3-O-cafeioquímico). **A2**: Hiperosídeo (3-O-galactose).

Foi possível observar o mesmo perfil cromatográfico por CCD para todos os lotes de extratos provenientes das folhas pulverizadas de *E. daphnites*. Todos os lotes apresentaram presença de 4 bandas: dois pontos alaranjados (*Rf* ~ 0,40 e 0,45) seguidos de um azul, identificado como ácido neoclorogênico (*Rf* ~0,75) e por fim um ponto de cor laranja (*Rf* ~0,90) (Figura 14).

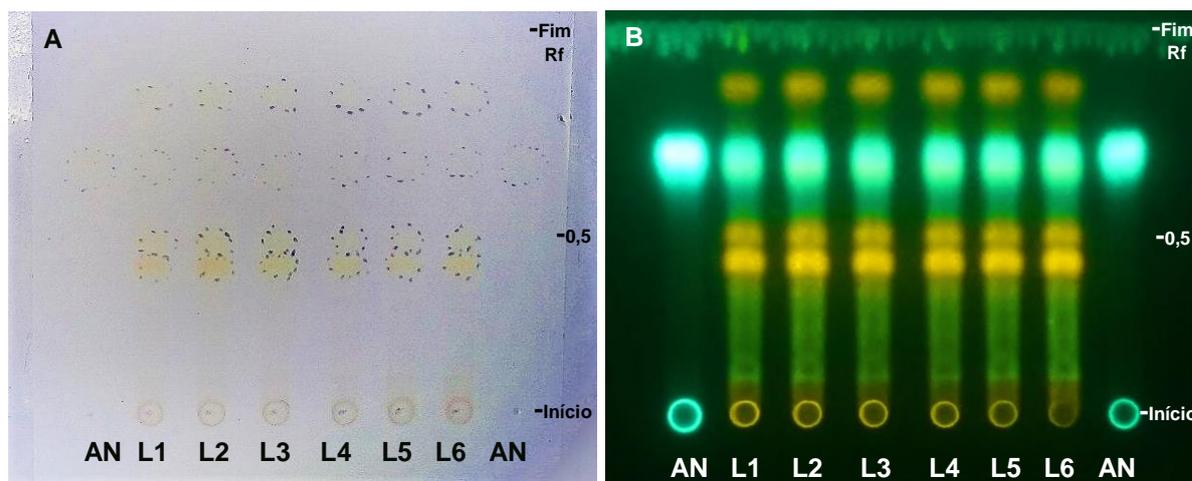


Figura 14 - Perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para os lotes de extratos provenientes do pulverizado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. A: CCD → VIS e B: CCD → UV-365 nm. AN: Ácido neoclorogênico ($R_f \sim 0,65$). L1: Lote 1; L2: Lote 2; L3: Lote 3; L4: Lote 4; L5: Lote 5 e L6: Lote 6. Solução eluente composta por acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26). Solução reveladora: difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP/PEG). Análise realizada em folhas de alumínio em sílica gel.

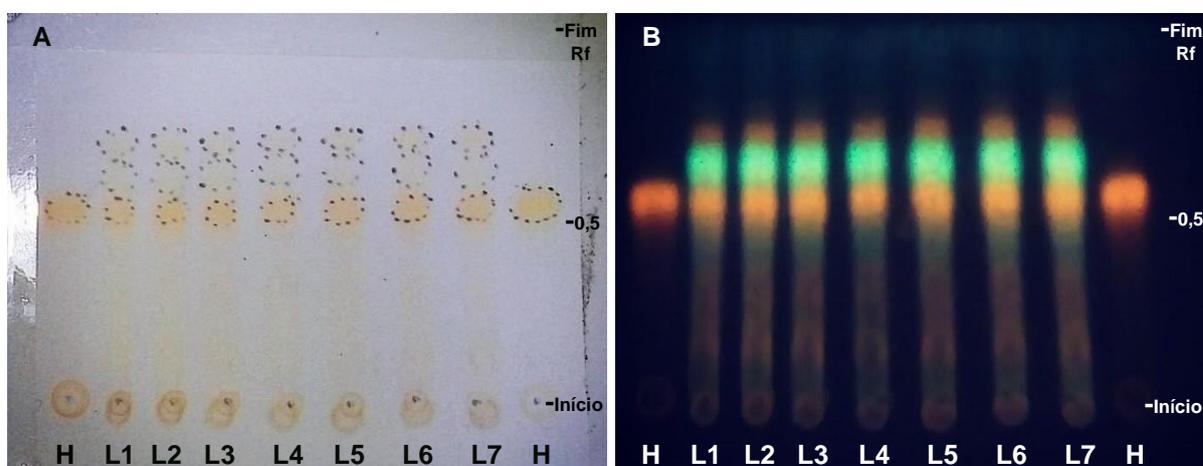


Figura 15 - Perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para os lotes de extratos provenientes do pulverizado das folhas de *Erythroxylum suberosum*. A: CCD → VIS e B: CCD → UV-365 nm. H: Hiperosídeo ($R_f \sim 0,55$). L1: Lote 1; L2: Lote 2; L3: Lote 3; L4: Lote 4; L5: Lote 5; L6: Lote 6 e L7: Lote 7. Solução eluente composta por acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:05). Solução reveladora: difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP/PEG). Análise realizada em folhas de alumínio em sílica gel.

Para os lotes de extratos provenientes das folhas pulverizadas de *E. suberosum* foi possível observar que os lotes apresentaram o mesmo perfil cromatográfico por CCD. Todos os lotes apresentaram presença de três bandas.

Sendo a banda correspondente ao $R_f \sim 0,55$ identificado como hiperosídeo, seguido de uma banda azulada ($R_f \sim 0,70$) e outra banda alaranjada ($R_f \sim 0,75$) (Figura 15).

Por meio da CCD foi possível observar qualitativamente que os lotes de extratos obtidos do pulverizado das folhas de *E. daphnites* possuem perfis cromatográficos semelhantes, sendo que a mesma interpretação, no que refere-se a semelhança entre os lotes, foi observada para a espécie de *E. suberosum*. Assim foi certificado que não houve diferença na composição fitoquímica qualitativa entre os lotes para cada uma das espécies.

A determinação do perfil cromatográfico por CCD mostrou-se um fator importante, pois teve como objetivo estabelecer o perfil fitoquímico para os produtos que foram analisados, sendo seu papel um fator que visa não só estabelecer o perfil fitoquímico para as espécies de *Erythroxylum*, mas também contribuir como ferramenta para evitar processos de fraudes na obtenção de produtos fitoterápicos. Desta maneira, quando produzido extratos vegetais nas mesmas condições relatadas por esse estudo, a avaliação do perfil em CCD para as espécies de *E. daphnites* e *E. suberosum* deverão ser semelhantes aos achados aqui presentes.

Os marcadores encontrados e utilizados na padronização dos lotes de extratos aquosos das folhas pulverizadas provenientes das espécies vegetais *E. daphnites* e *E. suberosum* identificadas pelo método de CCD tratam-se a compostos pertencentes ao grupo dos polifênóis.

Dentre os polifenóis, o ácido clorogênico é um dos mais antigos e conhecido frente aos ácidos cafeoquímicos existentes, porém existem outros isômeros deste composto, como por exemplo o ácido neoclorogênico (108). O ácido neoclorogênico foi descrito e isolado, pela primeira vez, por Corse, (1953) (109). Frente a atividades biológicas avaliadas frente a esse compostos, foi observada atividade antioxidante (110, 111), atividade antiinflamatória (111-114), atividade herbicida (115), anticancerígena frente a linhagem celular AGS GC (*Homo sapiens*, *Stomach Gastric Adenocarcinoma*, *Gastric Cancer* - Adenocarcinoma Gástrico do Estômago, Câncer Gástrico) e *in vivo* (116) e efeito inibitório de aldose redutase *in vivo* (110).

Quando realizada busca bibliográfica de artigos científicos sobre a identificação do ácido neoclorogênico em espécies da família Erythroxylaceae por métodos cromatográficos, foi encontrado somente um trabalho relatando presença desse

compostos em um extrato metanólico das folhas de *Erythroxylum macrophyllum* por CLAE (115).

O hiperosídeo (Figura 13/A2), por sua vez trata-se de um composto fenólico, também compreendido dentro do grupo dos polifenóis. Em revisão realizada por Raza et. al (2016) foram levandadas as atividades farmacológicas do hiperosídeo: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, antidepressiva, antidiabética, anti-câncer, antiviral, além de atividade protetora no cérebro, cardio-protetora, hepato protetora, atividade imunomoduladora e atividade inibitória de isoformas do citocromo P450 (117).

Ao realizar busca de artigos científicos sobre a identificação de hiperosídeo em espécies da família Erythroxylaceae por métodos cromatográficos, foi observado hiperosídeo em: extratos aquosos e etanólicos das folhas rasuradas de *E. daphnites* por CCD (25), extratos aquosos e etanólicos das folhas rasuradas de *E. suberosum* por CCD e CLAE-DAD (32), fração hidrometanólica de *Erythroxylum suberosum* por CLAE-DAD (118).

Perfil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Posterior à obtenção dos seis lotes de extrato do pulverizado das folhas de *E. daphnites* e sete lotes de extrato do pulverizado das folhas de *E. suberosum*, foram realizadas análises para os lotes referentes as duas espécies de *Erythroxylum* por cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a *Diode Array Detector - DAD* (Detector de matriz de diodos), visando identificar, quantificar compostos e obter o perfil cromatográfico por CLAE-DAD.

O perfil cromatográfico por CLAE-DAD obtido para *E. daphnites* encontra-se na Figura 16 e o perfil cromatográfico para *E. suberosum* encontra-se na Figura 17. Foram destacados onze picos principais para os lotes de *E. daphnites* e oito para os lotes de *E. suberosum*, com base nas purezas $\geq 0,9500$ encontradas.

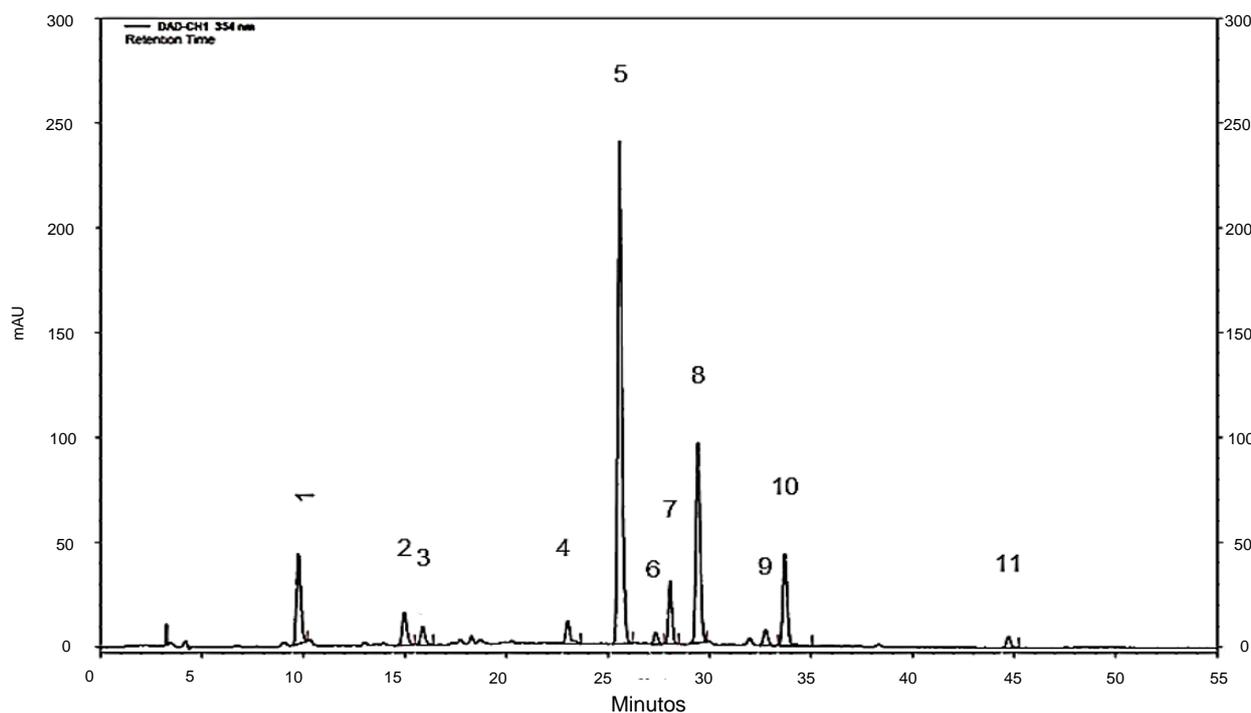


Figura 16 - Perfil cromatográfico representativo para extrato de *Erythroxylum daphnites*. Cromatograma obtidos por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência. Condições da análise: Coluna - PurospherStar RP C18e mantida à 25 °C; Fluxo - 0,6 mL/min; Eluente - ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Detector - DAD; Sistema de eluição – gradiente e; Cromatograma em 354 nm.

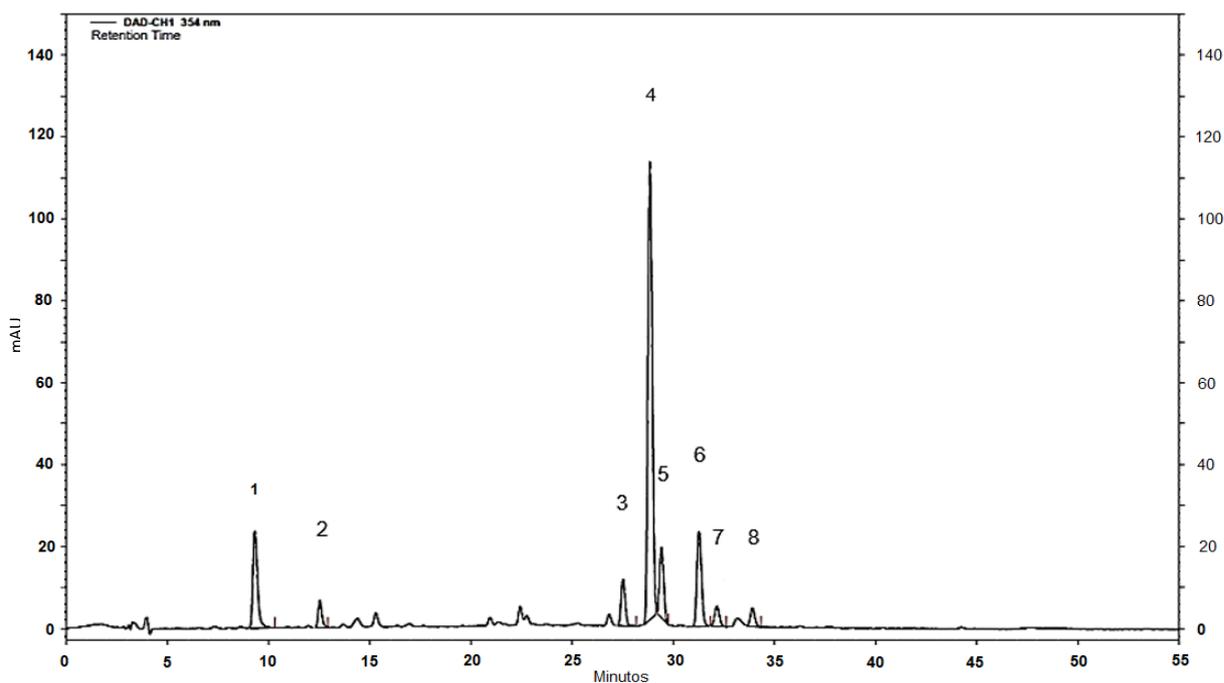


Figura 17 - Perfil cromatográfico representativo para extrato de *Erythroxylum suberosum*. Cromatograma obtido por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência. Condições da análise: Coluna - PurospherStar RP C18e mantida à 25 °C; Fluxo - 0,6 mL/min; Eluente - ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Detector - DAD; Sistema de eluição – gradiente e; Cromatograma em 354 nm.

Os testes de validação pelo método CLAE – DAD foram linearidade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade, seletividade e exatidão realizadas para os lotes de número 2 de ambas as espécies.

4.1.6 Validação CLAE - DAD

Para a espécie vegetal *E. daphnites* foi identificado ácido neoclorogênico enquanto que para a espécie *E. suberosum* foram identificados hiperosídeo e ácido neoclorogênico, sendo que posteriormente o método foi validado para a quantificação destes marcadores.

4.1.6.1 Limite de detecção (LD e limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ representam a menor quantidade da substância que pode ser detectada e quantificada, respectivamente, em uma amostra (87). Os limites foram estabelecidos a partir dos resultados referentes as menores concentrações do ensaio de linearidade. Foram utilizados o desvio padrão da secção de y (DPI) e a inclinação da curva de calibração (S) para a realização dos cálculos. Dentro faixa de concentração de 5 a 100 µg/mL para o marcador ácido neoclorogênico, o LD foi de 1,83 µg/mL e o LQ foi de 6,12 µg/mL (Tabela 10).

Tabela 10 - Limites de detecção e quantificação dos marcadores estabelecidos.

Padrão	Concentração (µg/mL)	DPI	S	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Ácido neoclorogênico	5 – 100	37767	61682	1,83	6,12
Hiperosídeo	2,5 – 100	46007	133146	1,14	3,45

DPI: Desvio padrão da intercepta de y; S: inclinação da reta; LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação.

Tais resultados indicam que quando forem realizadas as análises para a identificação e quantificação de ácido neoclorogênico, deve-se utilizar concentrações > 1,83 µg/mL para que ele possa ser detectado pelo equipamento. Quanto a

quantificação faz-se necessário a utilização de concentrações > 6,12 µg/mL para que ele possa ser quantificado com exatidão.

Em relação ao padrão hiperosídeo, deve-se utilizar concentrações > 1,14 µg/mL para que ele possa ser detectado pelo equipamento. Em relação a quantificação, faz-se necessário o uso de concentrações > 3,45 µg/mL para que o padrão possa ser quantificado com exatidão.

Assim, os limites de detecção encontrados para os padrões utilizados, são indicativos que o método possui boa sensibilidade para detectar e quantificar, pois os valores encontrados mostraram-se baixos.

4.1.6.2 Linearidade

A linearidade trata-se da capacidade da metodologia analítica em demonstrar a proporcionalidade entre os resultados adquiridos e a concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado como uma faixa entre os limites de quantificação superior e inferior (87).

Para cada padrão foi constituído de três curvas independentes, sendo que para o padrão ácido neoclorogênico utilizou-se cinco concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e para o hiperosídeo utilizou-se seis concentrações (2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL). Para cada concentração utilizou-se três replicatas.

A partir das médias das áreas dos picos das três curvas em relação as suas concentrações respectivas, calculou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foi determinado, utilizando o *software GraphPadPrism®*. Assim, foi obtido a equação da reta ($y = 61682x + 37767$; $r = 0,9998$) para o ácido neoclorogênico e a equação da reta ($y = 133146x - 46006$; $r = 0,9999$) para o hiperosídeo.

As curvas de regressão linear obtidas apresentaram linearidade na faixa de concentração testada, sendo que todos os coeficientes de correlação (r) apresentaram $r > 0,99$ como exigido pela RE 899/2003 (87) em consonância com a RDC N. 166/2017 (88). As curvas obtidas demonstraram que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (Figura 18).

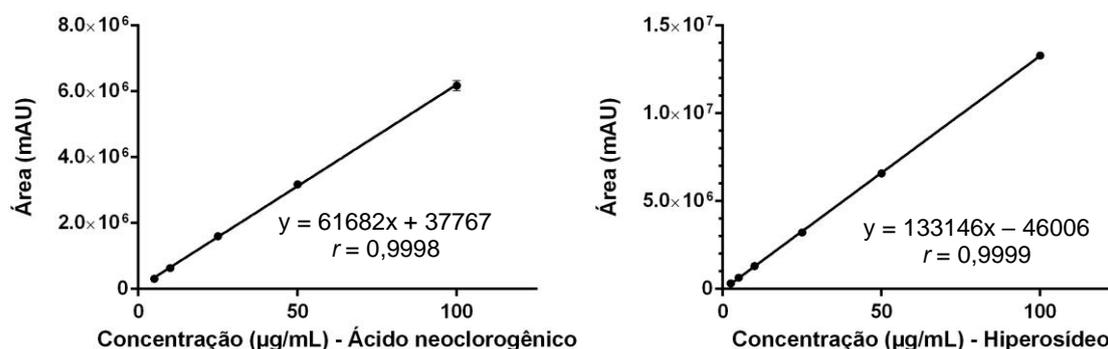


Figura 18 - Curva de regressão linear obtidas para os padrões ácido neoclorogênico e hiperosídeo. Curva construída a partir das médias das áreas dos picos das três curvas em relação as suas concentrações respectivas com três replicatas para cada uma das concentrações utilizadas para os padrões ácido neoclorogênico e hiperosídeo.

4.1.6.3 Precisão

A precisão refere-se a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, e essa pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (87).

Repetibilidade (precisão inter-corrída), tem como objetivo analisar a concordância entre os resultados obtidos em um curto período, com mesmo analista e mesma instrumentação (87). Essa avaliação foi determinada por meio da análise de seis amostras dos extratos de *E. daphnites* (Lote 2 – 5 mg/mL) e *E. suberosum* (Lote 2 – 2 mg/mL). Análise realizada em um único dia pelo mesmo analista e no Laboratório Controle da Qualidade de Medicamentos – Faculdade de Saúde (UnB), Brasília.

Reprodutibilidade (precisão intermediária) tem como objetivo verificar as variações intralaboratoriais devido a eventos aleatórios, como dias diferentes, analistas, equipamentos, entre outros (87). Essa avaliação foi determinada por análise de três amostras dos extratos de *E. daphnites* (Lote 2 – 5 mg/mL) e *E. suberosum* (Lote 2 – 2 mg/mL) em dois dias distintos, pelo mesmo analista, e utilizando o mesmo equipamento que foi usado para avaliar a repetibilidade realizado no Laboratório Controle da Qualidade de Medicamentos – Faculdade de Saúde (UnB), Brasília.

No que se refere ao marcador ácido neoclorogênico para o extrato de *E. daphnites* (Lote 2) e relativo aos marcadores ácido neoclorogênico e hiperosídeo para o extrato de *E. suberosum* (Lote 2), as análises de repetibilidade e reprodutibilidade estão dentro do que é preconizado pela RE nº 899 consonância com a RDC N. 166/2017 (88) com DPR < 5% (Tabela 11) e (Tabela 12).

Estes resultados também são indicativos de boa precisão, pois utilizando o Guia de orientação para registros de Medicamentos Fitoterápicos e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico, não são admitidos valores de DPR superiores a 15% (42).

Tabela 11 - Precisão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para o marcador ácido neoclorogênico em extrato de *Erythroxylum daphnites* (Lote 2).

Precisão Avaliada	Área (mAU)	
	Média ± Desvio Padrão	DPR (%)
¹ Repetibilidade	2548276 ± 29436	1,16
² Reprodutibilidade	2552741 ± 13326	0,52

¹Seis replicatas foram analisadas no mesmo dia. ²Três replicatas foram analisadas em três dias distintos pelo mesmo analista. DPR: Desvio padrão relativo.

Tabela 12 - Precisão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para os marcadores ácido neoclorogênico e hiperosídeo em extrato de *Erythroxylum suberosum* (Lote 2).

Precisão Avaliada	^a Área (mAU)		^b Área (mAU)	
	Média ± Desvio Padrão	DPR (%)	Média ± Desvio Padrão	DPR (%)
¹ Repetibilidade	1465465 ± 66223	4,52	6154048 ± 223443	3,63
² Reprodutibilidade	1486622 ± 36367	2,64	6204254 ± 117317	1,90

¹Seis replicatas foram analisadas no mesmo dia. ²Três replicatas foram analisadas em três dias distintos pelo mesmo analista. DPR: Desvio padrão relativo. ^aÁcido neoclorogênico. ^bHiperosídeo.

4.1.6.4 Seletividade

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (87). Os lotes de número 2 referente aos extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum* foram submetidos a um processo de

estresse, por meio da indução de hidrólise básica e ácida sob temperatura de 60 °C pelo período de 60 minutos, sendo os resultados obtidos comparados posteriormente com os dados das amostras que não sofreram indução de hidrólise.

A) *Erythoxylum daphnites*

Foram encontrados onze picos considerados como os picos principais para *E. daphnites*. Dentre eles, foi identificado a presença do composto ácido neoclorogênico (Figura 19).

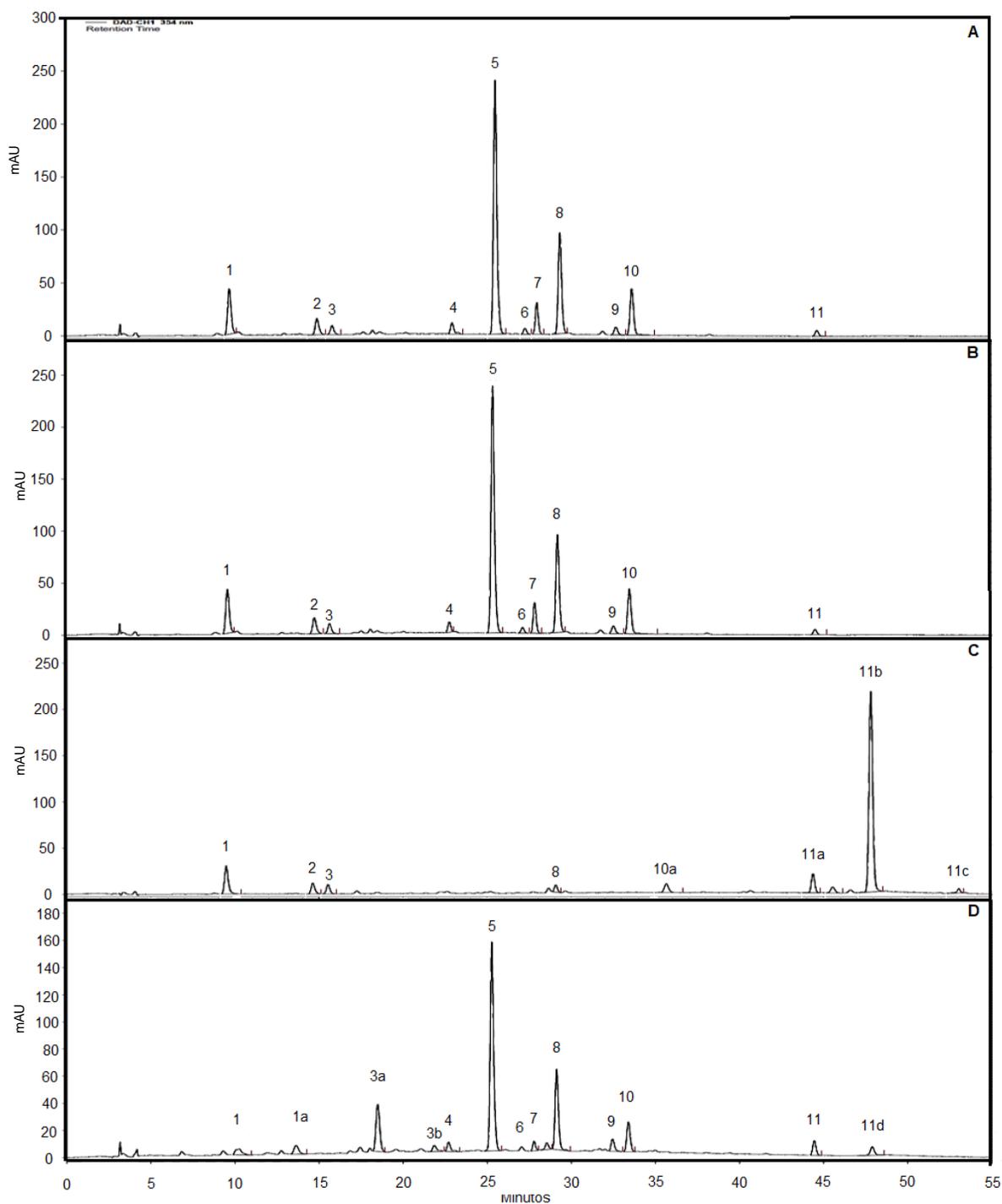


Figura 19 - Seletividade analisada por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para o extrato (Lote 2) de *Erythroxylum daphnites* por hidrólise induzida. **A:** Cromatograma do extrato; **B:** Cromatograma do extrato com indução de hidrólise. **C:** Cromatograma do extrato com indução de hidrólise ácida; e **D:** Cromatograma do extrato com indução de hidrólise básica. As induções de hidrólises foram submetidas por 60 minutos à 60 °C. Condições da análise: Coluna - PurospherStar RP C18e mantida à 25 °C; Fluxo - 0,6 mL/min; Eluente - ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Detector - DAD; Sistema de eluição – gradiente e; Cromatograma em 354 nm.

Tabela 13 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxyllum daphnites* não submetido a hidrólise.

Picos	Tempo de retenção		Área (mAU)	Coeficiente de variância
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão		
1 Ácido neoclorogênico	09,82 ± 0,10	2556782 ± 42749		0,02
2	15,08 ± 0,14	984913 ± 16037		0,02
3	15,99 ± 0,14	534399 ± 5662		0,01
4	23,13 ± 0,14	664042 ± 6556		0,01
5	25,69 ± 0,14	13813605 ± 219285		0,02
6	27,47 ± 0,13	303433 ± 4455		0,01
7	28,16 ± 0,12	1469681 ± 24425		0,02
8	29,56 ± 0,15	5471616 ± 89124		0,02
9	32,90 ± 0,15	472401 ± 7612		0,02
10	33,84 ± 0,15	2694228 ± 47107		0,02
11	44,83 ± 0,12	318020 ± 6911		0,02

Análise das amostras realizadas em triplicata.

Após a hidrólise sob temperatura de 60 °C por 60 minutos submetida ao extrato (Lote 2) de *E. daphnites*, não foi observada degradação completa de nenhum dos picos, porém houve degradação parcial, sendo que tais degradações resultaram na diminuição de 1,37 a 27,16% das áreas dos picos restantes. Também não foi observada formação de picos originários de degradação. Referente ao marcador definido, foi observada uma redução de 3,27% (pureza 1) para ácido neoclorogênico. Não foi observado coeluição com produtos de degradação resultantes da hidrólise. Esses resultados demonstram a seletividade do método na identificação dos marcadores destacados (Tabela 14) (Figura 19).

Tabela 14 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxyllum daphnites* submetido a hidrólise à 60 °C por 60 minutos.

Picos	Tempo de retenção	Área (mAU)		Degradação (%)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variância	Média ± Desvio padrão
1 Ácido neoclorogênico	9,60, ± 0,02	2472862 ± 28145	0,01	3,27 ± 0,84
2	14,78 ± 0,03	964024 ± 10407	0,01	2,11 ± 0,90
3	15,69 ± 0,03	573295 ± 7068	0,01	7,28 ± 0,30
4	22,82 ± 0,04	483681 ± 8824	0,02	27,16 ± 0,53
5	25,39 ± 0,05	13606382 ± 195097	0,01	1,50 ± 0,80
6	27,17 ± 0,05	298879 ± 4484	0,02	1,50 ± 0,31
7	27,17 ± 0,05	1446135 ± 19323	0,01	1,59 ± 1,10
8	29,25 ± 0,04	5382033 ± 80351	0,01	1,63 ± 0,90
9	32,58 ± 0,04	464931 ± 8903	0,02	1,58 ± 1,00
10	33,53 ± 0,04	2658400 ± 42957	0,02	1,50 ± 0,96
11	44,56 ± 0,04	313621 ± 4045	0,01	1,37 ± 1,01

Análise das amostras realizadas em triplicata.

Após a hidrólise ácida sob temperatura de 60 °C por 60 minutos submetida ao extrato (Lote 2) de *E. daphnites* foi observada degradação completa dos picos 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11 enquanto que os demais picos foram parcialmente degradados. Tais degradações resultaram na diminuição de 10,76 a 92,81% das áreas dos picos restantes. Também foram observadas a formação de mais 4 picos como produtos de degradação, sendo esses nomeados de 10a, 11a, 11b e 11c. Referente ao marcador definido, foi observada uma redução de 24,55% (pureza 1) para ácido neoclorogênico. Não foram observadas coeluições com produtos de degradação resultantes da hidrólise. Assim, esses resultados demonstram a seletividade do método na identificação dos marcadores destacados (Tabela 15) (Figura 19).

Tabela 15 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxyllum daphnites* submetido a hidrólise ácida por 60 minutos à 60 °C.

Picos	Tempo de retenção	Área (mAU)		Degradação (%)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variância	Média ± Desvio padrão
1 Ácido neoclorogênico	09,47 ± 0,00	1929309 ± 50288	0,03	24,55 ± 0,58
2	14,62 ± 0,01	720654 ± 14178	0,02	26,82 ± 1,65
3	15,52 ± 0,01	511017 ± 60572	0,12	10,76 ± 2,17
8	29,08 ± 0,02	393124 ± 10436	0,03	92,81 ± 0,20
*10a	35,67 ± 0,02	770241 ± 18791	0,02	x
*11a	44,40 ± 0,03	1155576 ± 20482	0,02	x
*11b	45,57 ± 0,02	456678 ± 3791	0,01	x
*11c	47,83 ± 0,02	13916091 ± 344586	0,02	x

Análise das amostras realizadas em triplicata. * Pico referente a produto de degradação. X = não foi calculado porcentagem de degradação, uma vez que o pico trata-se de um produto de degradação.

Após a hidrólise básica sob temperatura de 60 °C por 60 minutos submetida ao extrato (Lote 2) de *E. daphnites* foi observada degradação completa dos picos 2 e 3, enquanto que os demais picos foram parcialmente degradados, sendo que tais degradações resultaram na diminuição de 5,95 a 86,31% das áreas dos picos restantes, assim como foram observadas a formação de mais 4 picos como produtos de degradação, sendo esses nomeados de 1a, 3a, 3b e 11c. Referente ao marcador definido, foi observado degradação de 81,12 %, ainda assim, foi possível identifica-lo. Não foram observadas coeluições com produtos de degradação resultantes dessa hidrólise. Esses resultados demonstram a seletividade do método na identificação do marcador destacado (Tabela 16) (Figura 19).

Tabela 16 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxyllum daphnites* submetido a hidrólise básica submetido a 60 °C por 60 minutos.

Picos	Tempo de retenção	Área (mAU)		Degradação (%)
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Coefficiente de variância	Média ± Desvio Padrão
1 Ácido neoclorogênico	10,26 ± 0,03	482458 ± 8029	0,02	81,12 ± 0,48
*1a	13,63 ± 0,03	496208 ± 14878	0,03	x
*3a	18,49 ± 0,03	2149115 ± 45966	0,02	x
*3b	21,85 ± 0,02	300851 ± 21660	0,07	x
4	22,69 ± 0,02	384533 ± 64346	0,17	42,05 ± 8,19
5	25,26 ± 0,02	8561450 ± 136176	0,02	38,00 ± 1,58
6	27,78 ± 0,01	321370 ± 10628	0,03	5,95 ± 3,91
7	28,53 ± 0,01	285767 ± 4545	0,02	80,55 ± 0,46
8	29,12 ± 0,02	3281041 ± 57605	0,02	40,01 ± 1,63
9	32,44 ± 0,02	505514 ± 7123	0,01	7,04 ± 2,53
10	33,40 ± 0,02	1233687 ± 15941	0,01	54,19 ± 1,11
11	44,45 ± 0,02	592172 ± 11377	0,02	86,31 ± 6,10
*11d	46,90 ± 0,02	413607 ± 39273	0,09	x

Análise das amostras realizadas em triplicata. * Pico referente a produto de degradação. X = não foi calculado porcentagem de degradação, uma vez que o pico trata-se de um produto de degradação.

B) *Erythroxyllum suberosum*

Foram encontrados oito picos considerados como os picos principais para *E. suberosum*, dentre eles, foram identificados por CLAE a presença dos compostos: ácido neoclorogênico e hiperosídeo (Tabela 17) (Figura 20).

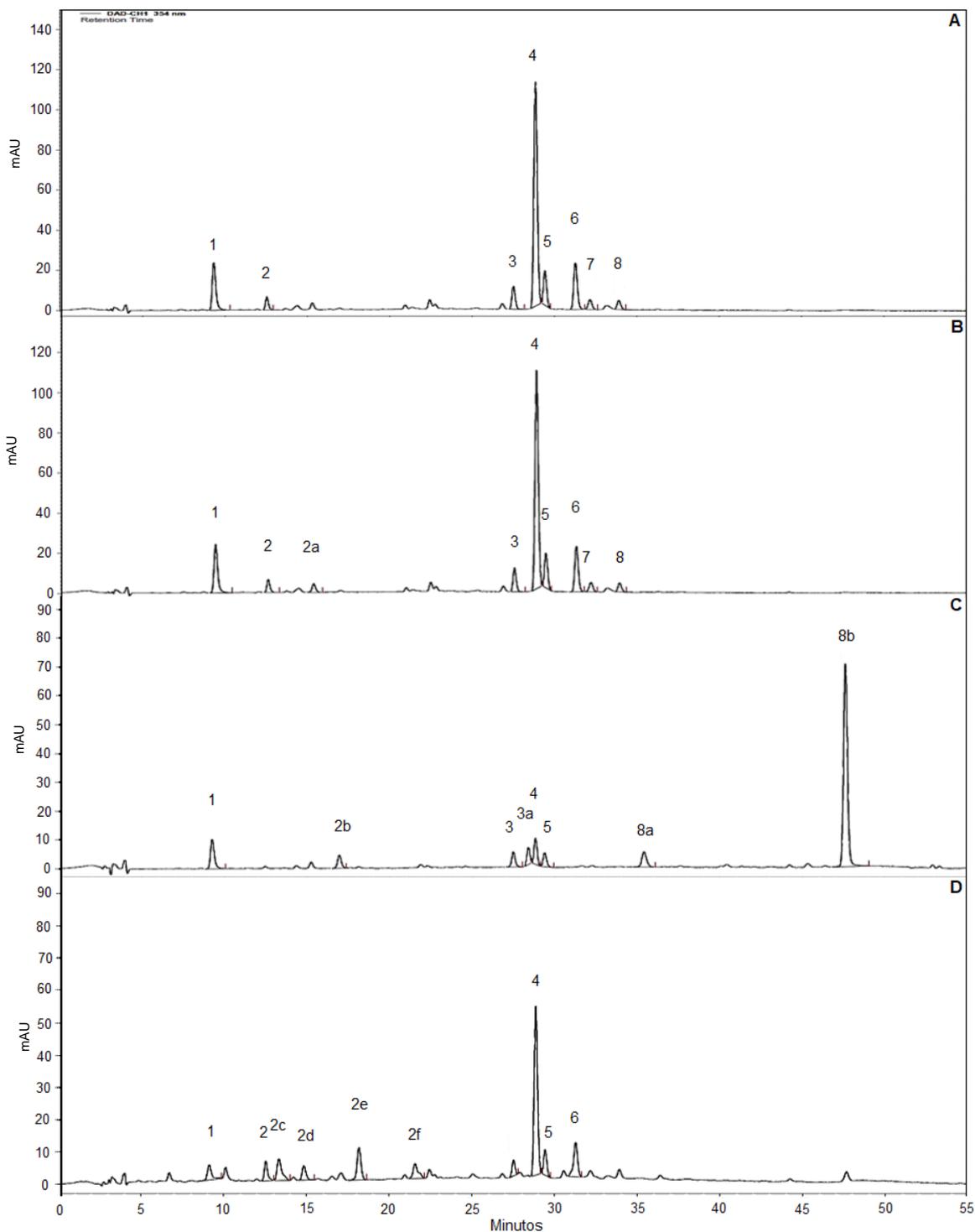


Figura 20 - Análise da seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxylum suberosum* por hidrólise induzida. A: Cromatograma do extrato; B: Cromatograma do extrato com indução de hidrólise. C: Cromatograma do extrato com indução de hidrólise ácida; e D: Cromatograma do extrato com indução de hidrólise básica. As induções de hidrólises foram submetidas por 60 minutos à 60 °C. Condições da análise: Coluna - PurospherStar RP C18e mantida à 25 °C; Fluxo - 0,6 mL/min; Eluente - ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Detector - DAD; Sistema de eluição – gradiente e; Cromatograma em 354 nm.

Tabela 17 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxylum suberosum* não submetido a hidrólise.

Picos	Tempo de retenção	Área (mAU)	
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variação
1 Ácido neoclorogênico	09,28 ± 0,02	1485421 ± 53773	0,01
2	12,48 ± 0,02	343049 ± 6379	0,03
3	27,49 ± 0,01	635994 ± 66,14	0,01
4 Hiperosídeo	28,83 ± 0,00	6344939 ± 34087	0,03
5	29,39 ± 0,00	922440 ± 7972	0,03
6	31,25 ± 0,00	1396034 ± 10117	0,03
7	32,14 ± 0,00	315723 ± 11906	0,03
8	33,88 ± 0,00	275022 ± 2860	0,02

Análise das amostras realizadas em triplicata.

Posterior a hidrólise sob temperatura de 60 °C por 60 minutos submetida ao extrato (Lote 2) de *E. suberosum* foi observada diminuição de 1,00 a 4,07% referente as áreas dos picos. Essa diminuição mostra-se como um indicativo de degradação desses compostos presentes no extrato (Tabela 18). Também foi observada a formação de um pico, nomeado de 2a. Referente aos marcadores definidos, foi observado uma degradação de 3,81% para o ácido neoclorogênico (pureza 1) e 2,61% para o hiperosídeo (pureza 1). Não foi observado coeluição com produtos de degradação resultantes da hidrólise. Esses resultados demonstram a seletividade do método na identificação dos marcadores destacados (Tabela 18) (Figura 20).

Tabela 18 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxylum suberosum* submetido a hidrólise por 60 minutos sob temperatura de 60 °C.

Picos	Tempo de retenção	Área (mAU)		Degradação (%)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Coeficiente de variação	Média ± Desvio padrão
Ácido neoclorogênico	9,31 ± 0,03	1447119 ± 53773	0,04	3,81 ± 1,83
2	12,52 ± 0,03	340637 ± 6379	0,02	1,00 ± 0,99
*2a	15,30 ± 0,02	264072 ± 4432	0,02	x
3	27,51 ± 0,00	639150 ± 10476	0,01	1,26 ± 1,01
Hiperosídeo	28,86 ± 0,01	6289697 ± 34087	0,01	2,61 ± 0,81
5	29,43 ± 0,01	925681 ± 7972	0,01	1,50 ± 1,01
6	31,29 ± 0,01	1381555 ± 10117	0,01	2,12 ± 1,06
7	32,16 ± 0,01	308065 ± 4419	0,01	4,07 ± 1,55
8	33,91 ± 0,01	274921 ± 2860	0,01	1,76 ± 1,23

Análise das amostras realizadas em triplicata. * Pico referente a produto de degradação. X = não foi calculado porcentagem de degradação, uma vez que o pico trata-se de um produto de degradação.

Após a hidrólise ácida sob temperatura de 60 °C por 60 minutos submetida ao extrato (Lote 2) de *E. suberosum* foi observada degradação completa dos picos 2, 6, 7 e 8, enquanto que os demais picos foram parcialmente degradados. Tais degradações resultaram na diminuição de 42,98 a 92,07% das áreas dos picos restantes. Também foram observadas a formação de mais 4 picos como produtos de degradação, sendo esses nomeados de 2b, 3a, 8a e 8b. Referente aos marcadores definidos foi observada uma redução de 47,78% (pureza 0,96) para ácido neoclorogênico e 92,07% (pureza 0,89) para o hiperosídeo. Um dos produtos de degradação resultantes trata-se do pico 8b (TR 47,58 min) que apresentou uma alta intensidade, sendo o seu espectro comparado ao da biblioteca de espectros do Laboratório Controle da Qualidade de Medicamentos, e esse pico mostrou-se tratar-se do composto fenólico quercetina. Não foi observada coeluição com produtos de degradação resultantes da hidrólise. Assim, esses resultados demonstram a seletividade do método na identificação dos marcadores destacados (Tabela 19) (Figura 20).

Tabela 19 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxylum suberosum* submetido a hidrólise ácida por 60 minutos sob temperatura de 60 °C.

Picos	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)		Degradação (%)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variação	Média ± Desvio padrão
1 Ácido neoclorogênico	9,26 ± 0,02	776096 ± 103094	0,13	47,78 ± 5,33
*2b	16,95 ± 0,02	328261 ± 35666	0,11	x
3	27,48 ± 0,02	362711 ± 39460	0,11	42,98 ± 4,82
*3a	28,40 ± 0,02	330682 ± 27379	0,08	x
4 Hiperosídeo	28,82 ± 0,02	501888 ± 22181	0,04	92,07 ± 0,51
5	29,39 ± 0,02	310457 ± 22229	0,07	66,29 ± 2,56
*8a	35,40 ± 0,01	480959 ± 35232	0,07	x
*8b	47,58 ± 0,01	4967819 ± 328134	0,07	x

Análise das amostras realizadas em triplicata. * Pico referente a produto de degradação. X = não foi calculado porcentagem de degradação, uma vez que o pico trata-se de um produto de degradação.

Após a hidrólise básica sob temperatura de 60 °C por 60 minutos submetida ao extrato (Lote 2) de *E. suberosum* foi observada degradação completa dos picos 3, 7 e 8, enquanto que os demais picos foram parcialmente degradados, sendo que tais degradações resultaram na diminuição de 5,51 a 78,75% das áreas dos picos restantes, assim como foram observadas a formação de mais 4 picos como produtos de degradação, sendo esses nomeados de 2c, 2d, 2e e 2f. Referente aos marcadores definidos foi observada uma redução de 78,75% (pureza 0,69) para ácido neoclorogênico e 55,20% (pureza 1) para o hiperosídeo. Também não foi observado coeluição com produtos de degradação resultantes da hidrólise. Esses resultados demonstram a seletividade do método na identificação dos marcadores destacados (Tabela 20) (Figura 20).

Tabela 20 - Seletividade do método para extrato (Lote 2) de *Erythroxylum suberosum* submetido a hidrólise básica por 60 minutos sob temperatura de 60 °C.

Picos do Lote 2	Tempo de retenção	Área (mAU)		Degradação (%)
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Coefficiente de variação	Média ± Desvio Padrão
1 Ac. Neoclorogênico	9,10 ± 0,03	31,3336 ± 35148	0,11	78,75 ± 1,79
2	12,50 ± 0,04	326062 ± 16119	0,05	5,51 ± 3,83
*2c	13,31 ± 0,02	495106 ± 27645	0,06	x
*2d	14,81 ± 0,02	283409 ± 16565	0,06	x
*2e	18,15 ± 0,01	618135 ± 50416	0,08	x
*2f	21,55 ± 0,01	355972 ± 28564	0,08	x
4 Hiperosídeo	28,85 ± 0,01	2842231 ± 120984	0,04	55,20 ± 1,23
5	29,41 ± 0,01	398929 ± 17514	0,04	56,75 ± 1,13
6	31,26 ± 0,00	681545 ± 37284	0,05	51,19 ± 1,49

Análise das amostras realizadas em triplicata. * Pico referente a produto de degradação. x = não foi calculado porcentagem de degradação, uma vez que o pico trata-se de um produto de degradação.

4.1.6.5 Exatidão

Exatidão é o método analítico que avalia a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (87). Assim, foi escolhido o método de adição de padrão para a realização do teste. Assim, teores conhecidos dos padrões foram adicionados à amostra para a obtenção de concentrações teóricas finais baixa (80%), média (100%) e alta (120%) (119).

Foram consideradas como concentrações teóricas finais: 32,67 µg/mL (80%); 40,84 µg/mL (100%); e 49,01 µg/mL (120%) para o marcador ácido neoclorogênico. 37,25 µg/mL (80%), 46,57 µg/mL (100%) e 55,88 µg/mL (120%) para o marcador hiperosídeo.

A exatidão do marcador ácido neoclorogênico para *E. daphnites* não se mostrou aprovada pois o Erro Padrão Relativo (EPR) para as concentrações determinadas para 80, 100 e 120% ficaram acima de 15% (Tabela 21). Isso pode ter sido ocasionado devido provável volatilização do solvente, que pode ter ocasionado uma maior concentração do padrão. Deste modo, o ensaio precisa ser conduzido novamente nas devidas concentrações para que seja feita a avaliação da exatidão do

método. O mesmo problema ocorrido com o padrão ácido neoclorogênico ocorreu para a avaliação da exatidão para o lote de *E. suberosum*.

Tabela 21 - Exatidão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para extrato (Lote 2) de *Erythroxyllum daphnites* para o marcador ácido neoclorogênico.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração determinada (µg/mL) ± DP	Exatidão (%)	Erro Padrão Relativo (%)
32,67 (80%)	27,45 ± 0,23	84,04	-15,96
40,84 (100%)	34,32 ± 0,15	84,04	-15,96
49,01 (120%)	40,41 ± 0,05	82,46	-17,54

DP: Desvio padrão

A exatidão do marcador hiperosídeo para *E. suberosum* nas concentrações baixa, média e alta encontraram-se dentro da variação permitida de ± 15% em relação à concentração teórica final, demonstrando uma boa exatidão do método frente a esse marcador (Tabela 22).

Tabela 22 - Exatidão por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para extrato (Lote 2) de *Erythroxyllum suberosum* para o marcador hiperosídeo.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração determinada (µg/mL) ± DP	Exatidão (%)	Erro Padrão Relativo (%)
37,25 (80%)	36,01 ± 0,15	96,67	- 3,33
46,57 (100%)	44,79 ± 0,26	96,17	- 3,83
55,88 (120%)	55,31 ± 0,71	98,99	-1,01

DP: Desvio padrão

4.1.6.6 Quantificação dos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*

A) *Erythroxyllum daphnites*

Após as análises para a validação do método analítico para lotes de extratos de *E. daphnites*, foi possível identificar e quantificar os marcadores fitoquímicos presentes nos lotes. Em relação aos perfis cromatográficos, foi observado semelhança entre todos os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (354 nm) para todos os lotes. Apresentando presença de ácido neoclorogênico em sua composição, além de outros compostos polifenóis até então não identificados (Figura 21).

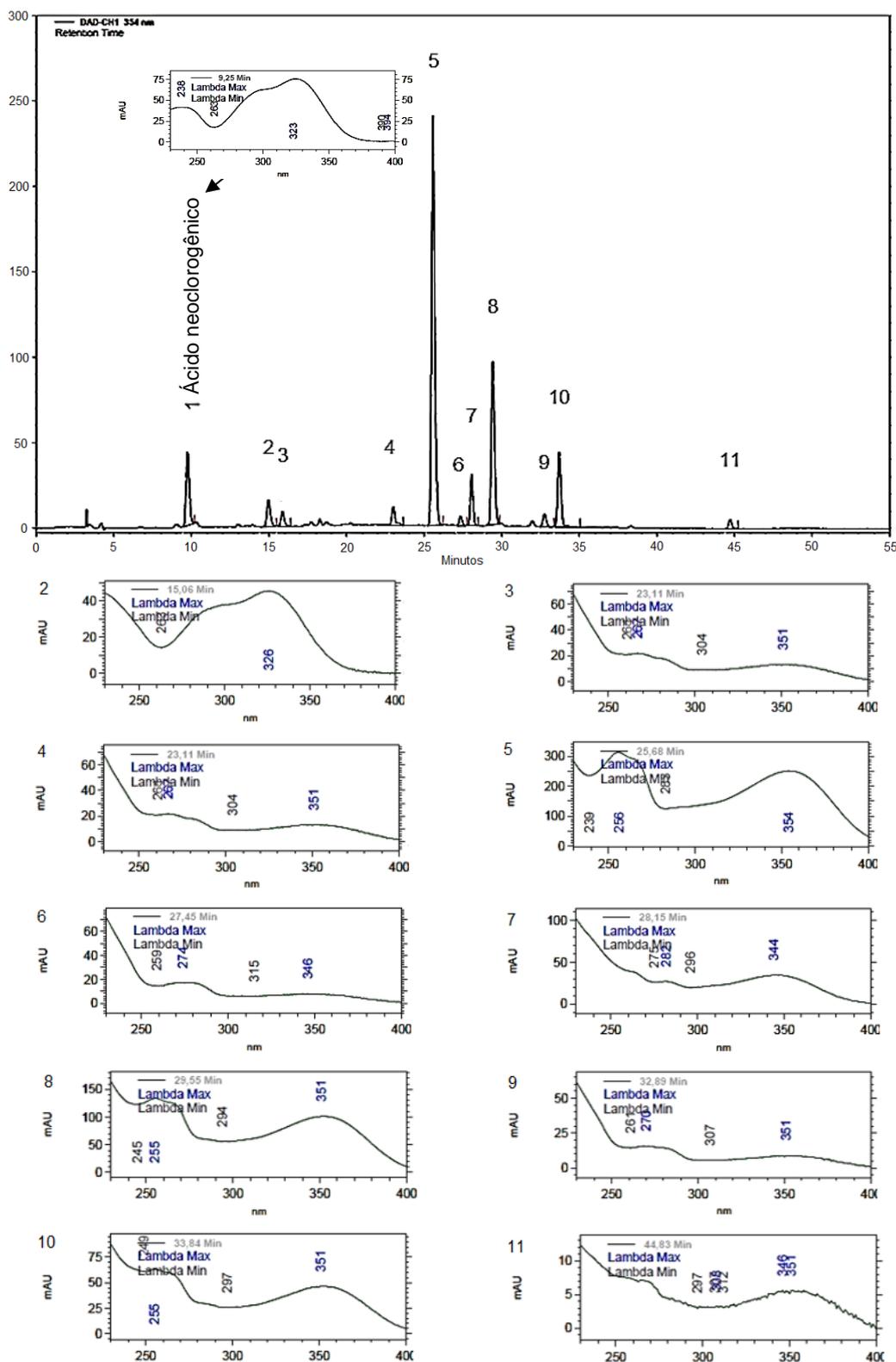


Figura 21 - Perfil cromatográfico e espectros obtidos de extrato de *Erythroxylum daphnites*. Cromatogramas e espectros obtidos por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência. Condições da análise: Coluna - PurospherStar RP C18e mantida à 25 °C; Fluxo - 0,6 mL/min; Eluente - ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Detector - DAD; Sistema de eluição – gradiente e; Cromatograma em 354 nm.

O teor de ácido neoclorogênico nos lotes de extratos de *E. daphnites* apresentaram uma variação de 6,96 a 8,48 µg/mL com média de 8,02 µg/mL, sendo a média do tempo de retenção igual a 9,18 minutos quando analisado os dados por CLAE-DAD (Tabela 23). Deste modo, utilizou-se os resultados para comparação dos teores de hiperosídeo presentes nos lotes de extratos pelo método Kruskal Wallis – Dunn's.

Tabela 23 - Tempo de retenção, área e teor de ácido neoclorogênico nos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites*.

Lotes	Tempo de retenção (minutos)	Área (mAU)		Teor de ácido neoclorogênico (µg/mL)
	Média ± DP	Média ± DP	CV	Média ± DP
Lote 1	9,20 ± 0,06	2184227 ± 101685	0,05	6,96 ± 0,33
Lote 2	9,25 ± 0,01	2567416 ± 10013	0,00	8,20 ± 0,03
Lote 3	9,22 ± 0,02	2652553 ± 52429	0,02	8,48 ± 0,17
Lote 4	9,22 ± 0,00	2615692 ± 18816	0,01	8,36 ± 0,06
Lote 5	9,14 ± 0,03	2515339 ± 11068	0,00	8,03 ± 0,04
Lote 6	9,10 ± 0,02	2542045 ± 19368	0,01	8,12 ± 0,06
Média	9,18 ± 0,02	2512879 ± 35563	x	8,02 ± 0,11
CV	0,00	0,01	x	0,01

Dados obtidos de análise por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – DAD. CV: Coeficiente de variância. DP: Desvio padrão.

Quando aplicado o teste de comparação Kruskal-Wallis, foi detectada diferença significativa entre o teor de ácido neoclorogênico dos lotes 1 e lote 3, enquanto que não foram observadas diferenças entre os demais lotes dos extratos de *E. daphnites* (Figura 22A).

Também foi calculado o quanto os teores de hiperosídeo encontrados para cada lote variaram em relação à média desses teores. O lote 1, que apresentou menor teor de ácido neoclorogênico variou 13,21% em relação à média, e o lote 3, que apresentou maior teor de ácido neoclorogênico apresentou uma variação de 5,98% em relação à média (Figura 22B).

Quando traçado o limite de variação de 15% em relação à média dos teores de ácido neoclorogênico, pôde-se observar que todos os lotes de extratos de *E. daphnites* mantiveram-se dentro da faixa preconizada (Figura 22B). Essa faixa aplica-se para o limite de variação permitido da especificação do teor quando o marcador for

analítico. Sendo permitida uma variação total de 30%, isso com base nos 20% de variação permitida para a liberação do lote mais os 10% de variação permitida para o estudo de estabilidade (42).

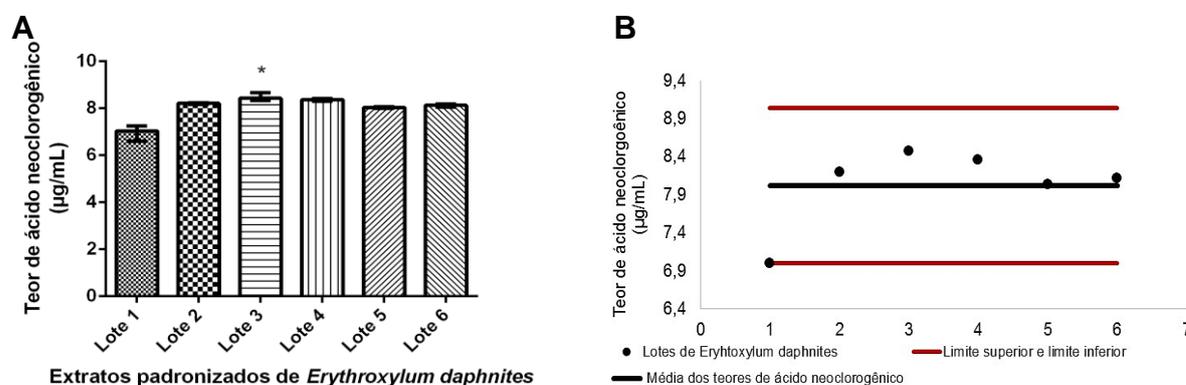


Figura 22 - Teores de ácido neoclorogênico dos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites*. **A:** *Teste Kruskal Wallis – Dunn’s mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os lotes 1 e 3 frente aos teores de hiperosídeo dos extratos de *E. daphnites*. Dados representados pela mediana e amplitude. **B:** Avaliação do limite de variação a partir do teor de ácido neoclorogênico dos lotes relativos aos extratos de *E. daphnites*. Foi determinado $\pm 15\%$ como a variação máxima do teor de ácido neoclorogênico entre os lotes ($n=3$).

Apesar da diferença significativa determinada pelo teste aplicado, quando observada a variação dos teores de ácido neoclorogênico em relação à média obtida desses teores, foi observado que todos os lotes estavam conformes no que refere-se ao limite máximo de variação ($\pm 15\%$). Outro fator importante destacado, foram os mesmos tempos de retenção para os picos contendo ácido neoclorogênico nos lotes acompanhados de mesmos espectros que os caracterizam como ácido neoclorogênico. Tais fatores, em consonância, contribuem para a afirmativa de que os extratos estão padronizados.

É importante salientar que uma nova análise para exatidão precisa ser realizada, para que o método analítico que utiliza o CLAE – DAD seja devidamente validado, pois o objetivo desta validação é garantir que a metodologia analítica seja exata, reproduzível e robusta dentro de uma faixa de aplicação em que o analito foi analisado. Quanto aos demais parâmetros avaliados, todos mostraram-se conformes com o que foi preconizado previamente pelo guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE N.º 899, de 29 de maio de 2003 da Anvisa (87) em consonância com a RDC N. 166/2017 (88), com base nas exigências do Guia de

orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico, Instrução Normativa N.º 4, de 18 de junho de 2014 (42).

B) Erythroxylum suberosum

Após as análises para a validação do método analítico para os extratos de *E. suberosum*, foi possível quantificar os marcadores fitoquímicos presentes nos lotes. Em relação aos perfis cromatográficos, foi observado semelhança entre todos os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (354 nm) para todos os lotes de extratos., apresentando presença de ácido neoclorogênico e hiperosídeo em sua composição, além de outros compostos polifenóis (Figura 23).

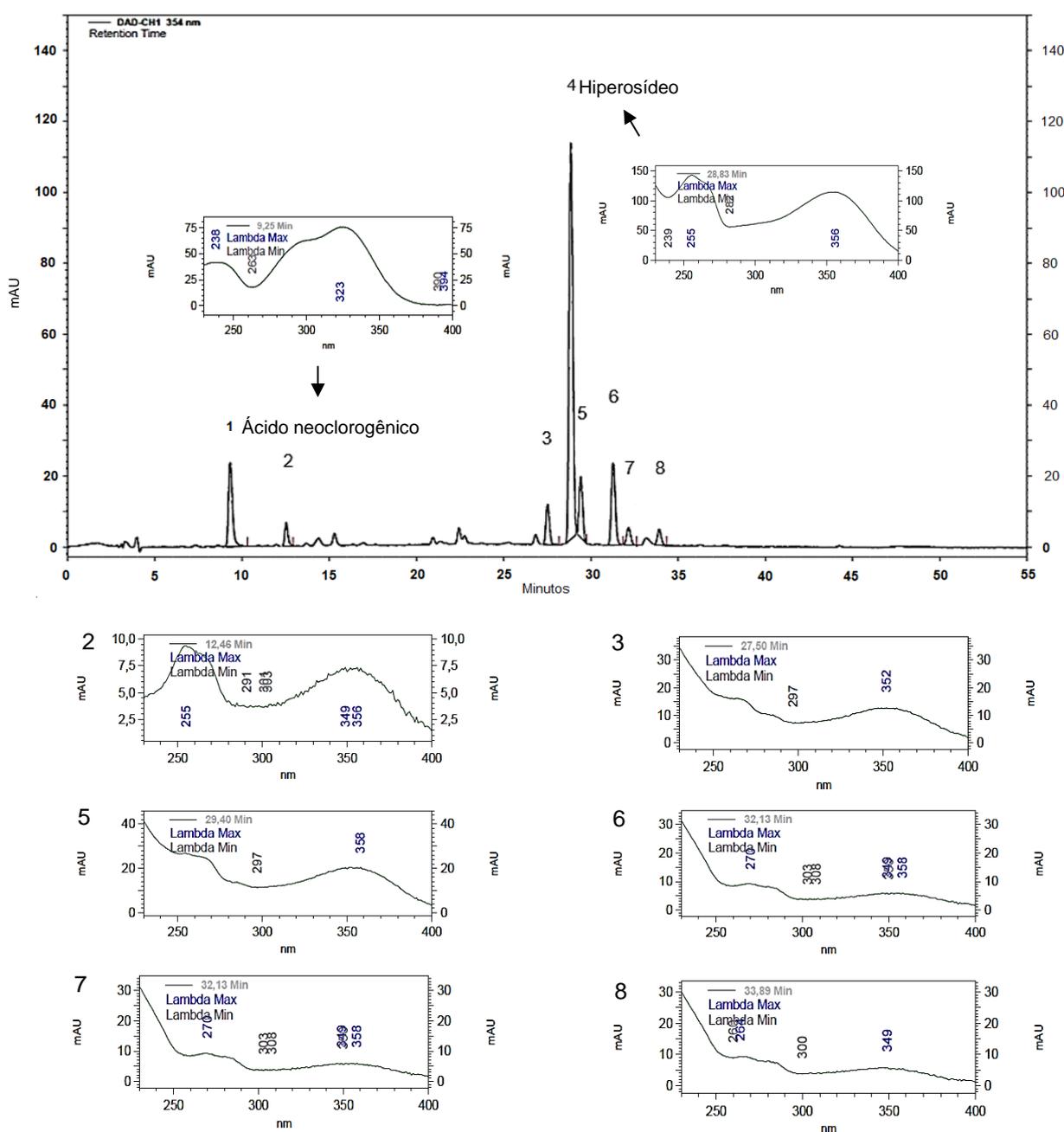


Figura 23 - Perfil cromatográfico e espectros obtidos de extrato de *Erythroxylum suberosum*. Cromatogramas e espectros obtidos por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência. Condições da análise: Coluna - PurospherStar RP C18e mantida à 25 °C; Fluxo - 0,6 mL/min; Eluente - ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Detector - DAD; Sistema de eluição – gradiente e; Cromatograma em 354 nm.

O teor de hiperosídeo nos lotes de extratos de *E. suberosum* apresentou uma variação de 21,93 a 25,63 $\mu\text{g/mL}$ com média de 23,77 $\mu\text{g/mL}$, sendo a média do tempo de retenção igual a 28,41 minutos quando analisados os dados por CLAE-DAD

(Tabela 24). Foram utilizados os resultados para comparação dos teores de hiperosídeo presentes nos lotes de extratos pelo método Kruskal Wallis – Dunn's.

Tabela 24 - Tempo de retenção, área e teor de hiperosídeo nos lotes de extratos de *Erythroxyllum suberosum*.

Lotes	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)		Teor de hiperosídeo (µg/mL)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	CV	Média ± Desvio padrão
1	28,47 ± 0,06	6779457 ± 82114	0,01	25,63 ± 0,31
2	28,37 ± 0,03	6349093 ± 93155	0,01	24,02 ± 0,35
3	28,36 ± 0,01	6596697 ± 384603	0,06	24,95 ± 1,44
4	28,41 ± 0,01	5792718 ± 261618	0,05	21,93 ± 0,98
5	28,43 ± 0,01	6251308 ± 154102	0,02	23,65 ± 0,58
6	28,40 ± 0,01	5887236 ± 249774	0,04	22,28 ± 0,94
7	28,43 ± 0,00	6338959 ± 230387	0,04	23,98 ± 0,87
Média	28,41 ± 0,03	6285067 ± 327404	x	23,77 ± 1,23
CV	0,00	0,052	x	0,052

Dados obtidos de análise por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – DAD. CV: Coeficiente de variância.

Quando aplicado o teste de comparação Kruskal-Wallis, foi detectado diferença significativa entre o hiperosídeo dos lote 1 e lote 4, enquanto que não foram observadas diferenças entre os demais lotes dos extratos de *E. suberosum* (Figura 24 24A).

Também foi calculado o quanto os teores de hiperosídeo encontrados para cada lote variaram em relação à média desses teores. O lote 4, que apresentou menor teor de hiperosídeo variou 7,74% em relação à média, e o lote 1, que apresentou maior teor de hiperosídeo apresentou uma variação de 7,82% em relação à média (Figura 24B).

Quando traçado o limite de variação de 15% em relação à média dos teores de hiperosídeo encontrados, pôde-se observar que todos os lotes de extratos de *E. suberosum* mantiveram-se dentro da faixa preconizada (Figura 24B).

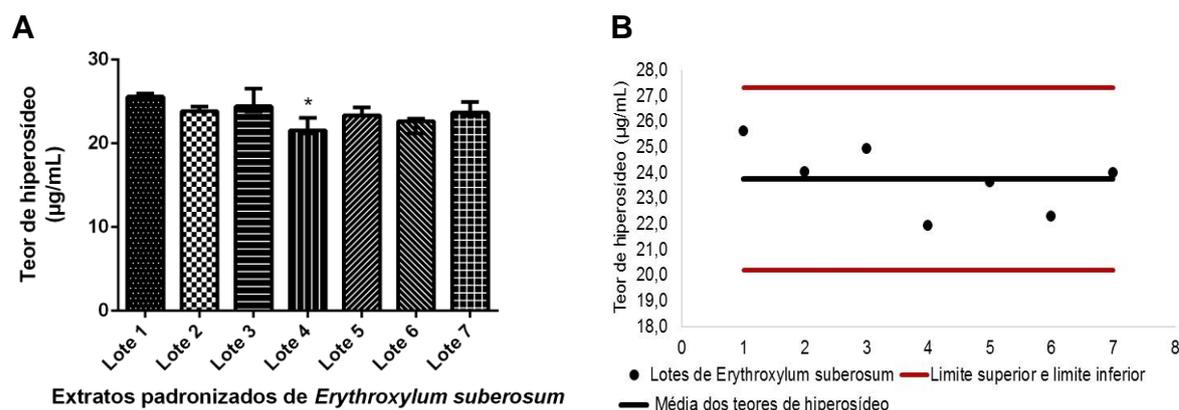


Figura 24 -. Teores de hiperosídeo dos lotes de extratos de *Erythroxyllum suberosum*. **A:** Teste Kruskal Wallis – Dunnes *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os lotes 1 e 4 frente aos teores de hiperosídeo dos extratos de *E. suberosum*. Dados representados por mediana e amplitude. **B:** Avaliação do limite de variação a partir do teor de hiperosídeo dos lotes relativos aos extratos de *E. suberosum*. Foi determinado $\pm 15\%$ como a variação máxima do teor de hiperosídeo entre os lotes ($n=3$).

Essa faixa aplica-se para o limite de variação permitido da especificação do teor quando o marcador for analítico, sendo permitida uma variação total de 30%, isso com base no 20% de variação permitida para a liberação do lote mais os 10% de variação permitida para o estudo de estabilidade (42).

O teor de ácido neoclorogênico nos lotes de extratos de *E. suberosum* apresentaram uma variação de 10,51 a 13,05 µg/mL com média de 11,62 µg/mL, com média do tempo de retenção igual a 9,06 minutos quando analisado os dados por CLAE-DAD (Tabela 25). Utilizou-se os resultados para comparação dos teores de hiperosídeo presentes nos lotes de extratos pelo método Kruskal Wallis – Dunn's.

Tabela 25 - Tempo de retenção, área e teor de ácido neoclorogênico nos lotes de extratos de *Erythroxyllum suberosum*.

Lotes	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)		Teor de ácido neoclorogênico (µg/mL)
	Média	Média ± DP	CV	Média ± DP
Lote 1	9,08 ± 0,05	1377714 ± 15779	0,01	11,47 ± 0,13
Lote 2	9,05 ± 0,01	1428073 ± 21216	0,01	11,88 ± 0,17
Lote 3	9,02 ± 0,03	1572707 ± 84314	0,05	13,05 ± 0,68
Lote 4	9,07 ± 0,02	1431361 ± 115707	0,08	11,91 ± 0,94
Lote 5	9,07 ± 0,01	1316812 ± 44262	0,03	10,98 ± 0,36
Lote 6	9,04 ± 0,04	1259024 ± 49075	0,04	10,51 ± 0,40
Lote 7	9,08 ± 0,03	1385024 ± 27563	0,02	11,53 ± 0,22
Média	9,06 ± 0,03	1395816 ± 51131	x	11,62 ± 0,41
C. Var	0,00	0,660	x	0,660

Dados obtidos de análise por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – DAD. CV: Coeficiente de variância.

Quando aplicado o teste de comparação por Kruskal-Wallis, foi detectado diferença significativa entre o teor de ácido neoclorogênico do lote 1 e lote 3, enquanto que não foram observadas diferenças entre os demais lotes dos extratos de *E. suberosum* (Figura 25A).

Também foi calculado o quanto os teores de ácido neoclorogênico encontrados para cada lote variaram em relação à média desses teores. O lote 6, que apresentou menor teor de hiperosídeo variou 9,55% em relação à média, e o lote 3, que apresentou maior teor de ácido neoclorogênico apresentou uma variação de 12,30% em relação à média (Figura 25B).

Quando traçado limites de variação de 15% em relação à média dos teores de ácido neoclorogênico encontrados, pôde-se observar que todos os lotes de extratos de *E. suberosum* mantiveram-se dentro da faixa preconizada (Figura 25B).

Essa faixa aplica-se para o limite de variação permitido para o teor quando o marcador for analítico. Sendo permitido uma variação total de 30%, isso com base no 20% de variação permitida para a liberação do lote mais os 10% de variação permitida para o estudo de estabilidade (42).

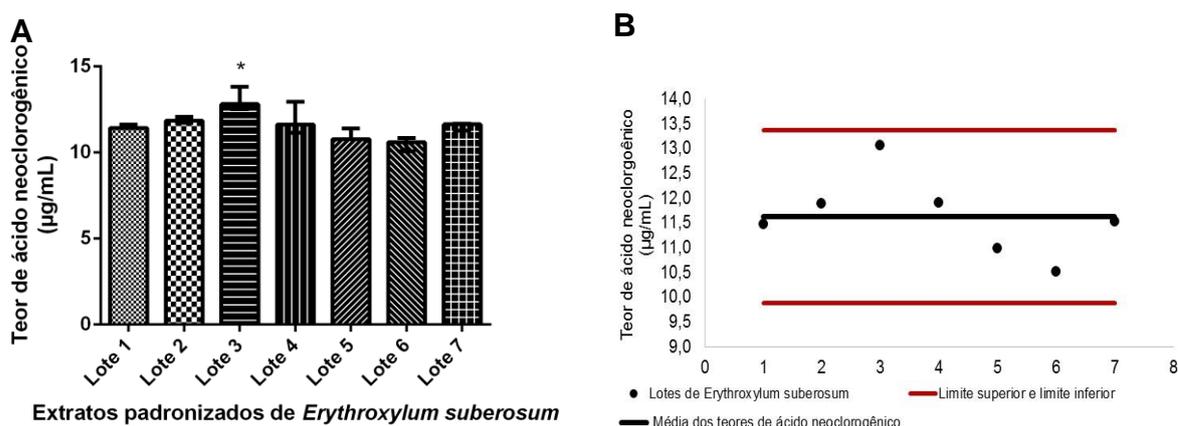


Figura 25 - Teores de ácido neoclorogênico dos lotes de extratos de *Erythroxylum suberosum*. **A**: Teste Kruskal Wallis – Dunnes ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os lotes 1 e 3. Dados representados por mediana e amplitude. **B**: Avaliação do limite de variação a partir do teor de ácido neoclorogênico dos lotes relativos aos extratos de *E. suberosum*. Foi determinado $\pm 15\%$ com a variação máxima do teor de ácido neoclorogênico entre os lotes.

Mesmo com a diferença significativa determinada pelo teste estatístico aplicado, quando observada a variação dos teores de ácido neoclorogênico em relação à média obtida desses teores, foi observado que todos os lotes mostraram-se dentro do limite máximo de variação ($\pm 15\%$). Outro fator importante destacado foram os mesmos tempos de retenção para os picos contendo ácido neoclorogênico presentes nos lotes, acompanhados de mesmos espectros, que os caracterizam como ácido neoclorogênico. Tais fatores contribuem para a afirmação de que os extratos estão padronizados.

Todos os parâmetros avaliados nessa validação (no que refere-se ao marcador hiperosídeo) foram alcançados, mostrando-se conformes com o que foi preconizado previamente pelo guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE N.º 899, de 29 de maio de 2003 da Anvisa (87) em consonância com a RDC N. 166/2017 (88), e com base nas exigências do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico, Instrução Normativa N.º 4, de 18 de junho de 2014 (42).

Em relação ao marcador ácido neoclorogênico é importante destacar que uma nova análise para exatidão precisa ser realizada, para que o método analítico que utiliza o CLAE – DAD seja devidamente validado, pois o objetivo desta validação é garantir que a metodologia analítica seja exata, reproduzível e robusta dentro da faixa de aplicação em que o analito foi analisado.

4.1.7 Avaliação da atividade antioxidante

4.1.7.1 Atividade redutora do radical DPPH[•]

A avaliação da atividade redutora do radical DPPH[•] é uma técnica espectrofotométrica que se baseia na capacidade descolorante da amostra, utilizada para a determinação indireta da atividade antioxidante e determinante para a quantificação do potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados, alimentos ou amostras biológicas relevantes. O radical DPPH[•] possui uma coloração roxa e com a ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R) o DPPH[•] é reduzido, formando o difenil-picril-hidrazina, passando a ser visualizada a coloração amarela (120).

Os lotes de extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum* foram analisados para avaliar a capacidade de redução do radical livre DPPH[•], sendo que quanto maior a redução, maior foi a atividade antioxidante.

Entre os lotes de extratos de *E. daphnites* a variação da atividade antioxidante por redução do DPPH[•] variou de 5,15 a 7,97 µg/mL. Quando aplicado o teste de comparação dos lotes por Kruskal Wallis – Dunn's, não foram observadas diferença significativa entre os lotes. Como controle positivo para a atividade redutora do radical DPPH[•] utilizou-se o padrão ácido ascórbico (vitamina C) que apresentou IC_{50} de 3,05 µg/mL, não mostrando diferença significativa quando comparado com os outros lotes (Figura 26A).

Também foi calculado o quanto o IC_{50} encontrado para cada lote variou em relação à média do IC_{50} dos lotes. O lote 3, que apresentou menor IC_{50} variou 26,41% em relação à média, e o lote 1, que apresentou o maior IC_{50} com variação de 13,85% em relação à média (Figura 26B). Entretanto, não foram observadas diferença significativa entre esses lotes.

Quando traçado o limite de variação de 15% em relação à média do IC_{50} dos extratos, foi observado que apenas o lote 3 não se manteve dentro da faixa preconizada (Figura 26B).

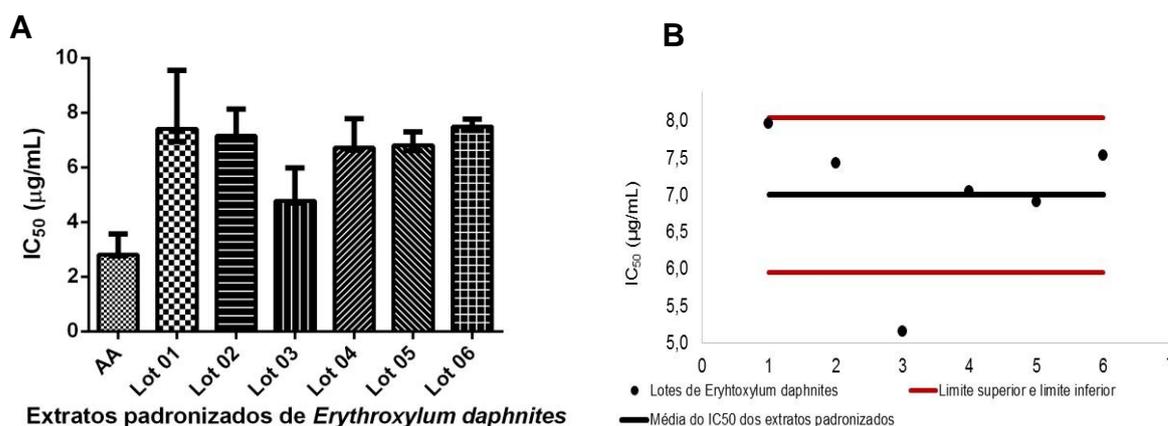


Figura 26 - Atividade antioxidante por redução do radical DPPH' dos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites*. **A:** Teste Kruskal Wallis – Dunn's ($p < 0,05$). AA - Ácido Ascórbico. Dados representados pela mediana e amplitude. **B:** Avaliação do limite de variação da atividade dos lotes relativos aos extratos de *E. daphnites*. Foi determinado $\pm 15\%$ com a variação máxima do IC_{50} entre os lotes ($n=3$). IC_{50} : inhibition concentration 50%.

Quando traçado o limite de variação de 15% em relação à média do IC_{50} dos extratos, foi observado que apenas o lote 3 não se manteve dentro da faixa preconizada (Figura 26B).

Com bases nesses resultados foi possível determinar a concentração capaz de inibir 50% da atividade máxima do radical DPPH' pelos lotes de *E. daphnites*. Quanto a essa atividade biológica, quando aplicado o teste estatístico foi observado que os lotes apresentaram atividades semelhantes, sendo essa característica um fator importante para a determinação da padronização dos extratos em relação a atividade antioxidante.

Entre os lotes de *E. suberosum* a variação do IC_{50} foi de 5,46 a 6,31 $\mu\text{g/mL}$. Quando aplicado o teste de comparação dos lotes por Kruskal Wallis – Dunn's, não foi detectada diferença significativa entre os lotes. Como controle positivo para a atividade redutora do radical DPPH' utilizou-se o padrão ácido ascórbico (vitamina C) que apresentou IC_{50} de 3,05 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando diferença significativa quando comparado com os lotes (Figura 27A).

Também foi calculado o quanto o IC_{50} encontrado para cada lote variou em relação à média. O lote 1, que apresentou menor IC_{50} variou 8,69% em relação à média, e o lote 4, que apresentou o maior IC_{50} com variação de 5,51% em relação à média (Figura 27B).

Quando traçados limites de variação de 15% em relação à média do IC_{50} dos extratos, foi observado que nenhum dos lotes variou dentro da faixa preconizada (Figura 27B).

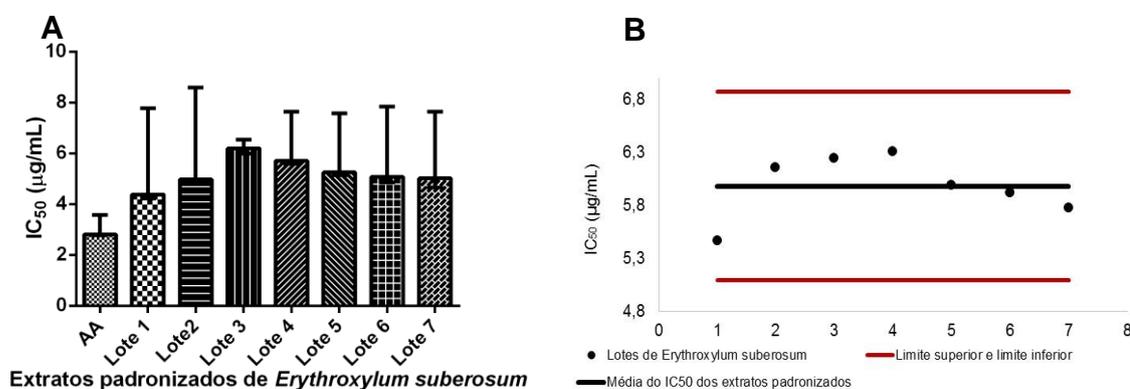


Figura 27 - Atividade antioxidante por redução do radical DPPH[•] dos lotes de extratos de *Erythroxyllum suberosum*. **A**: Teste Kruskal Wallis – Dunn's ($p < 0,05$). Ácido Áscórbico (AA). Dados representados por mediana e amplitude. **B**: Avaliação do limite de variação da atividade dos lotes relativos aos extratos de *E. suberosum*. Foi determinado $\pm 15\%$ como variação máxima do IC_{50} entre os lotes ($n=3$). IC_{50} : Inhibition Concentration 50%.

Ao realizar a média dos valores encontrados para lotes de extrato de *E. daphnites* foi encontrado um IC_{50} de 7,51 $\mu\text{g/mL}$, e quando realizado o mesmo procedimento para os lotes de *E. suberosum* foi encontrado o IC_{50} de 5,97 $\mu\text{g/mL}$. Assim, quando comparados os resultados obtidos para essas duas espécies com extratos vegetais de outros estudos, os lotes obtidos de *Erythroxyllum* mostraram ter um IC_{50} menor: *Mentha piperita* (IC_{50} : 13,32 $\mu\text{g/mL}$), *Matricaria chamomilla* (IC_{50} : 78,22 $\mu\text{g/mL}$), *Mentha spicata* (IC_{50} : 87,89 $\mu\text{g/mL}$), *Aesculus hippocastanum* (IC_{50} : 165,00 $\mu\text{g/mL}$), *Orthosiphon grandiflorus* (IC_{50} : 217,20 $\mu\text{g/mL}$) and *Houttuynia cordata* (IC_{50} : 341,50 $\mu\text{g/mL}$) (121-123).

Os resultados obtidos para determinar a concentração capaz de inibir 50% da atividade máxima do radical DPPH[•] pelos lotes de *E. suberosum* foram determinados, e quando aplicado o teste estatístico foi observado que os lotes apresentaram atividades semelhantes, sendo essa característica um fator importante para a determinação da padronização dos extratos em relação a atividade antioxidante. Também foi observado que ao analisar a variação dessa atividade em relação à

média, tais dados mostraram-se dentro da faixa preconizada de variação máxima ($\pm 15\%$).

Foi possível observar que o IC_{50} desses extratos foi semelhante ao do ácido ascórbico (Vitamina C). Esses extratos mostraram-se como potentes produtos antioxidantes assim como a vitamina C, que possui ação contra radicais livres e importante ação fisiológica. O ácido ascórbico, por sua vez, é considerado um dos mais importantes antioxidantes naturais devido ao seu alto poder antioxidante e por causa da sua baixa citotoxicidade (124).

Frente ao cenário apresentado sobre os protetores solares nos capítulos introdutórios do presente estudo, foi possível observar que os extratos padronizados de *E. daphnites* e *E. suberosum*, mostram-se como produtos interessantes a serem utilizados na fabricação de cosméticos com finalidade fotoprotetora, uma vez que, parte desses produtos são caracterizados como fotossintéticos, contribuindo assim para a formação de EROs e/ou compostos derivados tóxicos que podem inclusive perder suas propriedades de filtros UV. Assim, ter esses extratos como componentes de protetores solares seria interessante devido ao seu potencial antioxidante.

4.1.7.2 Atividade de inibição da formação do complexo Fosfomolibidênio

O método baseia-se na redução do molibdênio (VI) para (V), adquirindo assim uma coloração esverdeada, sendo a sua absorvância mensurada por espectrofotômetro (91).

A atividade antioxidante foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico (AA). Com base nos dados obtidos com padrão de ácido ascorbico. A partir das absorvâncias foi possível calcular a regressão linear da curva analítica de ácido ascórbico obtendo-se a equação da reta ($y = 0,052x - 0,0304$, $r = 0,9996$). Assim, foi determinado o equivalente de ácido ascórbico para os lotes de extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum*.

Entre os lotes de *E. daphnites* a variação do equivalente de AA foi de 4,87 a 5,49 $\mu\text{g/mL}$. Quando aplicado o teste de comparação dos lotes por Kruskal Wallis – Dunn's, não foram detectadas diferenças entre os lotes (Figura 28A).

Quando traçado limites de variação de 15% em relação à média da atividade antioxidante por redução da formação de complexo fosfomolibdênio, todos os lotes mantiveram-se dentro da faixa preconizada (Figura 28B).

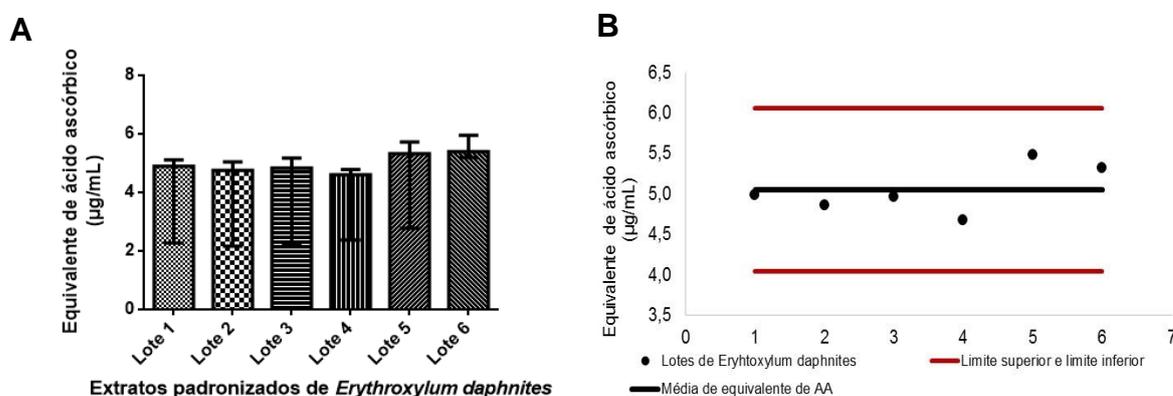


Figura 28 - Atividade antioxidante por inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos lotes de extratos de *Erythroxyllum daphnites*. **A:** *Teste Kruskal Wallis – Dunn’s ($p < 0,05$). Dados representados pela mediana e amplitude. **B:** Avaliação do limite de variação da atividade dos lotes relativos aos extratos de *E. suberosum*. Foi determinado $\pm 20\%$ com a variação máxima entre os equivalentes de ácido ascórbico encontrados para os lotes ($n=3$). AA: ácido ascórbico.

Ao aplicar o teste estatístico foi observado que os lotes de *E. daphnites* apresentaram atividades semelhantes, sendo essa característica um fator importante para a determinação da padronização dos extratos em relação a atividade antioxidante. Também foi observado que ao analisar a variação dessa atividade em relação à média, tais dados mostraram-se dentro da faixa preconizada de variação máxima ($\pm 15\%$).

Entre os lotes de *E. suberosum* a variação do equivalente de AA foi de 4,02 a 6,17 $\mu\text{g/mL}$. Quando aplicado o teste de comparação dos lotes por Kruskal Wallis – Dunn’s, foi detectada diferença significativa entre os lotes 2 e 5. Sendo que o lote 2, que apresentou menor atividade antioxidante variou 19,60% em relação à média, e o lote 5, que apresentou maior atividade antioxidante teve uma variação de 23,40% em relação à média (Figura 26A).

Quando traçado o limite de variação de 15% em relação à média da atividade antioxidante por redução do fosfomolibdênio, foi observado que os lotes 2 e 5 não se mantiveram dentro da faixa preconizada (Figura 25B).

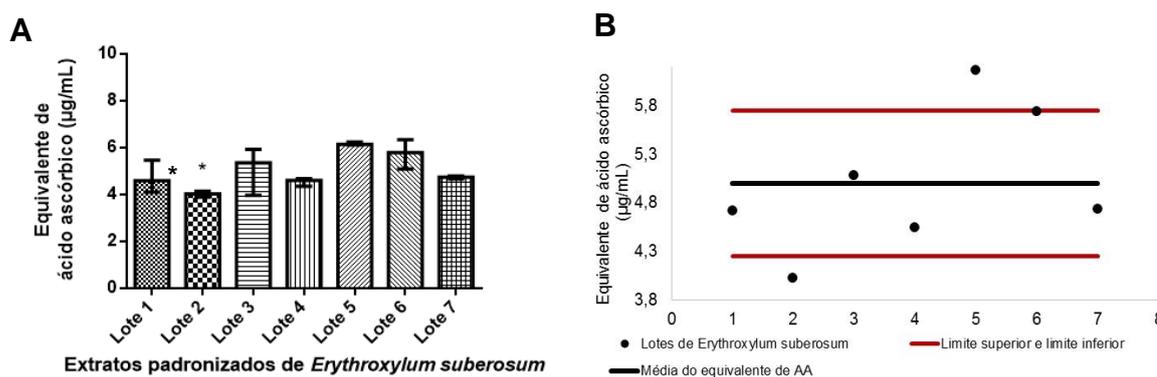


Figura 29 - Atividade antioxidante por inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos lotes de extratos de *Erythroxyllum suberosum*. **A**: *Teste Kruskal Wallis – Dunn’s mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre a atividade antioxidante dos lotes 2 e 3 dos extratos de *E. suberosum*. Dados representados pela mediana e amplitude. **B**: Avaliação do limite de variação da atividade dos lotes relativos aos extratos de *E. suberosum*. Foi determinado $\pm 15\%$ com a variação máxima entre os equivalentes de ácido ascórbico encontrados para os lotes ($n=3$). AA: ácido ascórbico.

Assim a avaliação da atividade antioxidante pelos métodos de redução do radical DPPH^{*} e por inibição da formação do complexo fosfomolibdênio, mostraram-se relevantes, pois demonstram que os lotes de *E. daphnites* e *E. suberosum* apresentam potencial para a prevenção de ataque de radicais livres e doenças degenerativas. Quanto ao uso dessas atividades como critérios de avaliação da padronização do extrato, precisa-se levar em consideração a faixa de variação da atividade do método de determinação.

Quando realizada busca frente a artigos científicos com o uso dos idiomas, português, inglês e espanhol, utilizando as bases Google acadêmico, PubMed e Scopus frente a utilização do método de atividade antioxidante por inibição da formação do complexo fosfomolibdênio, não foram encontrados artigos científicos publicados para a família Erythroxyllaceae e espécies *Erythroxyllum*. Entretanto, é importante destacar que até então o único trabalho publicado com apresentação desta atividade foi a dissertação referente ao estudo de sazonalidade aplicado para a espécie vegetal *E. suberosum*, além de ter sido o trabalho norteador para os estudos que foram conduzidos no presente estudo (32).

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO IN VITRO

4.2.1 Inibição de tirosinase

O método consiste na oxidação da L-Dopa pela tirosinase produzindo dopaquinona, que passa por uma rápida oxidação, resultando na coloração alaranjada posterior à reação (125).

As porcentagens de inibição da enzima tirosinase foram de 58,92, 64,06 e 98,73% para os extratos de *E. daphnites*, *E. suberosum* e ácido kójico respectivamente, quando utilizadas as concentrações máximas de 1000 µg/mL para os extratos e controle positivo. Não foi possível calcular o IC_{50} para os extratos, pois com a utilização dos pontos de concentração usados para a criação da curva de dose-resposta não foi possível alcançar platô máximo, próximo de 100%, com utilização de concentração máxima de 1000 µg/mL para os extratos. O ácido kójico apresentou IC_{50} de 4,26 µg/mL (Tabela 26).

Quando aplicado o teste de comparação dos lotes por ANOVA – Tukey, foi detectada diferença significativa entre os lotes de *E. daphnites*, *E. suberosum* e o ácido kójico (Figura 30).

Tabela 26 - Percentual de inibição da enzima tirosinase pelos extratos aquosos de *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum*.

Amostras	Inibição (%)	IC_{50} (µg/mL)
	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão
<i>Erythroxyllum daphnites</i>	58,92 ± 1,98	x
<i>Erythroxyllum suberosum</i>	64,06 ± 0,83	x
Ácido kójico	98,85 ± 0,54	4,26 ± 0,69

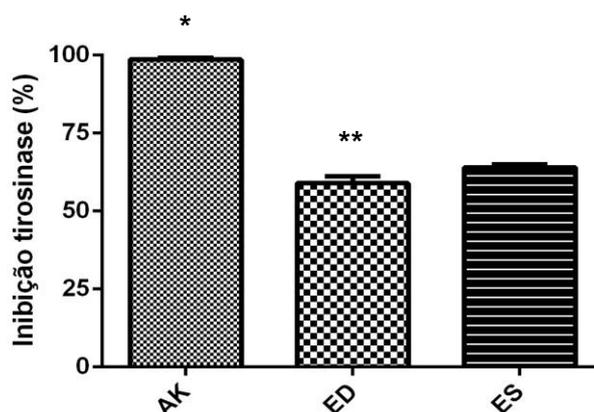


Figura 30 - Atividade de inibição da tirosinase pelos extratos padronizados de *Erythroxyllum daphnites* (ED) e *Erythroxyllum suberosum* (ES) e do controle positivo ácido kójico (AK). ANOVA – Tukey mostrou diferença significativa ($p < 0,05$), dados foram representados por média e desvio padrão. * AK diferente de ED e ES. ** ED diferente de ES. Foram utilizadas quatro replicadas para cada amostra.

Os lotes de *Erythroxyllum* avaliados mostraram atividade inibitória da enzima tirosinase, porém mais testes devem ser realizados com o objetivo de traçar a inibição máxima de 50% da atividade máxima para estes lotes.

Buscou-se a avaliação da atividade de inibição da enzima tirosinase, pois sabe-se que a tirosina trata-se de um aminoácido que atua no processo biossintético da melanina. A tirosinase atua sobre a tirosina formando um complexo enzimático cúprico-proteico sintetizado nos ribossomos e transferido para o aparelho de Golgi, sendo aglomerado em unidades envoltas por melanossomas (126).

Sabe-se também que a exposição aos raios UV pode resultar no aparecimento de manchas hiperpigmentadas, por causa do aumento de melanina. Deste modo, esse processo de inibição da biossíntese da tirosinase em um produto, torna-se uma importante característica como um agente clareador (127), pois a tirosinase trata-se de uma enzima multifuncional, que catalisa as primeiras etapas da melanogênese, podendo assim prevenir a hiperpigmentação da pele (128).

As enzimas polifenol oxidases, também conhecidas como catecol oxidases, tirosinases ou catecolases, são responsáveis por catalisar a oxidação de compostos fenólicos (129). Sabe-se que processos oxidativos estão envolvidos com a produção de EROs. Assim, possuir um extrato vegetal com atividade inibidora da enzima tirosinase, pode não só contribuir para ação de clareamento da pele, como também pode contribuir para menores produções de EROs, mostrando potencial para a

prevenção de ataques de radicais livres e doenças degenerativas envolvidas com radiação UV provenientes de raios solares.

4.2.2 Citotoxicidade celular

4.2.2.1 Avaliação da influência dos extratos frente ao reagente MTT

Peng *et. al.* (2015) relatam que flavonoides possuem a capacidade de reduzirem o MTT, sendo que este acontecimento independe da presença de células viáveis na amostra (130). Assim, para investigar o efeito citotóxico dos extratos de *E. daphnites* e *E. suberosum* na viabilidade celular da linhagem 3T3-L1, foi realizado previamente ensaio para analisar possível interferência dos lotes de extratos padronizados e MTT.

Utilizou-se onze pontos de concentrações que variaram de 20 a 1000 µg/mL para cada um dos extratos. Desde modo foi observado uma sutil interferência entre os extratos aquosos de *E. daphnites* (Figura 31), e *E. suberosum* (Figura 32) com o MTT. Foi observado que quanto mais eleva-se as concentrações do extrato maior tornam-se as absorbâncias, porém não foram observadas em microscópio formação de cristais, aspecto bem característico do teste. Assim, optou-se por manter as análises, realizando desconto do branco dos extratos em relação aos poços onde ocorrem as reações do extrato, células e MTT.

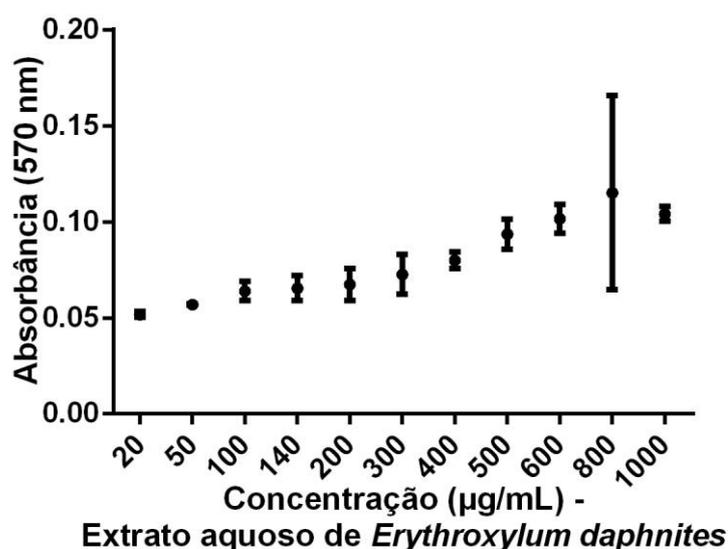


Figura 31 - Efeito das concentrações obtidas a partir do extrato padronizado de *Erythroxyllum daphnites* submetidos ao tetrazólico brometo azul de tetrazólio (MTT) à 37° C por 4 horas. As absorbâncias foram analisadas a 570 nm. Os resultados foram expressos como média das absorbâncias \pm desvio padrão, com uso de quatro replicatas.

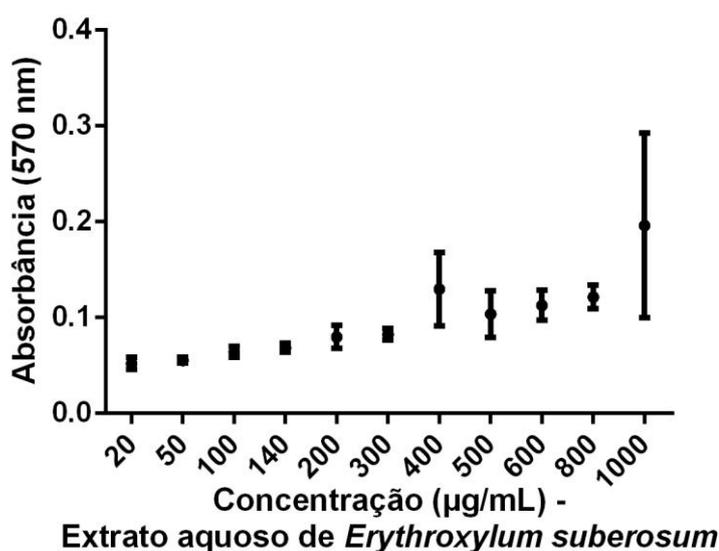


Figura 32 - Efeito das concentrações obtidas a partir do extrato padronizado de *Erythroxyllum suberosum* submetidos ao tetrazólico brometo azul de tetrazólio (MTT) à 37° C por 4 horas. As absorbâncias foram analisadas a 570 nm. Os resultados foram expressos como média das absorbâncias \pm desvio padrão, com uso de quatro replicatas.

4.2.2.2 Curva de densidade celular da linhagem 3T3-L1

Para determinar a quantidade de células da linhagem 3T3-L1 a ser utilizada no ensaio de viabilidade celular com MTT, conduziu-se o ensaio com diferentes densidades celulares ($3 \cdot 10^4$ a 10^5). Foi observado um efeito dose resposta dentro desta faixa de densidade celular testada como pode ser observado na Figura 33, sendo a densidade, $3 \cdot 10^4$ células por poço escolhida para condução dos ensaios de viabilidade celular.

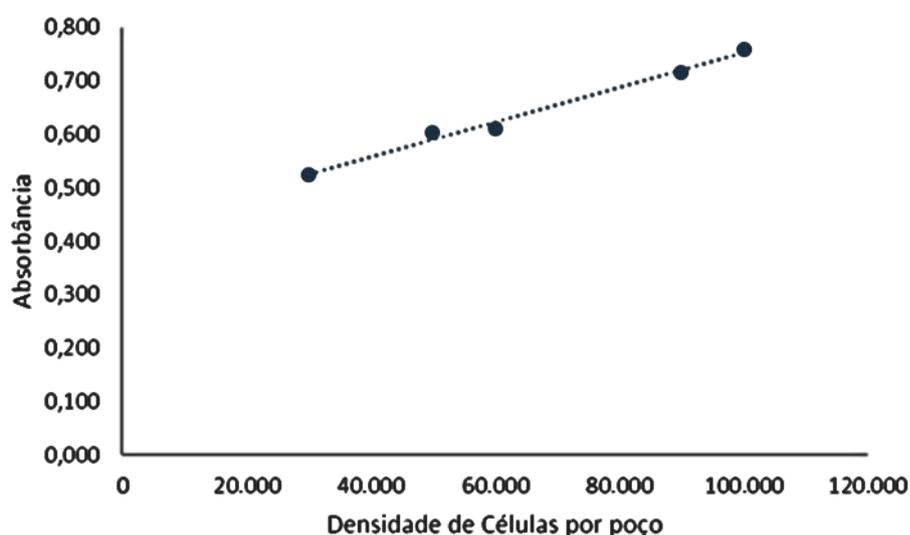


Figura 33 - Curva de densidade celular para linhagem 3T3-L1 em placa de 48 poços para determinação do ensaio de viabilidade celular com MTT.

4.2.2.3 Determinação da porcentagem de viabilidade celular

O percentual de células viáveis foi aferido pelo teste colorimétrico de citotoxicidade que consiste na conversão do sal tetrazólico brometo azul de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan quando em contato com a linhagem celular 3T3-L1.

Não foi possível traçar o perfil de IC_{50} para os extratos padronizados de *E. daphnites* e *E. suberosum*, pois quando utilizados as concentrações de 20 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ não foram observadas mortes celulares significativas. A viabilidade celular

observada para o extrato de *E. daphnites* variou de 86,11 a 106,51%, sendo que para o extrato de *E. suberosum* a variação foi de 87,58 a 123,04%.

Quando aplicado o teste de comparação com o controle (refere-se aos poços contendo as células com meio *DMEM*, porém sem os tratamentos contendo os extratos padronizados) não foi observada diferença significativa com a utilização do método de Kruskal Wallis – Dunn's. Assim, as porcentagens de viabilidade celular para as concentrações que variaram de 20 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ do lote de *E. daphnites* apresentaram suas porcentagens de viabilidade semelhantes (Figura 34). Quanto ao extrato de *E. suberosum* também não foi observada diferença significativa entre as porcentagens de viabilidade celular para as concentrações de 20 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35).

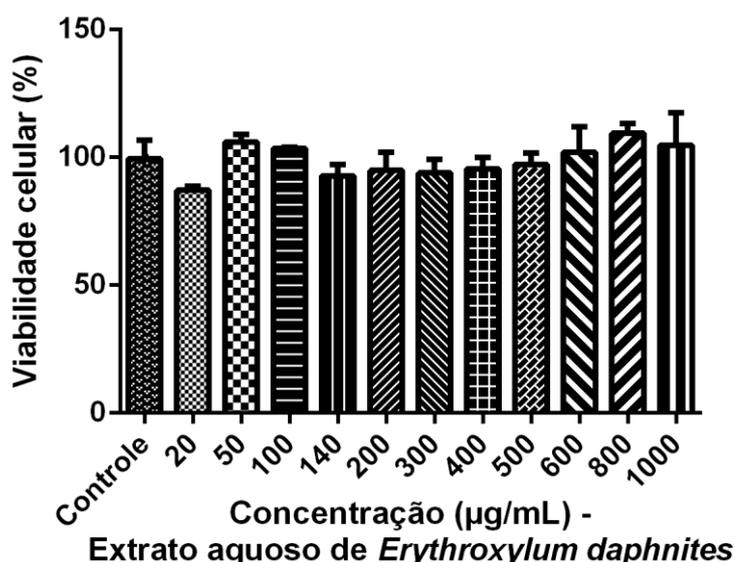


Figura 34 - Viabilidade celular da linhagem *3T3-L1* versus lote de extrato padronizado de *Erythroxyllum daphnites* por MTT - tetrazólio brometo azul de tetrazólio. Densidade de 3×10^4 células/poço com incubação pelo período de 4 horas, à 37 C e CO_2 (5%). Considerou-se as células que não foram expostas aos extratos como sendo controles com 100% de viabilidade. Kruskal Wallis – Dunn's, ($p < 0,05$). Dados representados pela mediana e amplitude de quatro replicatas de amostras com três replicatas do ensaio.

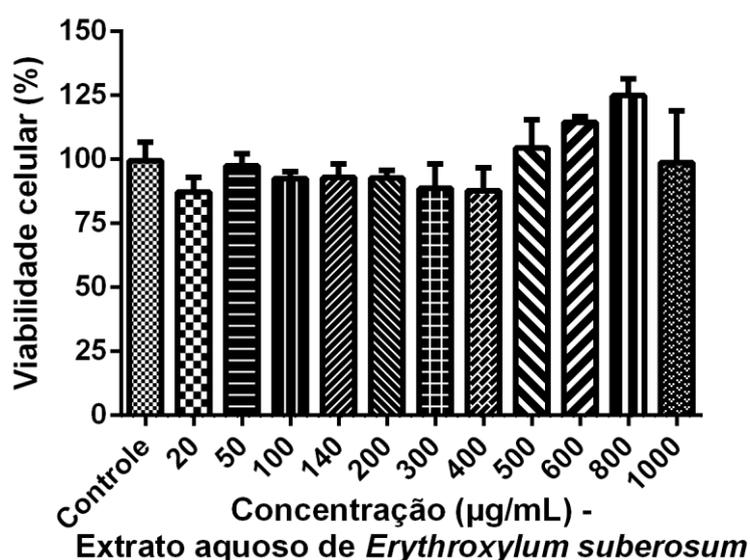


Figura 35 - Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 versus lote de extrato padronizado de *Erythroxyllum suberosum* por MTT - tetrazólio brometo azul de tetrazólio. Densidade de 3×10^4 células/poço com incubação pelo período de 4 horas, à 37 C e CO₂ (5%). Considerou-se as células que não foram expostas aos extratos como sendo controles com 100% de viabilidade. Kruskal Wallis – Dunn's, ($p < 0,05$). Dados representados pela mediana e amplitude inter-quartis de quatro replicatas de amostras com três replicatas do ensaio.

Observou-se que os lotes de extratos padronizados das espécies de *Erythroxyllum* avaliados não apresentaram atividade citotóxica frente a essa linhagem celular quando utilizado a técnica por MTT, sendo esse ponto um fator importante, pois um dos principais objetivos desse estudo consistiu na avaliação do potencial para a obtenção de um fitoterápico com propriedades fotoquimioprotetoras, esperando-se o menor ou nenhum dano a pele.

4.2.2.4 Caracterização da fonte ultravioleta

A fonte ultravioleta foi avaliada em relação a emissão de radiação UVA, UVB e UVC (UV/s/m²) por tempo de exposição, além de verificar o quanto a temperatura poderia aumentar durante a exposição.

Inicialmente trabalhou-se com o tempo de exposição UV dentro da faixa de 0 a 60 minutos, porém foi observado que com 6 minutos de irradiação a temperatura

interna do equipamento passou a ficar acima de 37 °C, podendo chegar até 48 °C, em 60 minutos. Sabendo-se que a temperatura na qual a linhagem celular fica armazenada em incubadora de CO₂ é de 37 °C, optou-se por trabalhar com uma curva que fosse até 37 °C, que corresponde a aproximadamente 6 minutos (36). Além disso, altas temperaturas (> 37 °C) poderiam desencadear reações nas células não relacionadas a exposição a UV e sim devido ao aumento de temperatura.

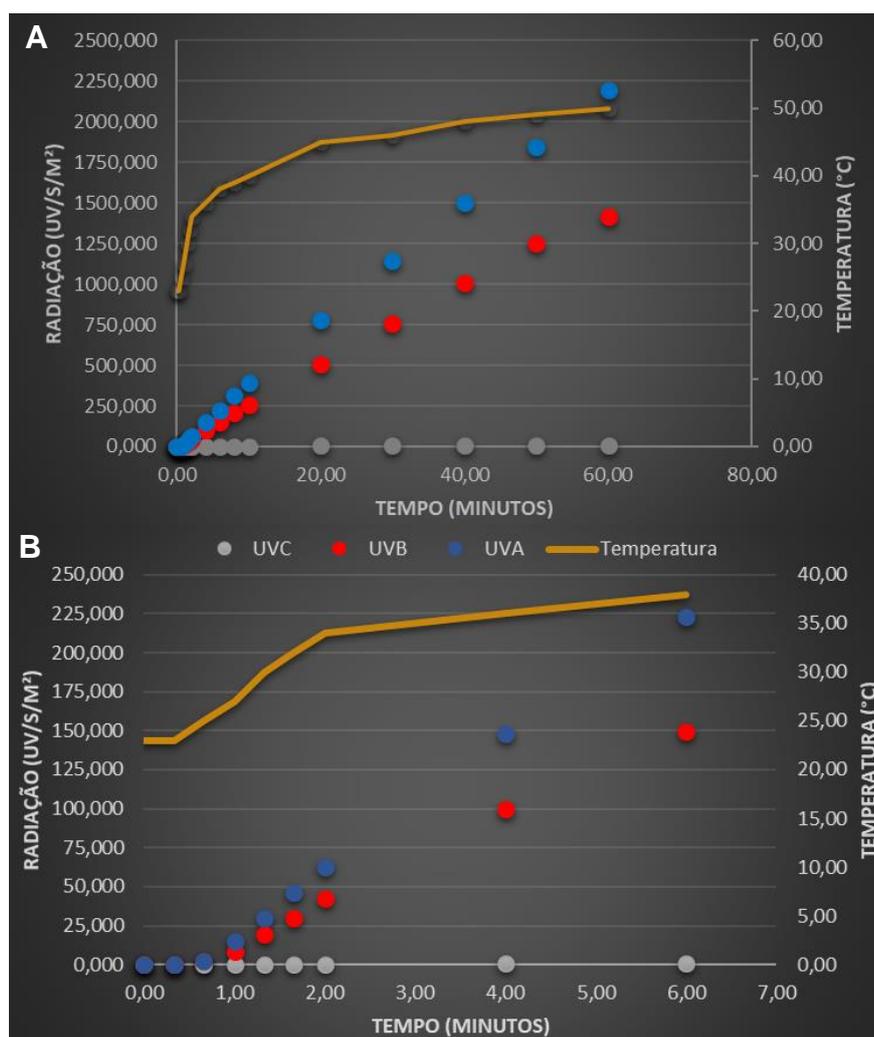


Figura 36 - Caracterização da fonte ultravioleta com a avaliação das variáveis radiação (UVA, UVB e UVC), temperatura (°C) e tempo de irradiação (minutos). A: Tempo de irradiação de 0 a 60 minutos. B: Tempo de irradiação de 0 a 7 minutos.

Em relação a variação de radiação detectada, a faixa variou de 0 a 222,85 J/s/m² para UVA – 365 nm, 0 a 149,31 J/s/m² para UVB – 312 nm e 0 a 0,0092 J/s/m² para UVC – 254 nm no tempo de zero a seis minutos (Figura 36).

4.2.2.5 Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 frente a radiação UV

Foi observado que quando a linhagem celular foi irradiada, após 4 minutos de exposição ($\sim 150 \text{ J/s/m}^2$ - UVA, $\sim 100 \text{ J/s/m}^2$ - UVB e $\sim 0,5 \text{ J/s/m}^2$ - UVC) houve redução de aproximadamente 25% da viabilidade celular. Essa média de redução foi mantida com demais tempos de exposição. Com o aumento do tempo de exposição a porcentagem de morte celular não foi alterada, mantendo a porcentagem de aproximadamente 25% (Figura 37).

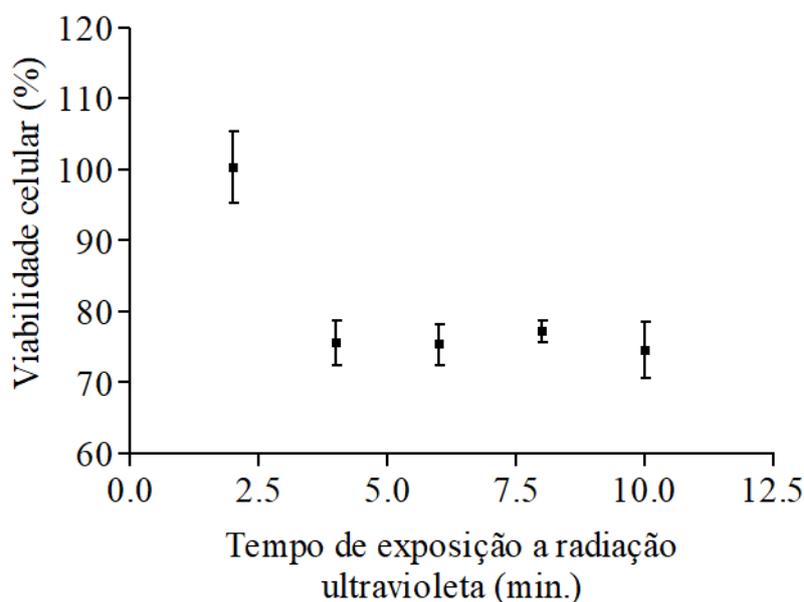


Figura 37 - Viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 versus tempo de irradiação. Dados expressos com média e desvio padrão (n=4)

4.2.2.6 Determinação de depletados de glutathiona reduzida

A glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina - GSH) é importante na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células frente ao estresse oxidativo. Diversas reações com GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), que são altamente polarizáveis, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. É justamente esta habilidade de doar elétrons a outros compostos que faz da glutathiona um bom redutor. A regulação do estresse

oxidativo neste caso, se fundamenta na atividade de sistemas contra espécies oxigenadas reativas (131).

Devido a exposição à radiação UV, parte da glutathiona reduzida é consumida por causa do estresse oxidativo (132).

Assim, a atividade contra o estresse oxidativo causado pela radiação UVA e UVB foi expressa como teor de glutathiona reduzida, a qual deixou de ser oxidada em função de uma possível proteção dos extratos.

A partir dos dados obtidos com o padrão GSH foi determinada a equação da reta ($y=1056,2x - 553,9$ com $r=0,9986$) e por meio desta equação foi possível calcular o teor de GSH nas amostras teste.

No ensaio de determinação de glutathiona reduzida foi observado que após 6 minutos de irradiação das células houve redução do conteúdo de GSH em comparação ao grupo de células não expostas a irradiação. O controle contendo a linhagem celular irradiada sem tratamento apresentou 1,05 μM de GSH, enquanto que o controle da linhagem celular não irradiada apresentou 1,15 μM de GSH (Figura 38). Mesmo sendo sutil, foi possível observar que houve um decréscimo na quantidade da glutathiona reduzida, fato esperado pois a glutathiona redutase é ativada pelo estresse oxidativo instalado causado pela radiação UV e a quantidade de glutathiona reduzida diminui (133).

O tratamento com extrato de *E. suberosum* na concentração de 1,0 e 0,5 mg/mL, não demonstraram proteção celular (Figura 35). Quando aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn's não foram observadas diferenças significativas entre os controles e amostras.

Em relação a concentração de 1mg de extrato de *E. suberosum* foi observado efeito pró-oxidante no grupo que recebeu o extrato e não recebeu irradiação. Assim, mais testes em concentrações menores devem ser condizidos para avaliar o efeito protetor do extrato padronizado de *E. suberosum*.

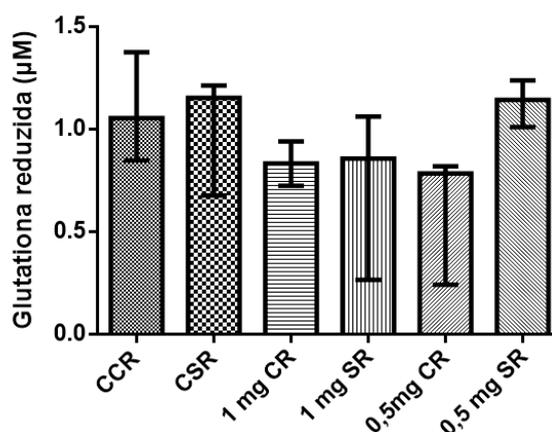


Figura 38 - Atividade de equivalente da depleção de glutathione reduzida por linhagem celular *3T3-L1* frente ao extrato padronizados de *Erythroxyllum suberosum*. Concentração de 3×10^3 células por poço. CCR = Controle com radiação das células. CSR = Controle sem radiação das células. ESCR = Células irradiadas contendo extrato de *E. suberosum*. ESSR = Células irradiadas contendo extrato de *E. suberosum*. Kruskal Wallis – Dunn's, ($p < 0,05$). Dados representados pela mediana e amplitude inter-quartis ($n=3$).

É importante salientar que mais testes frente a depleção de GSH devem ser conduzidos com os extratos de *Erythroxyllum suberosum* e *Erythroxyllum daphnites*, além de realizar mesma avaliação frente as formulações contendo tais extratos. Também recomenda-se a ampliação do n amostral para melhorar a robustez e confiabilidade frente à aplicação de testes estatísticos.

4.2.2.7 Caracterização das formulações

Tanto o gel em que foi incorporado o extrato de *E. daphnites*, quanto o gel que recebeu o extrato de *E. suberosum*, mostraram-se viscosos e de coloração caramelo (translucido), como observado na figura abaixo (Figura 39).

Em relação ao pH destas formulações, ambas apresentaram pH 5,0, o que era esperado em função do sistema de tamponamento utilizado em seu preparo.

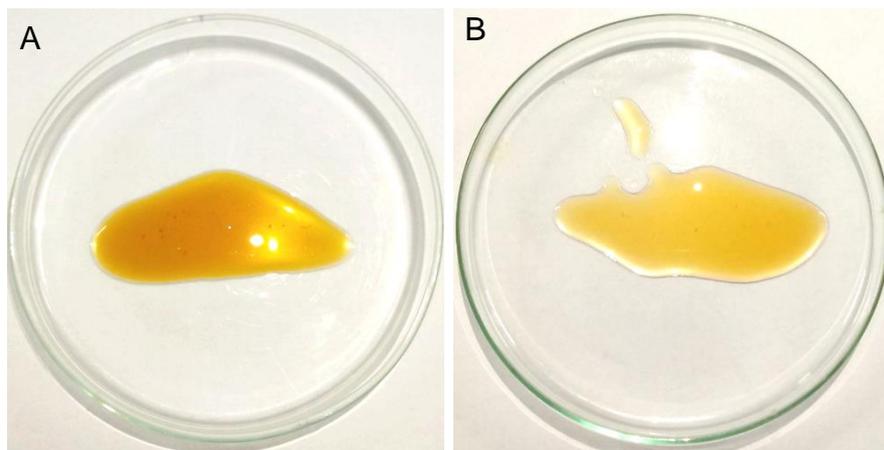


Figura 39 - Aspecto geral das formulações tipo gel. A: Formulação gel contendo *Erythroxyllum daphnites* (0,5%). B: formulação gel contendo *Erythroxyllum suberosum* (0,5%).

Em relação ao gel-creme, a formulação que teve a incorporação de extrato de *E. daphnites* mostrou-se viscoso e de coloração caramelo translúcido. Enquanto que a formulação gel-creme contendo o extrato de *E. suberosum*, apresentou-se viscoso com coloração caramelo opáco, como observado na Figura 40. Importante destacar que todas as formulações apresentaram pH 5,0.

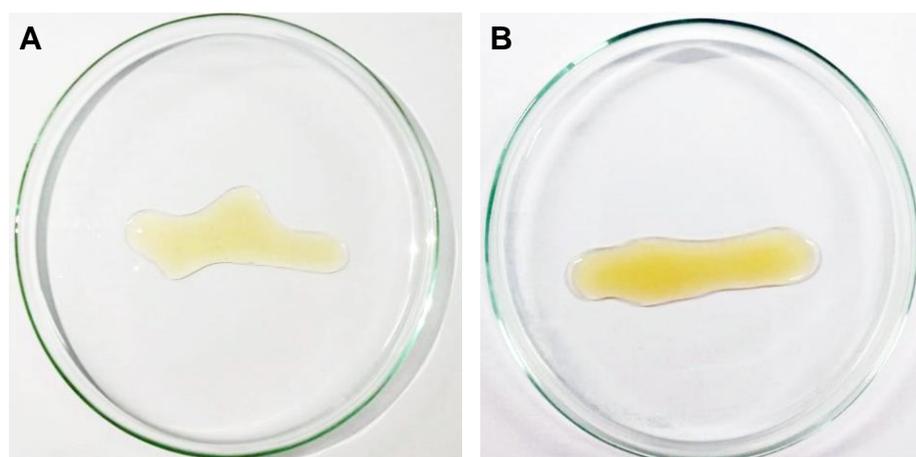


Figura 40 - Aspecto geral das formulações tipo gel-creme. A: Formulação gel-creme contendo *Erythroxyllum daphnites* (0,5%). B: formulação gel-creme contendo *Erythroxyllum suberosum* (0,5%).

Em relação aos componentes das formulações optou-se pelo uso do propilenoglicol, pois é considerado fisiologicamente inativo e por ser recomendado para dissolver compostos hidrolisáveis (134).

Dentre os silicones foram utilizados o silicone 9040 e o ciclometicone. Os silicones são polímeros quimicamente inertes, incolores, insípidos e inodoros que permitem combinações com outras substâncias sem perder as suas características, sendo as suas principais características: estabilidade térmica, baixa variação das características físicas em função da temperatura, propriedade lubrificante e emoliente. A combinação destes silicones mostrou-se importante para dar ao produto um toque seco a pele sem deixar a sensação pegajosa (134).

A hidroxietilcelulose foi utilizada como agente base da formulação e para garantir a viscosidade de gel, enquanto que o metilparabeno foi utilizado como conservante antimicrobiano, uma vez que preparações cosméticas mostram-se sujeitas a contaminação microbiológica, tanto por bactérias quanto por fungos (134).

O álcool cetosteárilico é uma mistura de dois álcoois graxos alifáticos constituídos por álcool estearílico ($C_{18}H_{38}O$) e álcool cetílico ($C_{16}H_{34}O$). É um importante material empregado na preparação de emulsões de aplicação tópica que apresenta propriedades de espessamento e funções co-tensioativas. (134).

A formulação gel foi escolhida para dar continuidade ao estudo de atividade *in vitro*, em função de sua solubilidade facilitada em meio aquoso e a homogeneidade das formulações contendo os extratos e por não apresentar citotoxicidade significativa ($p < 0,5$) quando aplicado o método de MTT (Figura 41). A formulação gel-creme apresentou citotoxicidade frente a linhagem 3T3-L1, o que inviabilizou os demais ensaios *in vitro* a serem realizados com esta formulação (Figura 41).

Quando aplicado teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para a formulação gel sem extrato foi observado que a concentração final de 11,54 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se significativamente diferente do controle de células viáveis (representando ~25% de morte celular) (Figura 41). Em relação a formulação gel-creme quando aplicado mesmo teste estatístico, foi observado diferença significativa para todas as concentrações em relação ao controle (Figura 41).

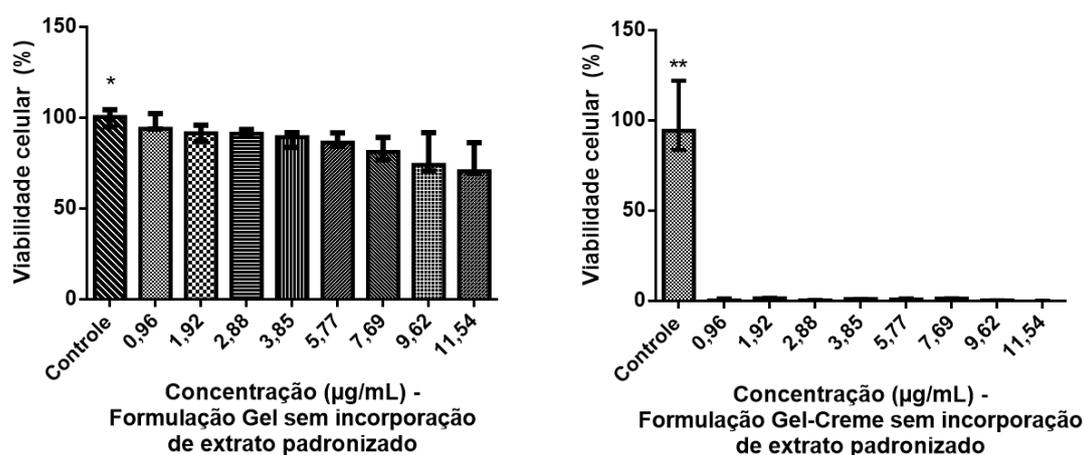


Figura 41 - Viabilidade celular por MTT da linhagem *3T3-L1* versus formulação gel e gel-creme sem a incorporação de extrato padronizado. Densidade de 3×10^4 células/poço com incubação pelo período de 4 horas, à 37 C e CO₂ (5%). Considerou-se as células que não foram expostas aos extratos como sendo controles com 100% de viabilidade. Kruskal Wallis – Dunn's, ($p < 0,05$). Dados representados pela mediana e amplitude de três replicatas de amostras com três replicatas do ensaio. * Diferença com a concentração de 11,54 µg/mL da formulação gel. ** Diferença contra todas as concentrações de gel-creme.

Sobre a incompatibilidade da formulação gel-creme, é importante salientar que, os tensoativos possuem diversos usos, como por exemplo, ação umectante, emulsificante e até mesmo como detergentes. Outra aplicação dos tensoativos está relacionada frente a extração de proteínas de membranas celulares, cristalização de proteínas, estabilizantes, desnaturantes e como agente de permeabilização de membranas (135) (136).

O álcool cetosteárilico etoxilado é um agente emulsionante não iônico amplamente utilizado nas formulações de cremes e loções O/A (óleo em água) e por ter ação de tensoativo com ação detergente é possível que tenha causado a inviabilidade nas linhagens *3T3-L1*, pois devido ao teor de álcool cetosteárilico, é possível que tenha desencadeado a ação de quebra do grupo polar frente as ligações de hidrogênio, levando a uma destruição da capacidade de integridade da membrana. É importante destacar que a inserção do monômero de detergente na membrana lipídica pode contribuir para uma ruptura da estrutura celular sobre a permeabilização da membrana celular quando acima da concentração micelar crítica (137, 138).

Assim, seria interessante o desenvolvimento desta formulação gel com a utilização de menores teores e álcool cetosteárilico etoxilado como componente estabilizante da fase O/A do produto. Outra forma de solucionar a inviabilidade da

formulação seria a troca do álcool cetosteárico por outro agente emulsificante com menor citotoxicidade.

4.2.2.8 Determinação de FPS

Para a determinação de FPS das formulações foi seguido o que é proposto no método COLIPA (99). Frente as formulações gel com presença do extrato de *E. daphnites* e *E. suberosum*, foi observado um FPS de $1,11 \pm 0,05$ e $1,05 \pm 0,04$, respectivamente (Figura 42).

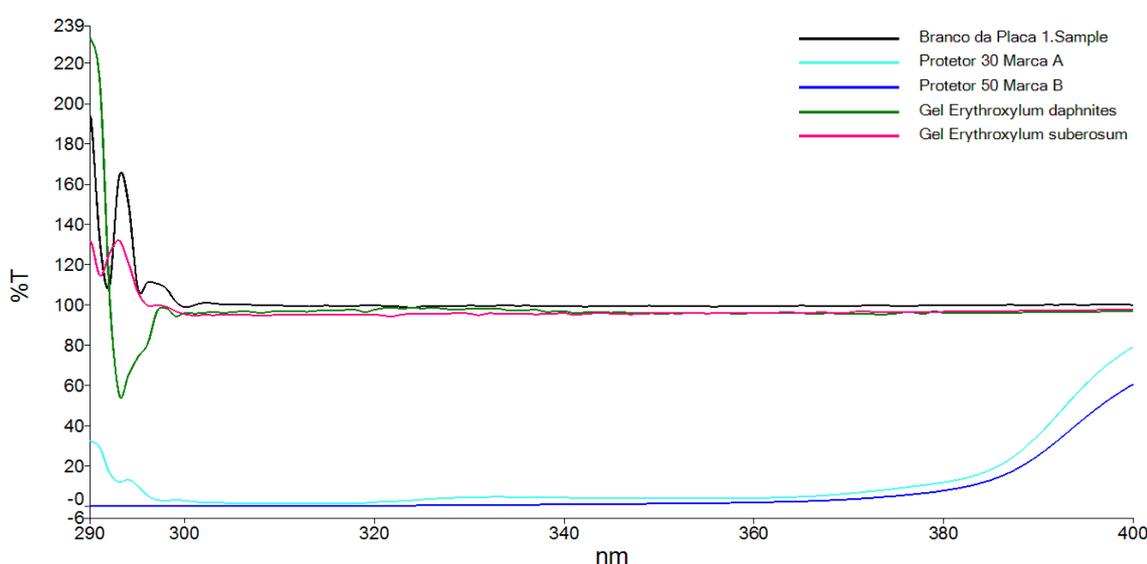


Figura 42 - Perfil de transmitância observada de 320 nm a 400 nm para as formulações gel contendo extrato de *Erythroxyllum suberosum* em comparação a formulações comerciais.

Foi feita análise somente da formulação sem a incorporação do extrato vegetal nas mesmas condições predeterminadas. Para esta análise não foi observada atividade de FPS aparente, pois praticamente não houve filtração da luz transmitida sobre a amostra sob a placa utilizada na análise.

Também foi realizada a leitura de protetores solares que já existem no mercado, estes foram denominados de marca A (FPS rotulado 30) e marca B (FPS

rotulado 50). Após análise pelo ensaio de determinação de FPS com reflectância difusa foi observado um FPS de $14,92 \pm 2,55$ para a marca A e $31,8 \pm 6,00$ para marca B. Em relação ao protetor de FPS 50 foi observado que houve uma filtração correspondente a 100% entre a faixa de 290 a 320 nm, apresentando assim uma excelente filtração de radiação UVB, enquanto que a UVA apresentou uma filtração de 100% entre a faixa de 320 a 380, apresentando boa filtração também para UVA, cuja sua faixa de absorção se enquadra entre 320 e 400 nm (Figura 42).

Sobre os protetores solares rotulados, a RDC Nº 30 de 1º de Junho de 2012 (139) em consonância com a Resolução nº 79 de 28 de Agosto de 2000 (140), abordam aspectos de controle desses tipo de produto, que deve ser avaliado de acordo com o FPS indicado no rotulo, pela indicação para o tipo de pele e por conta da composição da sua formulação.

Os protetores rotulados A e B avaliados mostram-se dentro do que é preconizado pois, o fator mínimo que estes devem apresentar em relação a proteção UVA deve corresponder a 1 terço do fator de proteção indicada em rotulagem, assim, tanto o protetor de marca A quanto o de marca B, estão dentro do limite de aceitabilidade.

É importante destacar que o método avaliado frente a determinação de FPS com a utilização do guia *COLIPA* (99) que se trata de um método físico para determinação do FPS, onde pode-se observar o quanto a amostra consegue bloquear fisicamente a passagem da luz ultravioleta de tipo A e B.

As formulações contendo os extratos padronizados das espécies de *Erythroxylum* deste estudo não apresentaram o FPS mínimo exigido para serem utilizados como bloqueadores de radiação UVA, não atingindo o que é necessário para que tais produtos apresentem efeitos de proteção a queimaduras solares por bloqueio físico (140).

O fato de esta formulação não apresentar ação física, não significa que as amostras não venham a apresentar efeitos protetores aos danos da radiação UV. Os danos causados pela radiação solar estão relacionados à produção de radicais livres. Assim, substâncias com habilidades de inibir a ação ou produção destes radicais podem ser importantes para evitar ou minimizar danos.

Em outra vertente, sabe-se que os extratos de *Erythroxylum* demonstraram mecanismos antioxidantes, como por exemplo o sequestro de radical livre estável

DPPH^{*}, reduzindo-o à difenil-picril-hidrazina e inibição do complexo fosfomolibdênio. O teor de compostos fenólicos são considerados importantes para proteção das plantas frente aos raios UV, pois eles atuam dissipando esta radiação absorvida de maneira inofensiva (141). Assim, produtos naturais que apresentem atividade antioxidante podem contribuir para prevenção ou retardo de danos a pele induzidos por radiação UV, proporcionando efeitos fotoquimioprotetores e de fortalecimento do sistema de proteção endógeno além de corroborar para a redução do dano oxidativo na pele (72).

Em estudo de revisão realizada por Valko et. al. (142) é discutido que o estresse oxidativo causado pela radiação UV podem desencadear uma cascata de mediadores do processo inflamatório com a presença de prostaglandinas e interleucinas, sendo que a manutenção desse processo inflamatório gera um maior desequilíbrio dos estados das células, contribuindo para a promoção de processos neoplásicos. Em outras palavras, o estresse oxidativo resulta de reações metabólicas que fazem uso de oxigênio e contribui para uma perturbação no estado de equilíbrio das reações pró-oxidantes em relação aos antioxidantes nos organismos vivos.

4.2.2.9 Determinação da atividade antioxidante da formulação gel

Quando avaliada a atividade antioxidante foi observado que as formulações sem incorporação dos extratos vegetais não apresentaram atividade, enquanto que as formulações gel com extratos *E. daphnites* e *E. suberosum* apresentaram IC_{50} de 9,30 e 10,70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ao comparar a atividade dos extratos padronizados com as formulações gel contendo os extratos respectivos, foi observado que houve baixo decaimento da atividade, porém não foi observado diferença estatística ($p < 0,05$). Para tais comparações foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (Figura 43).

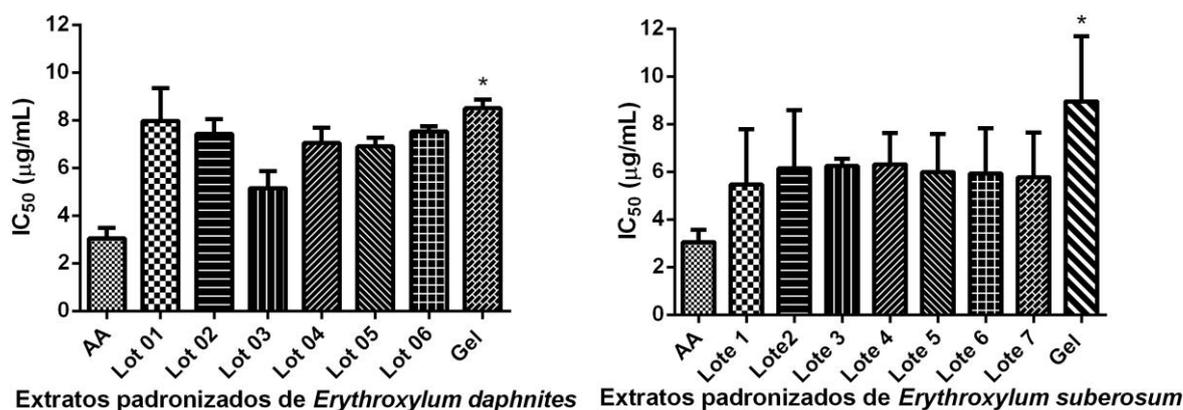


Figura 43 - Atividade antioxidantes das formulações tipo gel com extrato padronizado das espécies *Erythroxyllum daphnites* e *Erythroxyllum suberosum* em comparação com os os lotes de extratos padronizados e padrão ácido ascórbico. Teste Kruskal Wallis – ($p < 0,05$). * Foi observado diferença significativa entre o controle positivo ácido ascórbico (AA) e as formulações. Dados foram representados pela mediana e amplitude ($n=3$).

Quando feita a comparação das formulações gel contendo os extratos padronizados de *E. daphnites* e *E. suberosum* foi observado melhores atividades antioxidantes por DPPH[•] expressas em IC₅₀ que: três formulações de protetores solares a base de extrato etanólico de *Sterculia populifolia* (750,15; 126,49 e 79,17 µg/mL) (143), duas formulações contendo a combinação de extratos de *Kaempferia galanga* e *Boesenbergia pandurata* (109,16 e 95,24 µg/mL) (144). É importante destacar que para essas duas formulações o tempo de contato das amostras com o DPPH[•] foi de 30 minuto, enquanto que no presente estudo utilizando *E. daphnites* e *E. suberosum* utilizou-se 15 minutos (mostrando-se ainda mais efetivo). Também foi observada boa atividade antioxidante quando comparado ao produto descrito em literatura que utiliza corante natural para batom a base de *Hylocereus polyrhizus* (76,31 µg/mL) (145).

CONCLUSÃO

Este estudo contribuiu para a padronização de extratos obtidos das folhas de *E. daphnites* e para a padronização de extratos obtidos para as folhas de *E. suberosum*, que apresentaram reprodutibilidade quanto aos seus teores de sólidos totais (*E. daphnites* – variou de 3,07 a 3,27% e *E. suberosum* – variou de 2,60 a 2,83%)

rendimento (*E. daphnites* – variou 8,00 a 11,08% e *E. suberosum* – variou de 3,36 a 5,01%), teor de polifenóis (*E. daphnites* – variou 31,45 a 38,64% e *E. suberosum* – variou de 45,25 a 51,63%), teor do marcador fitoquímico ácido neoclorogênico para *E. daphnites* (variou de 6,96 a 8,48 µg/mL), teor de marcadores ácido neoclorogênico (variou de 10,51 a 13,05 µg/mL) e hiperosídeo (variou de 21,93 a 25,63 µg/mL) para *E. suberosum*, e perfil cromatográfico por CCD e CLAE-DAD para as duas espécies de *Erythroxyllum*.

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de redução do radical DDPH e redução da formação do complexo fosfomolibdenio, sendo definidas as médias dos IC_{50} em relação ao DDPH para os lotes de *E. daphnites* como sendo 7,51 µg/mL, e 5,97 µg/mL para *E. suberosum*.

Os compostos fitoquímicos majoritários presentes nos extratos padronizados foram identificados como ácido neoclorogênico para *E. daphnites* e ácido neoclorogênico e hiperosídeo para *E. suberosum*, sendo o primeiro estudo com identificação do ácido neoclorogênico para essas espécies vegetais. A metodologia aplicada para a detecção de polifenóis presentes nos extratos padronizados das folhas de *E. suberosum* foi validada e padronizada para hiperosídeo.

Os extratos padronizados de *E. daphnites* e *E. suberosum* não foram citotóxicos, quando avaliados na faixa de 0,02 a 1mg/mL. Apresentando assim, viabilidade celular com cerca de 100% para a linhagem de fibroblasto 3T3-L1, o mesmo foi observado para as formulações gel com incorporação dos extratos de *Erythroxyllum*.

Este estudo é o primeiro relato sobre a incorporação de extratos aquosos das espécies de *E. daphnites* e *E. suberosum* a formulações como também foi a primeira vez em que foram realizadas avaliações quanto ao poder de proteção solar que estes produtos podem apresentar.

Mesmo esses extratos não apresentando FPS satisfatório frente a metodologia aplicada, foi observado potencial antioxidante e ausência de citotoxicidade frente aos fibroblastos da linhagem 3T3-L1 dos extratos padronizados dessas espécies de *Erythroxyllum*. Esses extratos apresentam potencial para a prevenção ou retardo de danos a pele induzidos por radiação UV, proporcionando efeitos fotoquimioprotetores. Estudos complementares devem ser realizados para melhor avaliar a eficiência da atividade fotoprotetora desses extratos.

Este estudo também contribuiu para a inovação frente ao desenvolvimento de protetores solares a base de produtos naturais, que visou não somente desenvolver um produto com eficácia e segurança na proteção contra os raios ultravioletas solares, mas também o desenvolvimento de um produto que não cause danos ambientais e ainda atenda as necessidades estéticas para o futuro do mercado de protetores solares.

PERSPECTIVAS

- Melhorar atividade fotoquimioprotetora das formulações tópicas:
 - Buscar melhorar o fator de proteção solar FPS *in vitro* aumentando a concentração dos extratos em formulação;
 - Desenvolver formulação com caracter inerte em relação aos estudos de citotoxicidade;
 - Avaliar a citotoxicidade da formulação com o incorporado dos extratos frente ao método MTT;
 - Avaliar o efeito de recuperação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em cultura celular expostas a radiação UV;
 - Determinar a segurança biológica por fototoxicidade;
 - Avaliar o efeito inibidor da morte celular induzida pela irradiação UV;
 - Avaliar a estabilidade da formulação.

REFERÊNCIAS

1. Ministério do Meio Ambiente [homepage na internet]. O bioma Cerrado. [acesso em 25 out 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.
2. Brasil. Constituição Federal (2010). Proposta de Emenda à Constituição nº 51, de 2003. Dá nova redação ao § 4º do art. 225 da Constituição Federal, alterando e inserindo parágrafos. Brasília, DF: Senado Federal; 2010.
3. Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG. Mapeamento do uso do solo e cobertura vegetal – bioma cerrado: ano base 2002. Brasília - DF: Ministério do Meio Ambiente – Secretaria de Biodiversidade e Florestas; 2010.
4. Magalhães SR, Lima GS, Ribeiro GA. Avaliação dos incêndios florestais ocorridos no parque nacional da Serra da Canastra - Minas Gerais. Ci Fl. 2012;18:135-41.
5. Myers N. Threatened biotas: "Hot Spots" in tropical forests Environmentalist. 1988;8(3):187-208.
6. Myers N. The Biodiversity Challenge: Expanded Hot-Spots Analysis Environmentalist. 1990;10(4):143-256.
7. Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Fonseca GAB, Olivieri S. Biodiversity hotspot and major tropical wilderness areas - Approaches to setting conservation priorities. Conservation Biology. 1998;12:516-20.
8. Fiedler NC, Azevedo INC, Rezende AV, Medeiros MB, Venturoili F. Efeito de incêndios florestais na estrutura e composição florísticas de uma área de Cerrado *sensu stricto* na Fazenda Água Limpa - DF. Rev Árvore. 2004;28:561-84.
9. Neto GG, Morais RGd. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. Acta bot bras. 2003;17(4):561-84.
10. Loiola MIB. Flora fanerogâmica nordestina: diversidade, distribuição e potencial econômico. Caderno de Cultura e Ciências. 2007;2(2):15-6.
11. Loiola MIB, Agra MF, Baracho GS, Queiroz RT. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. Acta bot bras. 2007;2(21):473-87.
12. Filho MDL. Estudo Fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* com potencial atividade vasodilatadora e inibidora da enzima conversora de angiotensina. [Dissertação]. Minas Gerais, Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2009.
13. Barros MG. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br. (Erythroxylaceae) do Brasil. Brazilian Journal of Botany. 1998;21(2):159-66.
14. Oliveira SL. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcalóides tropânicos, flavonoides diterpenos [Tese]. Pernambuco, João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2012.
15. Loiola MIB, Costa-Lima JL. Erythroxylaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7697>>; [cited 2015 20 ago].
16. Barbosa AVG, Júnior AA. Flora dos estados de Goiás e Tocantins: Erythroxylaceae. UFG, editor. Goiânia2001.
17. Loiola MIB, Costa-Lima JL. Erythroxylaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17434>; 2018. [26 Oct].

18. Tropicos. Missouri Botanical Garden. *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil.: <<http://www.tropicos.org/Name/12500266>>; 2018. [26 oct].
19. List TP. A working list of all plant species. *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2801689>>; 2018. [26 oct].
20. Macedo TBC, Elias ST, Torres HM, Yamamoto-Silva FP, Silveira D, Magalhães PO, et al. Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. Brazilian Dental Journal. 2016;27:108-12.
21. Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rêgo DF, Simeoni LA, Silveira D, et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. Clinical oral investigations. 2015;19:637-46.
22. Correia AF, Silveira D, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Fagg CW, Silva ECd, et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. BMC Complement Altern Med. 2016;16(203):1-9.
23. Elias ST, Macedo CCS, Simeoni LA, Silveira D, Magalhães PO, Lofrano-Porto A, et al. Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Cell Cycle. 2016;15(7):948–56.
24. Simas PH. Diterpenoides, derivados de fenilpropanoides e outros constituintes químicos de *Erythroxylum daphnites* Mart. [Simpósio]2013.
25. Martins DHN. Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart. [Dissertação]. Brasília. Universidade de Brasília. 2015.
26. Erythroxylaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17434>>. Acesso em: 14 Fev. 2017.
27. Mendonça JO, Cervi AC, Guimarães OA. O gênero *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Estado do Paraná, Brasil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 1998;41(3):349-58.
28. Barbosa WLR, Pinto LN. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. Revista Brasileira de Farmacognosia 2003;13:47-9.
29. Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the central western region of Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2012:1302-8.
30. RODRIGUES GA, SOUZA WC, GODINHO MGC, FERREIRA HD, VILA VERDE GM. Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2015;17(4):1169-76.
31. Barros IMC, Leite BHM, Leite CFM, Fagg CW, Gomes SM, Resck IS, et al. Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A.St. Hil. leaves. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2016;7(3):88-94.
32. Moraes NdA. Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das folhas de *Erythroxylum suberosum* A.ST.-Hil.: correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina. [Dissertação]. Brasília. Universidade de Brasília. 2015.
33. Neiva VA, Ribeiro MNS, CARTÁGENES MSSC, Moraes-Coutinho DF, Nascimento FRF, Reis AS, et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. Revista Ciência da Saúde. 2011;13(2):155-65.

34. Leite CFM, Leite BHM, Barros IMdC, Gomes SM, Fagg CW, Simeoni LA, et al. Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2014;13(2):135 - 43.
35. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundário. *Quim Nova*. 2007;30(2):374-81.
36. Souza MF, Manganotti SA, Souza PNS, Meira MR, Matos CC, Martins ER. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. *Biotemas*. 2011;24:9-14.
37. Kunle OF, Egharevba HO, Ahmadu PO. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2012;4(3):101-12.
38. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais - A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. 2002;25(3):429-38.
39. Azevedo CD, Moura MAd. Cultivo de plantas medicinais: Guia prático. Rural PR, editor. Rio de Janeiro, Niterói 2010.
40. Yunes RA, Filho VC. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 4. ed. Itajaí: Univali; 2014.
41. Veiga VF, Mello JCP. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(3):464-71.
42. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa N.º 4, de 18 de junho de 2014. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. *Diário Oficial da União* 2 jun 2014.
43. Gómez JMR, Carlesso F, Vieira LE, Silva L. A irradiância solar: conceitos básicos. *Rev Bras Ens Fis*. 2018;40(3):e3312-1 - e-12.
44. Svobodová A, Vostálova J. Solar radiation induced skin damage: Review of protective and preventive options. *International Journal of Radiation Biology*. 2010;86(12):999-1030.
45. Bogh MKB, Schmedes AV, Philipsen PA, Thieden E, Wulf HC. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol*. 2010;130:546-53.
46. Pathak MA, Riley FJ, Fitzpatrick TB, Curwen WL. Melanin formation in human skin induced by long-wave ultra-violet and visible light. *Nature*. 1962;193:148-50.
47. Hart P, Gorman S, Finlay-Jones J. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol*. 2011;11:584-96.
48. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1137-42.
49. Ridley AJ, Whiteside JR, McMillan TJ, Allinson SL. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *International Journal of Radiation Biology*. 2008;85(3):177-95.
50. Pillai CO, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *Int J Cosmet Sci*. 2005;27:17-34.
51. Vioux-Chagnoleau C, Lejeune F, Sok J, Pierrard C, Marionnet C, Bernerd F. Reconstructed human skin: From photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. *Journal of Dermatological Science Supplement*. 2006;2:S1-S12.
52. Verschooten L, Claerhout S, Laethem AV, Agostinis P, Garmyn M. New Strategies of Photoprotection. *Photochemistry and photobiology*. 2006;82:1016-23.

53. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;195:298-308.
54. Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res*. 2005;571:153-73.
55. Takashima A, Bergstresser PR. Impact of UVB Radiation on the epidermal cytokine network *Photochem Photobiol*. 1996;63(4):397-400.
56. Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat Chem Biol*. 2014;10(7):542-51.
57. Darvin ME, Fluhr JW, Meinke MC, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. *Experimental Dermatology*. 2011;20:125-9.
58. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Rev Plant Biol*. 2004;55:373-99.
59. Nishigori C, Hattori Y, Toyokuni S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(3):561-70.
60. Juchem PP, Hochberg J, Winogron A, Ardenghy M, English R. Health risks of ultraviolet radiation. *Rev Soc Bras Cir Plas*. 1998;13(2):31-60.
61. Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Papers*. 2003;147(2):137-45.
62. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC N.º 30, de 13 de junho de 2012. Aprova o regulamento técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências.
63. 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.
64. Flor J, Davolos MR, Correa MA. Protetores solares. *Quim Nova*. 2007;30:153-8.
65. Schalka S, Reis VMS. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):507-15.
66. Nascimento LF, Santos EP, Aguiar AP. Fotoprotetores orgânicos: Pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. *Rev Virtual Quim*. 2014;6(2):190-223.
67. Cabral LDS, Pereira SO, Partata AK. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. *Revista Científica do ITPAC*. 2011;4(3):ISSN 1983-6708.
68. Araujo TS, Souza SO. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. *Scientia Plena*. 2008;4(11):1-7.
69. Silva LS, Monteiro MSSB. Avaliação da segurança de nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco em formulações antossolares. *REV Virtual Quim*. 2016;8(6):1963-77.
70. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC N.º 47, de 16 de maio de 2006. Aprova o regulamento técnico lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes.
71. Salucci S, Burattini S, Curzi D, Buontempo F, Martelli AM, Zappia G, et al. Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2014;141:1-9.
72. Souza RO, Alves GAD, Forte ALSA, Marquede-Oliveira F, Silva DF, Rogez H, et al. *Byrsonima crassifolia* extract and fraction prevent UVB-induced oxidative stress in keratinocytes culture and increase antioxidant activity on skin. *Industrial Crops & Products*. 2017;108:485-94.

73. Dupont L, Pereira DN. Sun exposure and sun protection habits in high school students from a city south of the country. *An Bras Dermatol*. 2012;87:90-5.
74. Dévéhat FL-L, Legouin B, Couteau C, Boustie J, Coiffard L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *J Photochem Photobiol B*. 2013;120:17-28.
75. ABIHPEC. Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. disponível em: <<http://https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2019/>> Acessado em 15 de Junho de 2019.
76. ABIHPEC. Caderno de Tendências: Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (2019 - 2020). ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>> Acessado em 15 de Junho de 2019.
77. Gilbert E, Pirof F, Bertholle V, Roussel L, Falson F, Padois K. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013;35:208-19.
78. Korać RR, Khambholja KM. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev*. 2011;5(10):164-73.
79. Schlumpf M, Schmid P, Durrera S, Consciencea M, Maerkela K, Henselera M, et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. *Toxicology*. 2004;205:113-22.
80. Brasil. Senado Federal. Projeto de Lei nº 616, de 2019. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências, para dispor sobre a regulação ambiental de cosméticos, e dispõe sobre a proibição de protetores solares considerados tóxicos para os recifes de corais. Disponível em: <<https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/135169/pdf>> Acessado em 18.06.2019.
81. He T, Tsui MMP, Tan CJ, Ma CY, Yiu SKF, Wang LH, et al. Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. *Environmental Pollution*. 2019;245:462-71
82. EUA, Estado do Havaí. The Senate Twenty-Ninth Legislature. S.B. No. 2571. Bans the sale, offer of sale, or distribution in the State of any SPF sunscreen protection personal care product that contains oxybenzone or octinoxate, or both, without a medically-licensed prescription. Disponível em: <https://www.capitol.hawaii.gov/session2018/bills/SB2571_.HTM> Acessado em: 20.06.2019.
83. Brasil. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Brasília, 2010.
84. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 2004;84(3):329-239.
85. Marques JP, Borges CPF. Práticas de Química Orgânica. 2ª edição. ed. São Paulo, Campinas 2012.
86. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2ª ed. New York, 2001.
87. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União 2 jun 2003.

88. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N.º 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. .
89. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199 - 200.
90. Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coisson J-D, Rinaldi M, Arlorio M. Study of the DPPH radical dot-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem*. 2009;114(3):889–97.
91. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*. 1999;269(2):337-41.
92. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. 1963;17(2):299-313.
93. União Européia. COLIPA - The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. Retirado de: <<http://colipa.eu/about-us/>> Acessado em: 20.06.2019.
94. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1):55-63.
95. Bruggisser R, Daeniken Kv, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta medica*. 2002;68(5):445-8.
96. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214-26.
97. Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J. Chalcones as Potent Tyrosinase Inhibitors: The Importance of a 2,4-Substituted Resorcinol Moiety. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(2):433-41.
98. Morita T, Assumpção RMV. Manual de soluções, reagente e solvente. 2 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher; 1988. 627 p.
99. COLIPA. Guidelines: In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products, Europa, 2011.
100. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Consolidado de normas da COFID (Versão V). 2015.
101. Archela E, Dall’Antonia LH. Determinação de compostos fenólicos em vinho: Uma revisão. *Ciências Exatas e Tecnológicas*. 2013;34(2):193-210.
102. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-58.
103. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*. 2009;53:75-100.
104. Neergheen VS, Bahorun T, Jen L-S, Aruoma OI. Bioefficacy of mauritian endemic medicinal plants: Assessment of their phenolic contents and antioxidant potential. *Pharm Biol*. 2007;45:9-17.
105. Soobrattee MA, Bahorun T, Neergheen VS, Googoolye K, Aruoma OI. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro*. 2008;22:45-56.
106. Cechinel-Filho V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Química Nova*. 2000;680(1):1-5.

107. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC N.º 26, de 13 de maio de 2014. Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.
108. Sondheimerl E. On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid somers in plants Arch Biochem Biophys. 1958;74:131-8.
109. Corse J. A new isomer of chlorogenic acid from peaches. Nature. 1953:171-2.
110. Hwang SH, Kwon SH, Kim SB, Lim SS. Inhibitory activities of *Stauntonia hexaphylla* leaf constituents on rat lens aldose reductase and formation of advanced glycation end products and antioxidant. Biomed Res Int. 2017;2017:1-8.
111. Kapepula PM, Ngombe NK, Tshibangu PT, Tsumbu C, Franck T, Mouithys-Mickalad A, et al. Comparison of metabolic profiles and bioactivities of the leaves of three edible Congolese *Hibiscus* species. Nat Prod Res. 2017;31(24):1885-2892.
112. Zhen J, Villani T, Guo Y, Qi Y, Chin K, Pan M-H, et al. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. Food Chem. 2015;190:673-80.
113. Seo C-S, Lim H-S, Jeong S-J, Ha H, Shin H-K. HPLC-PDA analysis and anti-inflammatory effects of mori cortex radices Natural product communications. 2013;8(10):1443-6.
114. Francisco V, Costa G, Figueirinha A, Marques C, Pereira P, Neves BM, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. Journal of ethnopharmacology. 2013;148(1):126-34.
115. Guldbrandsen N, Mieri M, Gupta M, Seiser T, Wiebe C, Dickhaut J, et al. Screening of panamanian plant extracts for pesticidal properties and HPLC-based identification of active compounds. Sci Pharm. 2015;83:353-67.
116. Fang W, Ma Y, Wang J, Yang X, Gu Y, Li Y. In vitro and in vivo antitumor activity of neochlorogenic acid in human gastric carcinoma cells are complemented with ROS generation, loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis induction. JBUON. 2019;42(1):221-6.
117. Raza A, Xu X, Sun H, Tang J, Ouyang Z. Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. Trop J Pharm Res. 2013;16(2):483-9.
118. Lopes, IMC. Estudo químico de *Erythroxylum suberosum*, biomonitorado por inibição da hialuronidase. [Tese]. Brasília. Universidade de Brasília. 2016.
119. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized tripartite guideline, Topic Q2B; Note for guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.
120. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol. 2004;26(2):211-9.
121. Vicentino ARR, Menezes FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Rev bras farmacogn. 2007;17(3):384-7.
122. Nuengchamnon N, Krittasilp K, Ingkaninan K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. Food Chem. 2009;117:750-6.
123. Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the antioxidant properties of five mentha species. Iran J Pharm Res. 2008;7(3):203-9.
124. A B, L L. The health effects of vitamin C supplementation: a review. J Am Coll Nutr. 1995;14(2):124-36.

125. Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal Biochem.* 1995;231(1):237-46.
126. Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick TB et al. Biology of Melanocytes. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. *Dermatology in General Medicine.* v. 1. New York: Mcgraw-Hill; 1999. p.192-220.
127. Gonchorosk DD, Côrrea GM. Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. *Infarma.* 2005;17(3/4):84-8.
128. Thomas NV, Kima S-K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011;32:325-35.
129. Mataveli LRV, Antunes NJ, Brigagão MRPL, Luccas PO. Medida da atividade enzimática de polifenol oxidases em extrato bruto de banana (*Musa sp.*): comparação entre diferentes metodologias. *Infarma.* 2007;19(9/10):33-5.
130. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2005;45:108-11.
131. Huber PC, Almeida WP. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim Nova.* 2008;31(5):1170-9.
132. Ho JN, Lee YH, Park JS, Jun WJ, Kim HK, Hong BS, et al. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2005;28(7):1244-8.
133. Freitas DRJ, Junior ISV, Masuda A. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;17(2):99-104.
134. Corrêa MA. *Cosmetologia Ciência e Técnica.* 1 ed 2012.
135. Hipfner DR, Gaudie SD, Deeley RG, Cole SPC. Detection of the Mr 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Cancer research.* 1994;54(22):5788-92.
136. Gennuso F, Ferneti C, Tirolo C, Testa N, L'Episcopo F, Caniglia S, et al. Bilirubin protects astrocytes from its own toxicity by inducing up-regulation and translocation of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(08):2470-5.
137. Nyholm T, Slotte JP. Comparison of triton X-100 penetration into phosphatidylcholine and sphingomyelin mono and bilayers. *Biophys J.* 2001;93(10):3504-14.
138. Lodon E, Brown DA. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et biophysica acta.* 2000;1508(2000):182-95.
139. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos.
140. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução - RDC Nº 79 de 28 de Agosto de 2000. Estabelece normas e procedimentos para registro de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes .
141. Souza TM, Santos LE, Moreira RRD, Rangel VLBI. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2005;15:36-8.
142. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2006;39:44-84.

143. Khairi N, as'ad S, Djawad K, Alam G. The determination of antioxidants activity and sunblock Sterculia Populifolia extract-based cream. Pharm Biomed Res. 2018;4(1):20-6.
144. Charisma SL, Rahayu WS, Wahyuingrum R. Determination of sun protection factor and antioxidant properties of cream formulation of kencur (*Kaempferia galanga* L) and temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlecht) rhizomes extract. Pharmacia. 2018;8(2):321-30.
145. Azwanida NN, Normasarah, Afandi A. Utilization and evaluation of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) as a natural colorant for lipstick. Jurnal Teknologi. 2014;69(6):139-42.