UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.): Caracterização físico-química e funcional

Nadia Ruscinc

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador:

Prof. Dr. André R. Baby

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.): Caracterização físico-química e funcional

Nadia Ruscinc

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador:

Prof. Dr. André R. Baby

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R668f

Ruscinc, Nadia
Fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (Vaccinium myrtillus L.): Caracterização físico-química e funcional / Nadia Ruscinc. - São Paulo, 2018.
107 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Baby, Andre R.

1. Vaccinium myrtillus L.. 2. Atividade Antioxidante. 3. Fotoprotetor Bioativo. 4. Fotoproteção. I. T. II. Baby, Andre R., orientador.

Nadia Ruscinc

Fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.): Caracterização físico-química e funcional

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. André Rolim Baby
Orientador / Presidente

_____
1^0 examinador

_____
2^0 examinador

_____
3^0 examinador

_____
4^0 examinador

São Paulo, _____ de _____de 2018.

Dedicatória

*Aos meus pais, **Adelaide** (in memorian) e **João**, por terem me ensinado a cultivar o amor pelos estudos e conhecimento. Muito obrigada!*

*Ao meu marido muito amado, **Beni**, pelo seu amor, carinho, atenção e apoio incondicional desde sempre! Imensa gratidão!*

*Ao meu irmão, **Valdir**, por seu amor e carinho.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, incentivador e mestre ***Prof. Dr. André R. Baby****, por acreditar em mim e compartilhar, sempre com muito carinho, seus valiosos conhecimentos. Minha eterna gratidão!*

Ao ***Prof. Batistuzzo,*** *pelo exemplo profissional, amizade, confiança, apoio e valiosos ensinamentos*

*Às queridas****, Prof.ª Dr.ª Nilsa Sumie Yamashita Wadt*** *e* ***Prof.ª Dr.ª Camila Areias de Oliveira*** *pelo conhecimento e valiosas contribuições durante o exame de qualificação.*

Ao Prof. ***Dr. Felipe Rebello Lourenço****, pela paciência e suporte estatístico.*

À ***Prof.ª Dr.ª Maria Valéria Robles Velasco e a Dr.ª Yukiko Eto*** *pelo apoio e ensinamentos.*

Aos amigos e técnicos de laboratório ***Dr.ª Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto*** *e* ***Edgar Muniz Junior*** *pela amizade e ensinamentos.*

A todos os ***professores*** *do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos por compartilharem seus conhecimentos e experiências.*

Aos queridos amigos e colegas acadêmicos ***Thamires****,* ***André Daneluti, Rafael*** *e* ***Rebeca (IC)****, pela amizade, carinho e imenso apoio em todos os momentos.*

Aos parceiros de vida acadêmica ***Alexandra****,* ***Gabriela****,* ***Mirela****,* ***Albert****o e* ***Paulo****, pelo carinhoso convívio e crescimento intelectual.*

Ao ***David Olímpio de Lima Filho*** *pela paciência e apoio técnico-administrativo.*

Ao Instituto de Pesquisa Integrada, pela parceria nos ensaios clínicos e a ***Fernanda Daud Sarruf*** *pela atenção.*

À ***Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo****, pelo suporte técnico-científico e desenvolvimento humano.*

A todos que contribuíram para realização dessa etapa da minha vida.

Muito obrigada!

“Só enfrenta o desafio da escalada quem acredita que a vista lá de cima é mais bonita. ”

Autor desconhecido

RESUMO

Ruscinc, Nadia. **Fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.): Caracterização físico-química e funcional,** 2018. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os efeitos deletérios causados pela radiação ultravioleta (UV) e o aumento significativo no diagnóstico de câncer de pele, confirmam a necessidade de um progresso significativo na pesquisa de produtos fotoprotetores eficazes e seguros, para proteção eficaz da pele. As formulações atuais associam filtros UV, orgânicos e inorgânicos, com eficácia limitada e que podem acarretar reações cutâneas adversas. O extrato de *Vaccinium myrtillus* L. (EVM) apresenta em sua composição compostos fenólicos, como as antocianinas, que possuem atividade antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar formulações fotoprotetoras contendo extrato de *Vaccinium myrtillus* L. com amplo espectro de ação e concentrações reduzidas de filtros UV. As emulsões contendo ou não EVM e filtros orgânicos (octocrileno e metileno bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol) e inorgânico (dióxido de titânio) foram avaliadas e consideradas estáveis perante parâmetros pré-definidos. O perfil de segurança foi determinado pelo método *in vitro* Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) e o potencial antirradicalar do EVM foi confirmado pelo teste de DPPH•. A formulação fotoprotetora acrescida de 5,0% de EVM foi avaliada quanto à eficácia fotoprotetora *in vivo* e *in vitro* e não demonstrou aumento significativo no FPS quando comparada à formulação que continha somente os filtros solares e, no ensaio referente à hidratação da pele, não houve alteração nos dados, segundo teste de eficácia clínica. Os resultados obtidos sugeriram que mesmo não apresentando aumento no valor de FPS *in vivo*, a formulação fotoprotetora contendo o extrato, poderia atuar como agente antioxidante evitando os danos provocados pela radiação UV.

Palavras-chave: *Vaccinium myrtillus* L. Atividade antioxidante. Fotoprotetor Bioativo. Fotoproteção.

ABSTRACT

Ruscinc, Nadia. **Bioactive sunscreens containing blueberry** (***Vaccinium myrtillus*** **L.): physicochemical and funcional characterization**. 2018. 103f. (Master Dissertation) – Faculty of Pharmacy Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

The deleterious effects caused by ultraviolet radiation (UV) and the significant increase in the diagnosis of skin cancer confirm the need for significant progress in researching effective and safe sunscreen products for effective skin protection. Current formulations associate UV, organic and inorganic filters with limited efficacy that can lead to adverse skin reactions. Vaccinium myrtillus extract (EVM) contains in its composition polyphenols compounds, such as anthocyanins, which have been antioxidant activity. The objective of this study was to evaluate sunscreens containing EVM with broad action spectrum and reduced concentrations of UV filters. Emulsions containing or not EVM and organic (octocrylene and methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol) and inorganic (titanium dioxide) filters were evaluated and considered stable under pre-defined parameters. The safety of the emulsion was assessed was determined by the *in vitro* Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane method (HET-CAM) and the antiradical potential of EVM was confirmed by the DPPH• test. The sunscreen formulation containing EVM 5.0% was photoprotective efficacy evaluated *in vivo* and *in vitro* and did not show a significant increase in SPF when compared the formulation only with UV filters and no improves skin hydration, according to clinical efficacy assay. The results of the study suggest that even without increase SPF *in vivo*, the sunscreen formulation containing the extract may show antioxidant activity avoiding damage caused by UV.

Keywords: *Vaccinium myrtillus* L. Antioxidant activity. Bioactive sunscreen. Photoprotection.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do octocrileno 8
Figura 2: Espectro de absorção e Estrutura química do MBBT 9
Figura 3: Estrutura básica de um flavonoide 12
Figura 4: Estrutura química básica das antocianinas 13
Figura 5: Cátion flavilium 14
Figura 6: Frutos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L 15
Figura 7: Reação de redução da molécula de DHPP por substâncias antioxidantes 28
Figura 8: Espectro de absorção de solução de antocianinas em diferentes pHs 42
Figura 9: Comparativo de FPS estimado entre as formulações F3 e F4 antes e após irradiação 47
Figura 10: Comparativo de valores de onda crítico entre as formulações F3 e F4 antes e após irradiação 48
Figura 11: Imagens obtidas do efeito de F4 em diferentes tempos – sobre a membrana corioalantoide 50
Figura 12: Imagens obtidas do efeito da solução fisiológica (cloreto de sódio – NaCl – a 0,9% p/v) - controle negativo - em diferentes tempos – sobre a membrana corioalantoide 50
Figura 13: Imagens obtidas do efeito da dispersão de SDS (1,0% p/v) – controle positivo - em diferentes tempos – sobre a membrana corioalantoide. 51
Figura 14: Avaliação da eficácia fotoprotetora das formulações F3 (sem EVM) e F4 (EVM – 5,0% p/p) 52
Figura 15: Perfil de Hidratação – Formulações Fotoprotetoras com e sem EVM (5,0%) 55

RELAÇÃO DAS EQUAÇÕES

Equação 1: Porcentagem de redução da molécula de DPPH• por substâncias antioxidantes 29
Equação 2: Fator de proteção solar *in vitro* (FPS estimado) 30
Equação 3: Comprimento de onda crítico *in vitro* 30
Equação 4: Índice de irritação ocular 31
Equação 5: Fator de proteção solar *in vivo* 34

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) da emulsão dermocosmética base para incorporação da substância bioativa 22
Tabela 2: Concentração de EVM (% p/p) adicionado à emulsão dermocosmética base 23
Tabela 3: Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) dos filtros solares na emulsão dermocosmética antissolar 24
Tabela 4: Concentração de EVM (% p/p) adicionada à emulsão dermocosmética antissolar..... 25
Tabela 5: Avaliação das características organolépticas das emulsões dermocosméticas submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar 39
Tabela 6: Características organolépticas e físico-química das formulações ... 40
Tabela 7: Atividade Antioxidante do EVM em diferentes concentrações..... 44
Tabela 8: Valores de FPS *in vitro* e comprimento de onda crítico das formulações (F1, F2, F3 e F4) 46
Tabela 9: Classificação do potencial de irritação ocular – Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane method (HET-CAM) da formulação F4 51

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1: Matérias primas utilizadas nesta pesquisa 21
Quadro 2: Classificação do potencial de irritação ocular..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS

λ crit	-	Comprimento de onda crítico
Abs	-	Absorbância
ANT	-	Antocianina
A/O	-	Água em óleo
CAM	-	Chorioallantoic Membrane
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	-	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DEM	-	Dose Eritematógena Mínima
DEMnp	-	Dose Eritematógena Mínima em Pele Não Protegida
DEMp	-	Dose Eritematógena Mínima em Pele Protegida
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEP	-	Estudo de Estabilidade Preliminar
EROs	-	Espécies reativas de oxigênio
EVM	-	Extrato liofilizado de *Vaccinum mirtyllus* L.
FDA	-	Food and Drug Administration
FPS	-	Fator de Proteção Solar
ICCVAM	-	Interagency Coordinating Commitee on Validation of Alternative Methods
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
INCI	-	International Nomenclature of Cosmetic Ingredient
IS	-	Índice de irritação ocular
IV	-	Radiação infravermelha
HET-CAM	-	Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane
MBBT	-	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutyl phenol – Tinosorb®M
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NIEHS	-	National Institute of Environmental Health Sciences - NIEHS,

		2006
nm		Nanômetros
O/A	-	Óleo em água
PABA	-	Ácido *p*–amino benzoico
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PMMA	-	Polimetilmetacrilato
RUV	-	Radiação ultravioleta
SDS	-	Dodecilsulfato de sódio
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TiO_2	-	Dióxido de titânio
UV	-	Ultravioleta
UVA-PF	-	Fator de Proteção UVA
VIS	-	Radiação visível
ZnO	-	Óxido de zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....i
ABSTRACT ii
RELAÇÃO DE FIGURAS iii
RELAÇÃO DE EQUAÇÕES.....iv
RELAÇÃO DE TABELAS v
RELAÇÃO DE QUADROS vi
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS.....vii
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. Radiação Ultravioleta 5
2.2. Proteção Solar..... 6
2.2.1 Filtros Solares Orgânicos 7
2.2.2 Filtros Solares Inorgânicos 8
2.2.3 Filtros Solares de Amplo Espectro 9
2.3. Antioxidantes..... 10
2.3.1 Substâncias Bioativas 10
2.3.1.1 Flavonoides 11
2.3.1.1.2 Antocianinas 13
2.3.1.2 *Vaccinium myrtillus* L. (Mirtilo) 15
3. OBJETIVOS 17
4. MATERIAL E MÉTODOS 19
4.1. Material..... 20
4.1.1 Equipamentos 20
4.1.2 Reagentes e Solventes 20
4.1.3 Matérias-primas..... 20
4.2. Métodos..... 22
4.2.1 Preparo de emulsões dermocosméticas contendo ou não filtros solares e substâncias bioativas..... 22
4.2.2 Estudo de Estabilidade Preliminar (EEP) 26
4.2.2.1 Teste de centrifugação 26
4.2.2.2 Teste de estresse térmico 26
4.2.2.3 Caracterização físico-química 27

4.2.2.4 Determinação do Valor de pH 27
4.2.2.5 Determinação das Propriedades Organolépticas 27
4.2.3 Caracterização Funcional *in vitro* 27
4.2.3.1 Atividade antioxidante do EVM *in vitro* 27
4.2.3.2 Atividade fotoprotetora *in vitro* 29
4.2.3.3 Avaliação *in vitro* da fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras 30
4.2.3.4 Avaliação do potencial de irritação ocular *in vitro* pelo método - Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) 31
4.2.4 Ensaios clínicos 32
4.2.4.1 Ensaios *in vivo* – aspectos legais e éticos 32
4.2.4.2 Avaliação da Eficácia Fotoprotetora (FPS) 33
4.2.4.3 Avaliação da hidratação superficial da pele 34
4.2.5 Análise estatística dos resultados 35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
5.1 Preparo e estabilidade preliminar das emulsões dermocosméticas 36
5.2 Caracterização físico-química das formulações dermocosméticas antis-solares contendo ou não EVM 39
5.3 Atividade Antioxidante do Extrato de *Vaccinium Myrtillus* L 43
5.4 Atividade fotoprotetora *in vitro*: fator de proteção solar (FPS) e fotoestabilidade 45
5.5 Avaliação do potencial de irritação ocular 49
5.6 Avaliação da eficácia fotoprotetora 52
5.7 Hidratação superficial da pele 54
6. CONCLUSÕES 56
7. REFERÊNCIAS 58
8. ANEXOS 72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em função da conscientização quanto à necessidade de proteção da pele para prevenção dos efeitos deletérios provocados pela radiação ultravioleta (UV), como eritema, fotoenvelhecimento, câncer e imunossupressão, devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO´s), há a necessidade de avanços na pesquisa e desenvolvimento de fotoprotetores que possibilitem proteção espectral completa e que sejam seguros e eficazes. Esses produtos para proteção solar, devem garantir amplo espectro de proteção e, visando essas propriedades, conter em sua composição filtros solares químicos (orgânicos), físico (inorgânico) ou uma associação de ambos, além de apresentar fotoestabilidade e absorver e/ou refletir as radiações UVA e UVB (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

O uso de protetores solares de amplo espectro e que apresentem reduzidas concentrações de filtros solares químicos, comparado aos existentes no mercado, evitaria o risco iminente de permeação cutânea dessas substâncias químicas e, por conseguinte o aparecimento de eventos adversos (FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007; JANSEN et al., 2013).

As formulações antissolares fotoinstáveis podem levar à formação de compostos intermediários reativos, exacerbando o risco de provocar reações adversas não esperadas como dermatite de contato e reações fototóxicas na pele. A comunidade científica empenha-se na busca por métodos alternativos à experimentação animal para comprovar a segurança e evitar o aparecimento dos efeitos não desejáveis dos produtos, como o ensaio Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane method (HET-CAM) que utiliza ovo de galinha embrionado e os resultados são comparados àqueles obtidos no teste de Draize *in vivo* (ALLTOX, 2016).

Visando ampliar o desempenho, eficácia e a segurança da fotoproteção, os bioativos são promissores por apresentarem propriedades antioxidantes (HABÁNOVÁ et al., 2013), podendo atuar em sinergismo com os fotoprotetores ao minimizar os efeitos prejudiciais da radiação solar na pele e, simultaneamente, reduzir os danos decorrentes da formação das ERO´s, possibilitando assim, a diminuição das concentrações dos filtros solares sintéticos, sem alteração da eficácia (LOPES et al., 2007).

Dentre as substâncias bioativas, o Extrato de Vaccinum Mirtyllus L. (EVM - mirtilo) é considerado como fonte rica em fitonutrientes que apresentam características antioxidantes, antiinflamatórias e protetoras frente à radiação ultravioleta (KUSKOSKI et al., 2004).

O mirtilo possui alto teor de polifenóis, principalmente de antocianinas (SILVEIRA, VARGAS; ROSA, 2007) fitoquímicos que fazem parte da classe dos flavonoides e reconhecidos pelo potencial fotoprotetor (BOBIN; RAYMOND, MARTINI, 1995). As antocianinas são pigmentos solúveis em água, que apresentam atividade antioxidante, possuem cromóforos e anéis aromáticos capazes de absorver a luz na região do visível (CRETU; MORLOCK, 2014; FREITAS, 2005).

No presente estudo buscou-se investigar a segurança e eficácia fotoprotetora clínica de protetores solares contendo EVM associado a três filtros solares com características complementares para a fotoproteção de amplo espectro, a saber, octocrileno (filtro orgânico - fotoprotetor UVB), Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutyl phenol (filtro de amplo espectro – fotoprotetor UVA) e Dióxido de Titânio (filtro inorgânico – fotoprotetor UVA/UVB). A atividade antioxidante do mirtilo foi avaliada *in vitro*, o fator de proteção solar in *vitro* (FPS) e a fotoestabilidade das formulações foram avaliadas por espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração. O perfil de segurança foi determinado pelo método *in vitro* Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM), a eficácia da proteção solar *in vivo* (FPS) e a hidratação superficial da pele foi determinada por meio da eficácia clínica.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radiação Ultravioleta

A quantidade de radiação ultravioleta (UV) que atinge a Terra aumentou acentuadamente nos últimos anos e os efeitos prejudiciais acontecem mesmo com tempo de exposição curto à radiação solar (JANSEN et al., 2013). Os danos agudos observados podem ser eritemas, queimaduras, fotossensibilidade induzida por medicamentos e há provas irrefutáveis de que a exposição da pele à radiação UV, promove o desenvolvimento prematuro do fotoenvelhecimento cutâneo e, eventualmente, a neoplasia (ICHIHASHI et al., 2009).

O câncer de pele figura como o mais frequente na população mundial e o fator de risco principal a excessiva exposição à radiação solar. No Brasil, no ano de 2016, foram estimados 175.760 novos casos de câncer de pele não-melanoma para os homens e, 94.910, para mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 81,66 novos casos a cada 100 mil homens e 91,98 para cada 100 mil mulheres. Observando-se um aumento no risco de apresentar a doença de mais de 8,0% para os homens e 9,0% para as mulheres (INCA, 2017).

O espectro solar terrestre encontra-se distribuído como segue: a luz visível ou branca, a radiação UV e a radiação infravermelha (IV).

A radiação UV está subdividida em radiação UVA (320 – 400nm), que pode ser classificada em UVA I (340 – 400nm) e UVA II (320 – 340nm) – responsáveis pela pigmentação imediata de curta duração; radiação UVB (290 – 320nm) – responsável pelo bronzeamento indireto e tardio; e radiação UVC (100 – 290nm) absorvida pela atmosfera (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008; CORREA, 2012).

A radiação UVA está relacionada ao fotoenvelhecimento, formação de espécies reativas de oxigênio e fotodermatoses, sendo responsável pela pigmentação da pele. Atinge a derme profunda, tornando-se o principal fator responsável pelos processos degenerativos, mutações, fotossensibilização, podendo ter como resultado no aparecimento de câncer (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). A radiação UVB possui menor penetração através da pele, mas seus efeitos são extremamente nocivos e imediatos; induz o eritema,

queimadura e provoca danos diretamente no DNA devido à formação de dímeros de piridina, além de queimaduras, câncer de pele e catarata (PINNELL, 2003).

Apesar da radiação UVB ser o principal agente etiológico responsável pelo desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer de pele (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008), a radiação UVA pode provocar danos de forma indireta no DNA. Esses danos podem ser observados por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SAMBANDAN; RATNER, 2011) e atuam sinergicamente com UVB, promovendo alterações biológicas significativas, como ressecamento da pele, formação de rugas e aumento do risco de neoplasias cutâneas (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

A comunidade médica orienta sobre a necessidade da utilização diária de produtos que contenham compostos ativos com a finalidade de proteção solar e que promovam adequada proteção da pele em toda faixa de radiação UVA e UVB (NISHIKAWA, 2012). Esse tipo de proteção, com a utilização de protetores solares, é a principal abordagem para prevenção de danos causados à pele, pela exposição excessiva à radiação solar (ICHIHASHI et al., 2009).

2.2 Proteção Solar

Os protetores solares têm como finalidade proteger a pele das radiações UVA e UVB, sendo fator chave na prevenção do câncer de pele e do fotoenvelhecimento (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008), que consiste numa medida profilática para evitar o acúmulo das alterações cutâneas resultantes da exposição ao sol (CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2011).

Protetores solares são preparações cosméticas desenvolvidas em diversas formas como bastões, géis oleosos, emulsões água em óleo (A/O) e emulsões óleo em água (O/A), as quais apresentam maior proteção (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). As formulações de fotoprotetores podem ser compostas por filtros inorgânicos (físicos), que refletem a radiação UVA e UVB, ou por filtros orgânicos (absorvedores químicos), que absorvem a UVA e UVB ou ambos para potencializar o fator de proteção solar (FPS) obtido. São moléculas ou complexos moleculares que absorvem, refletem ou dispersam a radiação UV, evitando danos à molécula de DNA (BALOGH et al., 2011).

Os produtos naturais que contém grupamentos cromóforos e anéis aromáticos como os flavonoides, carotenoides, xantinas, ácido ascórbico e ácido hidroxicinâmicos, são empregados nas formulações fotoprotetoras devido às propriedades antioxidantes, minimizando os efeitos deletérios provocados pelas espécies reativas de oxigênio (PARK; LEE, 2008; SARAF; KAUR, 2010). Esses efeitos protetores foram comprovados no mirtilo, que por apresentar atividade antioxidante, representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de protetores solares multifuncionais (CALÒ; MARABINI, 2014).

2.2.1 Filtros Solares Orgânicos

Os filtros químicos ou orgânicos são compostos aromáticos conjugados, contém grupamentos aceptores e doadores de elétrons, que, por meio de ressonância, absorvem a radiação UV, transformando-as em radiação com menor energia e seu excesso é dissipado na forma de calor, sendo assim, menos deletéria ao organismo (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

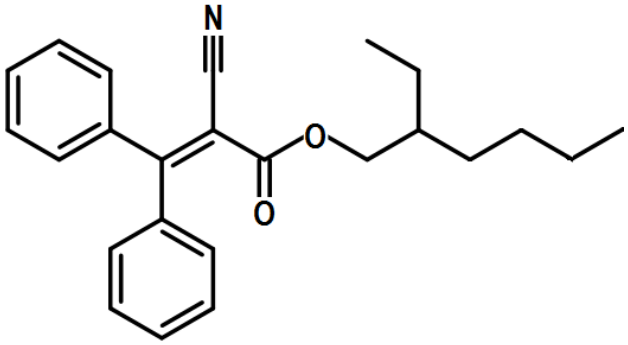
Os filtros orgânicos são classificados de acordo com a sua capacidade filtrante, a saber, UVA, UVB e de amplo espectro (UVA e UVB) (SCHALKA; ADDOR, 2008). São Moléculas que exercem proteção frente à radiação UVA (benzofenonas, avobenzona), radiação UVB (ácido *p*-aminobenzóico - PABA e seus derivados, cinamatos, salicilatos e octocrileno) e amplo espectro, que promovem proteção contra radiação UVB e UVA (CORREA, 2012; PALM; O'DONOGUE, 2007).

Visando a proteção de amplo espectro, diversos produtos utilizam combinações de diferentes filtros solares para ampliar a eficácia dos fotoprotetores (BALOGH et al., 2011), essa estratégia otimiza a fotoestabilidade dos filtros orgânicos, evitando a fotoinstabilidade durante à exposição solar, mantendo a eficácia da fotoproteção e evitando reações de fotosensibilização na pele. (JANSEN et al., 2013).

O octocrileno (2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilexila), de acordo com a **Figura 1**, é um filtro fotoestável e apresenta um espectro de ação de 290-360nm, com pico de absorção a 307nm. A substância possui excelente perfil de segurança (baixa irritabilidade, fototoxicidade e potencial fotoalérgico). É considerado, nos

Estados Unidos, o melhor agente fotoestabilizante para filtros solares, como a avobenzona (NASH, 2006).

Figura 1: Estrutura química do octocrileno



Fonte: Elaborado pela autora

2.2.2 Filtros Solares Inorgânicos

Os filtros inorgânicos são óxidos metálicos, insolúveis em água ou substâncias graxas e protegem a pele por reflexão ou espalhamento da radiação UV. Tais filtros atuam formando uma barreira sobre a pele, capaz de refletir e dispersar a radiação UV. O dióxido de titânio (TiO2) e o óxido de zinco (ZnO) são exemplos de filtros inorgânicos, que possuem alto índice de refração da radiação e são os responsáveis pela opacidade e coloração branca dos fotoprotetores (CORREA, 2012; SAMBANDAN; RATNER, 2011). O TiO2 é o filtro inorgânico mais utilizado em formulações para proteção, pois é um pigmento branco que não provoca fotosensibilização, porém forma uma película branca na pele, pouco estética e pouco desejável pelo consumidor (CORREA, 2012). Esse residual está relacionado ao TiO2 apresentar índice refrativo de 2,6, explicando assim, a aparência branca quando aplicado na pele (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

As formulações contendo TiO2 e ZnO, quando comparadas às que contém apenas filtros orgânicos, apresentam residual branco observado tanto imediatamente quanto após 30 minutos da aplicação e sendo pouco apreciadas pelos usuários de fotoprotetor (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

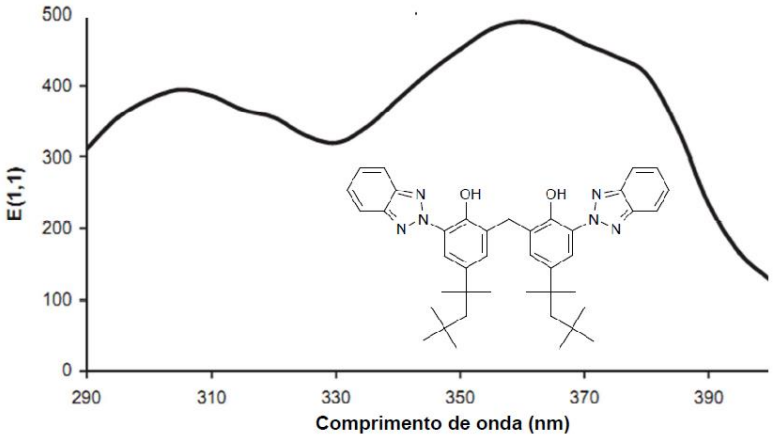
No início dos anos 1990 novas apresentações de filtros inorgânicos foram desenvolvidas como TiO2 e ZnO micronizados (BALOGH et al., 2011), minimizando o residual branco observado na pele quando efetuada a aplicação de formulações contendo os citados materiais (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007).

Lima e Serra (2013) sintetizaram e caracterizaram o fosfato de cério (CePO4), que possui atividade fotoprotetora e vantagens sobre o TiO2 e o ZnO como menor atividade catalítica, menor reflexão na visível e maior absorção UV. O CePO4 apresenta baixo índice refrativo, propriedade que confere ao mesmo e às formulações que os contém, a capacidade de difundir a luz com menor eficiência, apresentando assim, residual branco semelhante aos fotoprotetores que contém somente os filtros orgânicos (LIMA; SERRA, 2013).

2.2.3 Filtros Solares de Amplo Espectro

O Tinosorb® M (methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol - MBBT) é um filtro fotoestável que apresenta associação de filtros orgânicos e inorgânicos (ANTONIOU et al., 2008). Possui espectro de ação que abrange até UVA I (340 – 400nm), com pico de absorção a 388nm conforme **Figura 2**. Apresenta-se na forma de dispersão aquosa de micropartículas orgânicas (0,07 - 0,40µm) e comportam-se como micropigmentos, que absorvem a radiação UV e são capazes de refleti-las e dispersá-las (CORREA, 2012; LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007).

Figura 2: Espectro de absorção e Estrutura química do MBBT (TUCHINDA et al., 2006)



As formulações fotoprotetoras que protegem contra o UVA e UVB contém oxibenzona, metoxicinamato de octila, dentre outros filtros orgânicos. Esta escolha dá-se pelo fato desses não apresentarem residual branco quando aplicados na superfície da pele, sendo um excelente apelo cosmético (RAI; SHANMUGA; SRINIVAS, 2012), entretanto, os filtros solares orgânicos podem interagir com as moléculas da pele e provocar efeitos adversos, causando fotosensibilização ou dermatite de contato (DROMGOOLE; MAIBACH, 1990).

Visando obter proteção solar de amplo espectro, faz-se necessária a associação de filtros UVA e UVB (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Ademais, é fundamental para a garantia da eficácia dos protetores solares que estes sejam fotoestáveis e permaneçam assim, durante o período de exposição à radiação.

A associação sinérgica de substâncias de origem natural que possuem atividade antioxidante (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013) promove melhor estabilidade para o produto, contribui para a eficácia fotoprotetora e colabora para diminuir a probabilidade de sensibilização cutânea, como os efeitos adversos dos produtos (KRAUSE et al., 2012). A associação destes componentes em uma formulação representa a atualidade dos fotoprotetores (PERES et al., 2017), podendo ser denominados multifuncionais, devido à sinergia entre a atividade fotoprotetora e as características antioxidantes (MANSUR et al., 2016; CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2011).

2.3 Antioxidantes

2.3.1 Substâncias Bioativas

Considerando inúmeras atividades biológicas atribuídas às substâncias oriundas da natureza, as mesmas vêm recebendo maior atenção por parte dos pesquisadores e das empresas que produzem cosméticos (POLONINI et al., 2014). Os extratos das plantas que possuem atividades antioxidantes, apresentam várias ações na proteção cutânea, evitam os danos provocados pela radiação ultravioleta, incluindo a inibição da formação dos radicais livres, responsáveis pelo envelhecimento cutâneo e desenvolvimento do câncer (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

Os extratos vegetais possuem grande complexidade química o que dificulta denominar e quantificar as substâncias específicas responsáveis pela ação fotoprotetora (SILVA et al., 2013). Alguns fitoquímicos que possuem atividade fotoprotetora e as suas respectivas plantas já foram documentados, como os polifenóis presentes na *Camellia sinensis* L. (chá verde) e na *Vitis vinifera* L. (uvas) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; YILMAZ; TOLEDO, 2004;).

Os protetores solares que contém produtos naturais são um desafio para a Cosmetologia no que se refere à estabilidade e a qualidade desses protetores (GUARATINI et al., 2009). A avaliação quanto à eficácia, segurança e estabilidade dessas formulações faz–se necessária para garantir a qualidade do produto, desde a fabricação até expirar o prazo de validade (ANVISA, 2004).

A literatura demonstra potentes propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos (SOUZA; CAMPOS; PACKER, 2013), ação fotoprotetora dos flavonoides (rutina e quercetina) quando aplicadas topicamente (NISHIKAWA, 2012) e apresentam efeito sinérgico quando associado aos filtros orgânicos e inorgânicos. Essa associação intensificaria a proteção e/ou neutralizaria os radicais livres produzidos na pele, durante e após exposição à radiação UV (SOUZA; CAMPOS; PACKER, 2013).

Os compostos fenólicos são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos, e os flavonoides, os que possuem atividade anti radicais livres potencializada (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Devido à similaridade estrutural dos flavonoides com os filtros solares orgânicos e semelhança dos espectros de absorção da radiação UV, esses compostos bioativos apresentam potencial para exercerem atividade fotoprotetora (VELASCO et al., 2011).

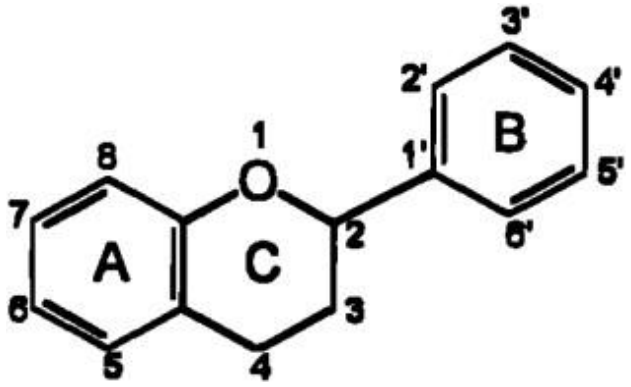
2.3.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são compostos que possuem estruturas aromáticas encontrados naturalmente nas plantas (frutas e flores) e são classificados como metabólitos secundários. Possuem importante ação antioxidante contra os efeitos danosos provocados pela radiação solar e poluição ambiental, entre outros (MARTÍNEZ-FLORES, 2002). Atuam principalmente por meio de suas propriedades de óxido-redução, absorvem e neutralizam os radicais livres, quelando o oxigênio

triplete, singlete e decompondo os peróxidos (ZHENG; WANG, 2003). São os compostos fenólicos de maior interesse, devido aos seus efeitos protetores, para prevenção de doenças, como, por exemplo, o câncer (CALÒ, R., MARABINI, L. 2014).

O grupo de moléculas dos flavonoides apresenta uma estrutura comum, um heterociclo oxigenado, composto por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio, formando o núcleo flavano, como ilustrado na **Figura 3**. São compostos polifenólicos e constituem substâncias com 15 átomos de carbono. Apresentam o esqueleto difenilpropano ($C_6C_3C_6$), com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano.

Figura 3: Estrutura básica de um flavonoide (PIETTA, 2000)



O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C determinam as classes de flavonoides. O padrão de substituição nos anéis A e B definem os compostos específicos (BRAVO, 1998). Os flavonoides podem ser divididos em 14 classes e os seis grupos que estão presentes na dieta humana são: flavanóis (frutas e flores), flavonóis (vegetais e frutas), flavonas (frutas cítricas e cereais), antocianinas (flores e frutas – mirtilo), isoflavonoides (soja) e flavononas (frutas cítricas) (YILMAZ; TOLEDO, 2004; WALLE, 2004).

Os flavonoides possuem características essencias para atuar na fotoproteção. Os filtros solares de amplo espectro devem absorvem a radiação compreendida entre 290-320 (UVB) e 320-400 (UVA) (BOBIN; RAYMOND; MARTINI, 1995) e os flavonoides apresentam potencial para absorção da radiação UV em dois picos de

absorção distintos, no comprimento de onda entre 240-280nm e 300-550nm, o que ratifica a sua aplicação em formulações de protetores solares. Segundo Velasco e colaboradores (2008) os flavonoides não apresentam tendência à absorção cutânea, assim a atividade seria exercida na superfície da pele, característica que otimiza a fotoproteção

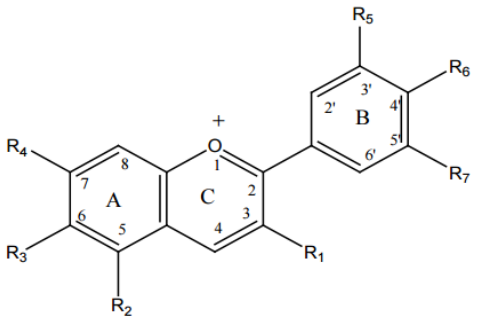
2.3.1.1.2 Antocianinas

O termo antocianina é de origem grega (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro) (HARBORNE; WILLIAMS, 2000), são responsáveis pelas cores vermelha, rosa, roxa e azul nos vegetais. As antocianinas estruturalmente são consideradas flavonoides, pois possuem o esqueleto carbônico $C_6C_3C_6$, contendo o cation flavilium (2-fenilbenzopirilium) (FEILD; LEE; HOLBROOK, 2001) e são divididas em antocianinas, antoxantinas e protoantocianidinas, porém diferem dos outros flavonoides pela absorção de radiação na região visível do espectro, apresentando-se em grande variedade de cores (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011).

Na natureza, as antocianinas ocorrem glicosiladas, sendo que as agliconas são conhecidas como antocianidinas.

A estrutura química das antocianinas é baseada em um esqueleto policíclico de quinze carbonos, no qual cada composto antociânico é caracterizado pelos diferentes grupos ligados “R”, conforme **Figura 4**.

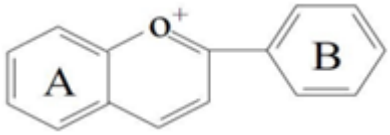
Figura 4: Estrutura química básica das antocianinas (LÓPEZ; JIMÉNEZ; VARGAS, 2000)



Possuem o cátion flavilium (**Figura 5**) em sua estrutura e um açúcar ligado na posição C-3, que pode estar ou não acilado, e o outro açúcar ocupa a posição C-5.

Os açúcares são, principalmente, os monossacarídeos glicose, galactose, ramnose e arabinose (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

Figura 5: Cátion flavilium (BOBBIO; BOBBIO,1995)



As antocianinas possuem grupos cromóforos, sensíveis às alterações de valor de pH (ANDERSEN; CABRITA; FOSSEN, 1998). O espectro de cor das antocianinas situa-se entre a vermelha e a azul e apresenta uma mistura de ambas, resultando em tons de púrpura (BROUILLARD, 1983). O meio de maior estabilidade é sob condições ácidas; em pH abaixo de 3, as antocianinas apresentam coloração vermelha, na faixa de pH entre 4 a 5, tornam-se translúcidos pelo motivo do cátion flavilium sofrer conversão à base carbinol; em valores superiores a 6, a coloração torna-se lilás, devido à presença da base quinoidal e, em meio básico, apresenta coloração azul escura (LIMA; MELO; LIMA, 2005).

As antocianinas são moléculas polares e constituem um grupo de pigmentos solúveis em água (VIGHERA; BRIDLE, 1999), responsáveis pela maioria das cores de flores, frutas e vegetais. Os frutos considerados ricos em antocianinas são intensamente coloridos, com suas cores variando principalmente entre o roxo e roxo muito escuro (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

As funções desempenhadas pelo grupo das antocianinas são abrangentes, pois apresentam múltiplos padrões de substituição na sua molécula. Destacam-se a proteção à luz, mecanismo de defesa e propriedades antioxidantes (LOPES et al., 2007); ademais, são responsáveis pela prevenção de várias doenças (KUSKOSKI et al., 2004). Segundo Narayan e colaboradores 1999, as antocianinas são potentes antioxidantes quando comparadas aos antioxidantes clássicos, como butilato hidroxi anisol, butilato hidroxi tolueno e alfa tocoferol (vitamina E).

As antocianinas encontradas em alimentos são derivadas das agliconas pertencentes aos seguintes pigmentos básicos: malvidina, delfinidina, petunidina, peonidina, cianidina e pelargonidina, as quais diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e ao grau de metoxilas presentes no anel B (LIMA et al., 2006). São

oxidadas na presença de radicais livres, gerando um radical menos reativo e mais estável, estabilizando as espécies reativas de oxigênio por meio de sua reação com o componente reativo do radical; esse fato acontece devido ao alto poder de reação do grupo hidroxila das antocianinas com o radical torna-o inativo (NIJVELDT et al., 2001). Assim, a importância do grupo hidroxilas para a elevada capacidade antioxidante das antocianinas, como, por exemplo, delfinidinas e cianidinas (KUSKOSKI et al., 2004).

As diferentes funções comprovadas das antocianinas, encontram-se diretamente relacionadas com sua diversidade estrutural. Possuem propriedades antioxidantes e absorvem no intervalo de comprimento entre 400 a 600nm, demonstrando ação fotoprotetora (BORDIGNON et al., 2009).

2.3.1.2 *Vaccinium myrtillus* L. (Mirtilo)

O mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) (**Figura 6**) também conhecido como blueberry (inglês) e arándano (espanhol), é um fruto de clima temperado pertencente à família Ericaceae e ao gênero Vaccinium (RASEIRA; ANTUNES, 2004). É um fruto tipo baga, de formato achatado e coloração azul intenso. Espécie nativa do hemisfério norte e europa, que tem seu cultivo em franca expansão em países da América do Sul. No Brasil, o Rio Grande do Sul é o estado que mais produz o fruto, quase 50% da safra nacional (FACHINELLO et al., 2011).

Figura 6: Frutos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.)

Fonte: http://gettyimages.com

Entre as pequenas frutas, citando o morango, amora-preta, framboesa e groselha, entre outras (ANTUNES, 2002), o mirtilo destaca-se por sua elevada concentração de compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonoides, tanto na casca quanto na polpa, (ZHENG; WANG, 2003; WU et al., 2008) e comprovada atividade antioxidante (ZHENG; WANG, 2003), associada ao seu conteúdo de antocianinas (KECHINSKI et al., 2010) e a intensidade da cor dos frutos, pois quanto mais escuro, tendendo ao azul escuro (como o mirtilo), maior é o teor de antocianinas (VEBERIC et al., 2015).

O mirtilo possui as antocianinas malvidina-3-O-galactosídeo, petunidina-3-O-galactosídeo, delfinidina-3-O-galactosídeo e mais a cianidina e peonidina glicosiladas com galactose, glucose e arabinose para formar 15 antocianinas diferentes (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003). Zheng e Wang, identificaram no extrato de Vaccinium myrtillus L. as antocianinas delfinidinas-3-glicosídeo, delfinidina-3-arabinosídeo, cianidinas-3-arabnosídeo, cianidinas-3-galactosídeo, cianidinas-3-glicosídeo, cianidinas-3-xilosídeo (ZHENG; WANG, 2003).

Devido às propriedades atribuídas às antocianinas presentes no *Vaccinium myrtillus* L., como ação antioxidante e fotoprotetora (LOPES et al., 2007), justifica-se a aplicação do bioativo em produtos que protejam a pele dos efeitos deletérios provocados pela radiação UV.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O projeto contemplou o preparo, a caracterização físico-química e funcional (eficácia *in vitro* e clínica) de formulações dermocosméticas fotoprotetoras multifuncionais acrescidas do extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), na concentração de 5,0% (p/p).

Os objetivos específicos foram:

- preparo e avaliação da estabilidade preliminar e normal de formulações dermocosméticas fotoprotetoras multifuncionais contendo octocrileno (filtro solar UVB), MBBT benzotriazol (filtro solar de amplo espectro), dióxido de titânio (filtro solar inorgânico) e extrato dos frutos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), associados ou não;
- determinação das características organolépticas e físico-química das formulações;
- avaliação funcional do EVM por meio da verificação da atividade antioxidante *in vitro*;
- avaliação funcional das formulações por meio da verificação da eficácia fotoprotetora *in vitro* em espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração;
- avaliação do perfil de segurança empregando o método do potencial de irritação ocular *in vitro* HET-CAM.
- determinação da eficácia clínica da formulação fotoprotetora por meio da obtenção do FPS e da hidratação superficial da pele.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

Agitador mecânico digital RW 20n IKA®; Balança analítica AUY220 Shimadzu®; Balanças semianalíticas BG 4000 Gehaka® e ARD 110 OHAUS®; Banho termostatizado N480 Nova Ética®; Banho ultrassônico Ultrasonic Clean 1600 Unique®; Câmera Dino-Lite®, modelo AM-211; Centrífuga RX2 Hitachi®; Chapa aquecedora 208-D Nova Ética®; Corneometer® MPA 580 (Multi Probe Adapter – Courage & Khazaka); Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração UV 2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer* Labsphere® equipado com programa UV-2000S; Espectrofotômetro UV-VIS Evolution® 600 (Thermo Scientific®) com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm; Incubadora de ovos, com controle de umidade e temperatura (Chocmaster®); Peagômetro Q400AS (Quimis®); Placas de polimetilmetacrilato (PMMA) HD 6 Helioplate HelioScreen®; Refrigerador Frost Free 60 Consul®; Simulador solar - Câmara de fotoestabilidade CPS+ (Atlas Suntest®); Sistema purificador de água Simplicity UV (Merck Millipore® Mili-Q®); Simulador solar UVA Mini (ProLumina®); Simulador solar UVB Solar Light Co. Inc. (Multiport® 601); Termômetro digital JProlab®; Vidro de relógio.

4.1.2 Reagentes e Solventes - Grau de pureza analítico (PA)

DPPH (2,2-Difenil-1-picrilidrazila) (Sigma - Aldrich®).

Metanol (Merck®).

Água purificada.

4.1.3 Matérias-primas (Grau de pureza farmacêutico), outros ingredientes (INCI*: International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) e materiais

Bilberry® P.E. – Extrato de *Vaccinium myrtillus* L. (ActivePharmaceutica®):

Denominação INCI: *Vaccinium Myrtillus* Fruit Extract

Lote: HK140413-A

Prazo de validade: abril de 2017

De acordo com o certificado de análise nº87/14, s.d. (ActivePharmaceutica®) o produto apresenta as seguintes características:

Aspecto: pó fino roxo escuro com odor e sabor característicos

Perda por dessecação: 3,22%

Teor de Antocianidinas: 25,02% (UV-VIS)

Solúvel em água (USP 36)

- Ovos de galinha galados (granja Irineu Salviato – Porto Feliz – São Paulo)
- As matérias-primas empregadas no preparo das formulações dermocosméticas antissolares ou não, estão descritas no **Quadro 1** e apresentaram grau de pureza cosmético ou farmacêutico.

Quadro 1: Matérias-primas utilizadas nesta pesquisa

Matéria-prima (nome químico ou comercial)	**Nomenclatura INCI**	**Fornecedor**
Adipato de butila	*Dibutyl adipate*	Biotec®
Bilberry® P.E.	*Vaccinium myrtillus Fruit Extract*	ActivePharmaceutica®
Ciclopentassiloxano	*Cyclomethicone*	PharmaSpecial®
Conserv® NE	*Phenoxyethanol, 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-One*	Biovital®
Crospolímero de dimeticona	*Cyclomethicone, dimethicone crosspolymer*	Fagron®
Dióxido de Titânio	*Titanium dioxide*	Fagron®
EDTA dissódico	*Disodium EDTA*	PharmaSpecial®
Hidróxido de sódio	*Sodium hydroxide*	Henrifarma®
Lipomulse® Luxe AE	*Cetearyl Alcoho, Glyceryl Stearate, PEG-40 Stearate, Ceteareth-20*	Vantage®
Octocrileno	*Octocrylene*	Fagron®
Olivem® 1000	*Cetearyl Olivate, Sorbitan Olivate*	B&T Company®
Propilenoglicol	*Propylene glycol*	Mapric®
Polymol® 812	*Caprylic/capric triglyceride*	Biotec®
Tinosorb® M	*Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutyl phenol*	Fagron®

Legenda: Nomenclatura conforme INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient)*

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo de emulsões dermocosméticas contendo ou não filtros solares e substância bioativa

O presente estudo contemplou a preparação de quatro sistemas emulsionados do tipo óleo em água (O/A): A) Formulação F1- emulsão dermocosmética base; B) Formulação F2 – emulsão dermocosmética base acrescida de EVM 5,0% (p/p); C) Formulação F3 – emulsão dermocosmética antissolar; D) Formulação F4 – emulsão dermocosmética antissolar acrescida de EVM 5,0% (p/p).

A. Preparo da emulsão dermocosmética base - (F1)

A **Tabela 1** descreve a composição e as proporções (% p/p) da emulsão dermocosmética base utilizada neste estudo, na qual foram adicionados os filtros solares e o EVM.

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) da emulsão dermocosmética base para incorporação da substância bioativa

Composição (nome químico e/ou comercial)	**Proporção (%p/p)**	**Função** (Brandão, 2009)
Adipato de butila	3,0	Emoliente
Água purificada	82,0	Veículo
Ciclopentassiloxano	1,5	Emoliente (Formador de filme)
Fenoxietanol / 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (Conserv® NE)	0,3	Conservante
Crospolímero de dimeticona	1,0	Espessante (Formador de filme)
EDTA dissódico	0,3	Sequestrante
Cetearyl Alcohol / Glyceryl Stearate / PEG-40 Stearate / Ceteareth-20 (Lipomulse® Luxe AE)	5,0	Base autoemulsionante
Cetearyl Olivate / Sorbitan Olivate (Olivem® 1000)	3,0	Co-emulsionante e Doador de Consistência
Triglicérides dos ácidos caprico/caprilico (Polymol® 812)	3,0	Emoliente
Propilenoglicol	3,0	Umectante

Os compostos Olivem® 1000, Polymol® 812, adipato de butila e Lipomulse® Luxe AE (fase óleo da emulsão), foram pesados e transferidos para um béquer e, em seguida, aquecidas até a temperatura de 75°C.

Propilenoglicol, EDTA dissódico e a água purificada (fase água da emulsão), foram pesados, transferidos para outro béquer e aquecidos à temperatura de 75 °C. Verteu-se a fase aquosa sobre a fase óleo, sob agitação mecânica (hélice modelo *dissolver*) com velocidade de 1500 rpm. A agitação foi mantida por 10 minutos. Após diminui-se a velocidade de agitação para 1000 rpm, até a mistura atingir 45°C.

Adicionou-se o Conserv® NE e homogeneizou-se a formulação. Os silicones foram pesados e dispersos, sob agitação manual e auxílio de bastão de vidro, até completa homogeneização da mistura. Sob agitação mecânica (hélice modelo *dissolver*) e velocidade de 1000 rpm, incorporou-se a dispersão de silicones à emulsão e manteve-se a agitação até completa homogeneização dos componentes. Ao final da mistura, o valor de pH do sistema foi ajustado para 6,5 com solução de hidróxido de sódio 30% (p/p).

B. Preparo da emulsão dermocosmética base acrescida de EVM 5,0% (p/p) - (F2)

A **Tabela 2** descreve a proporção (% p/p) de EVM adicionado à emulsão dermocosmética base (F1). Após 24 horas de repouso, foi incorporada à emulsão 5,0% (p/p) da substância bioativa *Vaccinium myrtillus* L. (EVM).

Tabela 2: Concentração de EVM (% p/p) adicionado à emulsão dermocosmética base

AMOSTRA	EVM (% p/p)
F2	5,0%

Legenda: F2 – Emulsão dermocosmética (F1) + 5,0% (p/p) EVM; EVM: *Vaccinium myrtillus* L.

A quantidade de EVM preconizada foi devidamente pesada e transferida para um gral de vidro. Com auxílio de um pistilo de vidro, foi pulverizado e solubilizado em quantidade suficiente de água purificada. Verteu-se a solução em quantidade exata de emulsão dermocosmética, previamente pesada em um béquer. Homogeneizou-se os componentes, sob agitação manual. Foram pesadas e acondicionadas 60g de

cada amostra (triplicata) em pote branco de polietileno de alta densidade (PEAD), boca larga com tampa branca do tipo rosca e capacidade declarada de 100g. Os três potes contendo as amostras foram acondicionados ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Todo processo de solubilização e homogeneização dos componentes, foi realizado em temperatura ambiente (24,0 ± 2,0ºC).

C. Preparo da emulsão dermocosmética antissolar (F3)

No presente estudo, as concentrações utilizadas de filtros solares para o preparo da emulsão dermocosmética antissolar foram inferiores a 60% da concentração máxima permitida (ANVISA, 2006; COSMETICS EUROPE, 2006; JAPAN, 2000), visando a obtenção de um fotoprotetor mais seguro para o consumidor.

A **Tabela 3** descreve as proporções (% p/p) dos filtros orgânicos e inorgânico adicionado à emulsão dermocosmética base. As concentrações utilizadas dos filtros químicos e físicos foram estabelecidas de acordo com a legislação e diretrizes internacionais (CHISVERT; SALVADOR, 2007; COSMETICS EUROPE, 2006; JAPAN, 2000).

Tabela 3: Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) dos filtros solares na emulsão dermocosmética antissolar

Composição (nome químico ou comercial)	**Proporção (%p/p)**	**Função** (Brandão, 2009)
Dióxido de Titânio	2,5	Fotoprotetor UVA/UVB
Octocrileno	1,5	Fotoprotetor UVB
Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutyl phenol (Tinosorb® M)	6,0	Fotoprotetor UVA

Os compostos octocrileno e dióxido de titânio foram pesados juntamente com o Olivem® 1000, Polymol® 812, adipato de butila e Lipomulse® Luxe AE, para compor a fase óleo da emulsão. As matérias-primas foram transferidas para um béquer, em seguida, aquecidas até 75°C.

O composto Tinosorb® M foi pesado com o propilenoglicol, EDTA dissódico e a água purificada, para compor a fase água da emulsão. As matérias-primas foram transferidas para outro béquer e aquecidas até 75 °C. Verteu-se o conteúdo da fase água sobre a fase óleo, e sob agitação mecânica (hélice modelo dissolver) com velocidade de 1500 rpm. A agitação foi mantida por 10 minutos. Após, diminui-se a velocidade de agitação para 1000 rpm, até 45°C. Nesta temperatura, adicionou-se o Conserv® NE e homogeneizou-se. Em um outro béquer, foram pesados e dispersos os silicones, sob agitação manual e auxílio de bastão de vidro, até completa homogeneização. Sob agitação mecânica (hélice modelo dissolver) com velocidade de 1000 rpm, incorporou-se a dispersão de silicones à emulsão e manteve-se a agitação até completa homogeneização dos componentes. Ao final da mistura, o valor de pH do sistema foi ajustado para 6,5 com solução de hidróxido de sódio 30% (p/p).

D. Preparo da emulsão dermocosmética antissolar acrescida de EVM 5,0% (p/p) (F4)

A **Tabela 4** descreve a proporção (% p/p) da substância bioativa *Vaccinium myrtillus* L. (EVM) que foi adicionado à emulsão dermocosmética antissolar, após 24 horas de repouso da mesma.

Tabela 4: Concentração de EVM (% p/p) adicionada à emulsão dermocosmética antissolar

AMOSTRA	EVM (% p/p)
F4	5,0%

Legenda: EVM: *Vaccinium myrtillus* L.

A incorporação do EVM e o armazenando de F4 foi efetuada como descrito no item 4.2.1 – B, utilizando-se no lugar da emulsão dermocosmética base (F1), a emulsão dermocosmética antissolar (F3).

4.2.2. Estudo de Estabilidade Preliminar (EEP)

As quatro formulações preparadas para este estudo foram submetidas ao Estudo de estabilidade preliminar (EEP), com o objetivo de evidenciar sinais de instabilidade das mesmas. Os ensaios de Centrifugação seguido do Estresse Térmico foram realizados após 24 horas do repouso das preparações, com o propósito de completar o processo de emulsificação (BABY, 2007). Após os ensaios, as formulações foram avaliadas macroscopicamente, em triplicata, quanto ao aspecto e à possíveis alterações (separação de fases e coalescência). Usou-se, como critério de classificação, Normal (N) ou Modificada (M), sendo consideradas aprovadas em caso de obtenção de N em ambos os testes (ANVISA, 2004).

4.2.2.1 Teste de centrifugação

Após 24 horas da preparação das amostras, cerca de 5,0 g de cada amostra foram pesadas em balança semianalíticas ARD 110 OHAUS® e transferidas para tubos de centrífuga, em réplicas de três. O teste foi realizado na Centrífuga RX2 Hitachi® e as condições experimentais foram: temperatura ambiente (22,0 ± 2,0ºC); velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G); com duração de tempo 30 minutos (BABY, 2005). Após o ensaio, as formulações foram avaliadas e classificadas como descrito no item 4.2.2 (ANVISA, 2004)

4.2.2.2 Teste de estresse térmico

Pesaram-se cerca de 5,0 g de cada formulação que foram transferidas para tubos de ensaio, em réplicas de três. O processo do estresse térmico foi realizado em banho termostatizado N480 Nova Ética®, elevando-se gradativamente, e de forma controlada, o valor inicial de temperatura. O ensaio foi conduzido a partir de 40 ºC até 80ºC (temperatura final), elevando-se a temperatura em 10ºC a cada 30 minutos. As formulações foram retiradas das condições de estudo e, ao término de 80ºC, após atingirem a temperatura ambiente, foram avaliadas e classificadas como descrito no item 4.2.2 (ANVISA, 2004).

4.2.2.3 Caracterização físico-química

As amostras aprovadas no EEP foram caracterizadas por meio do valor de pH e propriedades organolépticas (aspecto, cor e odor) (ANVISA, 2004).

4.2.2.4 Determinação do valor de pH

O valor do pH das amostras foi determinado em Peagômetro Q400 AS (Quimis®), por imersão direta do eletrodo nas dispersões, à temperatura ambiente (aproximadamente 24,0°C ± 2ºC). As análises foram conduzidas em réplicas de três (BABY, 2007).

4.2.2.5 Determinação das propriedades organolépticas

O aspecto, cor e odor das quatro amostras preparadas, foram avaliados macroscópica e subjetivamente (ANVISA, 2004).

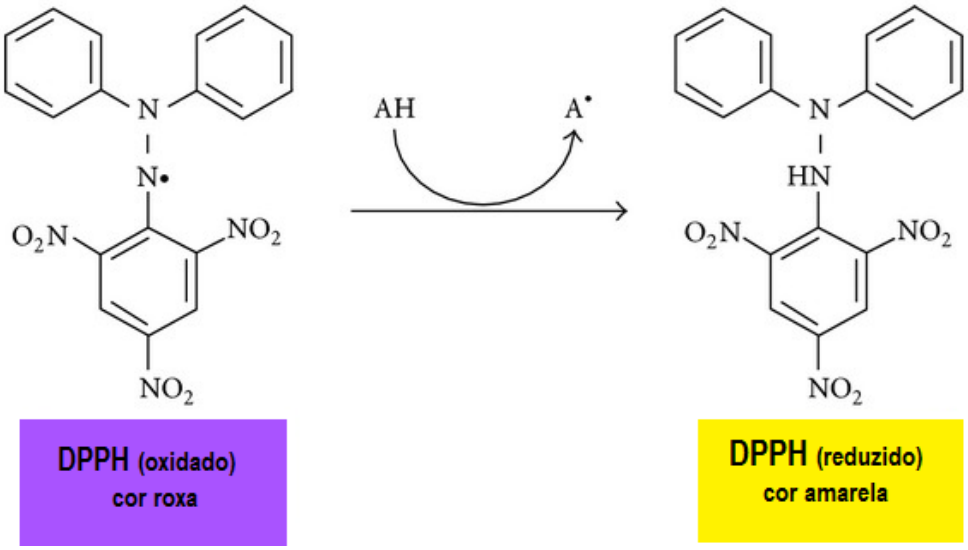
4.2.3 Caracterização funcional *in vitro*

4.2.3.1 Atividade antioxidante do EVM *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante do EVM foi mensurada *in vitro* empregando-se o método do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), metodologia largamente empregada para avaliar o potencial antioxidante de extratos de produtos naturais (Braca et al., 2001).

Utilizou-se, para determinação do potencial antioxidante do extrato, o DPPH• solubilizado em metanol (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A solução apresenta cor roxa e absorbância máxima de 517 nm e, ao ser reduzido por substâncias antioxidantes, sofre alteração na coloração, passando a apresentar cor amarela, como pode ser observado na **Figura 7** e, consequentemente, queda nos valores de absorbância.

Figura 7: Reação de redução da molécula de DPPH por substâncias antioxidantes (adaptado de Teixeira et al., 2013)



Legenda: DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

Foram preparadas quatro diferentes concentrações de EVM, solubilizadas em metanol e submetidas a 20 minutos de sonicação. Uma alíquota de 100 µL de cada uma das soluções, contendo quatro diferentes concentrações (0,04; 0,4; 4,0 e 40,0 µg/mL) foram transferidas para tubos e foram adicionadas de 3,9 mL de solução metanólica de DPPH• a 70 µM. Os tubos foram vigorosamente agitados e permaneceram em repouso, ao abrigo de luz e à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0ºC, por 30 minutos. Após, verteu-se o conteúdo dos tubos em cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico, e efetuou-se a avaliação da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 515nm. As análises foram realizadas em triplicatas e utilizou-se como controle negativo o metanol e controle positivo, a solução metanólica de DPPH• a 70 µM.

A atividade antioxidante foi expressa por meio da porcentagem de redução do DPPH• pelas diferentes concentrações das amostras de EVM de acordo com a **Equação 1** Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Abs controle - Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Equação 1: Porcentagem de redução da molécula de DPPH• por substâncias antioxidantes

Legenda: Abs controle = absorbância da solução de DPPH• preparada com o controle negativo (metanol); Abs amostra = absorbância da solução de DPPH• preparada com a amostra em teste.

4.2.3.2 Atividade fotoprotetora *in vitro*

A avaliação da eficácia *in vitro* frente à proteção contra o UVB e de amplo espectro das formulações foi efetuada com o emprego da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*).

Amostras das formulações foram pesadas e aplicadas sob a forma de filme fino e uniforme de 0,75 mg/cm^2 (PERES et al., 2017; BABY et al., 2008; VELASCO et al., 2008) sobre o substrato (placa de polimetilmetacrilato - PMMA). Visando a secagem da amostra aplicada, as placas foram mantidas em repouso, ao abrigo da luz por 15 minutos e em temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C). Posteriormente, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica da absorbância das formulações, utilizando-se como branco uma placa de PMMA tratada com glicerina, em intervalo espectral de comprimento de onda (λ) 290,0 a 400,0 nm e taxa de progressão de 1,0 nm. O ensaio possibilitou a obtenção dos seguintes parâmetros: FPS estimado por meio da **Equação 2** (SPRINGSTEEN et al., 1999), comprimento de onda crítico estimado de acordo com a **Equação 3** e a razão UVA/UVB, por meio do programa UV-2000S® (VELASCO et al., 2008). As análises foram realizadas em triplicatas e utilizou-se, pelo menos, sete leituras de transmitância por placa avaliada (SPRINGSTEEN et al., 1999; UNITED STATES, 2011; COSMETICS EUROPE, 2006).

O FPS *in vitro* foi obtido por meio da **Equação 2** (SPRINGSTEEN et al., 1999).

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda T\lambda d\lambda}$$

Equação 2. Fator de proteção solar *in vitro* (FPS estimado)

Legenda: *Eλ* = eficácia eritematógena espectral da CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*); *Sλ* = irradiância solar espectral; T*λ* = transmitância espectral da amostra; *dλ* = intervalo dos comprimentos de onda.

$$\int_{290}^{\lambda c} A(\lambda)d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda)d\lambda$$

Equação 3. Comprimento de onda crítico *in vitro*.

Legenda: *A(λ)* = absorbância espectral da amostra; *d(λ)* = intervalo dos comprimentos de onda.

4.2.3.3 Avaliação *in vitro* da fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras

A avaliação da fotoestabilidade em formulações fotoprotetoras permite obter informações sobre possíveis degradações que os filtros solares, presentes no produto, podem sofrer quando expostos à radiação ultravioleta artificial emitida por uma câmera de fotoestabilidade (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011).

Após as leituras das absorbâncias das formulações no ensaio da atividade fotoprotetora *in vitro*, as placas de PMMA utilizadas e que continham as amostras foram irradiadas por 1 h com o simulador de irradiação UV (CPS+ Atlas Suntest®) equipado com lâmpada de xenônio, com irradiância a 580 $W.m^{-2}$, correspondente a irradiância de 55 $W.m^{-2}$ no UV e temperatura de 35 ºC. (COSMETICS EUROPE, 2006; DIFFEY et al., 2000; UNITED STATES, 2011). Após irradiação, as absorbâncias das formulações foram registradas, obtendo-se os parâmetros de FPS e comprimento de onda crítico, os quais foram comparados com aqueles da pré-irradiação. As análises foram realizadas em triplicata e utilizou-se, no mínimo, sete registros de transmitância por placa avaliada (COSMETICS EUROPE, 2006).

4.2.3.4 Avaliação do potencial de irritação ocular *in vitro* pelo método - *Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM)

O ensaio HET-CAM – *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* foi realizado utilizando-se ovos de galinhas do tipo *legorne branca* fecundados, incubados por 10 dias a 37ºC e 65% de umidade relativa em incubadora Chocmaster®. Após o período de incubação, a casca ao redor da câmara de ar foi removida com o auxílio de pinça, evidenciando-se a membrana da casca, que também foi removida após ser hidratada com 300 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio – NaCl – a 0,9% p/v). Na membrana cório-alantoide exposta foram depositados 300 µL da formulação F4 que foi previamente diluída à 10,0% (p/v), com solução fisiológica. O controle positivo foi realizado com dispersão de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1,0% (p/v) e, o controle negativo, solução fisiológica - cloreto de sódio – NaCl – a 0,9% p/v (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES - NIEHS, 2006). O ensaio foi realizado em triplicata.

O ovo fecundado contendo a amostra do ensaio foi acomodado em um suporte e a câmera foi posicionada de maneira ideal para capturar a gema ou saco vitelino de cor amarela ao fundo e, em destaque, os vasos sanguíneos, registrando com nitidez as alterações da membrana corioalantoide. Durante cinco minutos, eventos vasculares como hemorragia, lise ou coagulação, foram gravados pela Câmera Dino-Lite®, modelo AM-211. Posteriormente, as imagens foram analisadas e os eventos avaliados. O índice de irritação ocular (IS) foi calculado de acordo com a **Equação 4** (KALWEIT et al., 1990; NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES - NIEHS, 2006).

$$\mathbf{IS} = \frac{(301 - \mathbf{H})}{300} \times 5 + \frac{(301 - \mathbf{L})}{300} \times 7 + \frac{301 - \mathbf{C}}{300} \times 9$$

Equação 4: Índice de irritação ocular.

Legenda: **IS** – índice de irritação ocular; **H** – tempo (s) para iniciar um evento hemorrágico; **L** - tempo (s) para iniciar uma lise vascular; **C** - tempo (s) para iniciar uma coagulação.

De acordo com a **Equação 4**, os produtos podem ser classificados como descrito na **Quadro 2**.

Quadro 2: Classificação do potencial de irritação ocular (KALWEIT et al., 1990)

Índice de irritação ocular (IS)	Classificação
0 – 0,9	Não irritante
1 – 4,9	Levemente irritante
5 – 8,9	Moderadamente irritante
9 – 21	Fortemente irritante

4.2.4 Ensaio Clínico

As duas emulsões dermocosméticas antissolar, sendo F3 somente com os filtros solares e F4 contendo os filtros solares e extrato de *Vaccinium Myrtillus* L. a 5,0% (p/p), foram submetidas aos ensaios clínicos de avaliação da eficácia fotoprotetora e hidratação superficial da pele em seres humanos.

4.2.4.1 Ensaios *in vivo* – aspectos legais e éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, parecer Nº1.421.928, em função da realização dos ensaios *in vivo* com voluntários. Este estudo foi realizado em acordo com a Legislação Brasileira vigente, regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Os ensaios clínicos foram conduzidos pelo Instituto de Pesquisa Clínica Integrada Ltda (IPclin) localizado em Jundiaí-SP, Brasil, seguindo as regras da Declaração de Helsinque (Brasil, 2012). Para cada voluntário que manifestou interesse em participar desta pesquisa, foram fornecidas as informações e esclarecimentos necessários referentes a cada ensaio. Após esses esclarecimentos, forneceu o seu consentimento por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), mantendo-se o anonimato do voluntário e garantindo a sua saída do estudo, voluntariamente, a qualquer momento durante a pesquisa (BRASIL, 2012.)

Antes do início dos ensaios, os voluntários foram entrevistados e avaliados por profissionais habilitados, considerando-se os critérios de inclusão e exclusão que são exigidos pela legislação vigente. Os critérios de inclusão foram: (i) participantes saudáveis; (ii) pele íntegra na região de testes; (iii) voluntários de ambos os sexos; (iv) idade entre 18 a 60 anos; (v) concordância em aderir ao estudo, por meio do TCLE. Os critérios de exclusão foram os seguintes: (i) gestação ou lactação; (ii) histórico de reações fototóxicas, fotoalérgicas ou patologias fotoinduzidas; (iii) histórico pessoal ou familiar de câncer de pele; (iv) uso de medicações anti-inflamatórias, imunossupressoras ou fotossensibilizantes – tópicos ou sistêmicas – até um mês antes do início do estudo; (v) presença de queimadura solar ou bronzeado no local dos testes; (vi) tom de pele desigual na região do estudo; (vii) presença de dermatoses inflamatórias, lesões névicas, manchas, queratose seborreica, patologias ativas ou excesso de pelos no local do teste; (viii) alergias conhecidas a qualquer componente da formulação (BRASIL, 2012). Foi considerado também o fototipo de pele dos voluntários para os testes de eficácia fotoprotetora *in vivo*: especificamente, foram aceitos voluntários com fototipo de pele entre I e III, de acordo com a escala de Fitzpatrick (COSMETICS EUROPE, 2006; UNITED STATES, 2011).

4.2.4.2 Avaliação da Eficácia Fotoprotetora (FPS)

A eficácia fotoprotetora *in vivo* avalia a proteção oferecida por produtos, destinados a proteger a pele contra a radiação UVB. É embasada, na reação eritematógena produzida frente ao contato com uma fonte artificial emissora de radiação UV e foi determinada de acordo com o Teste de Fator de Proteção Solar (COSMETICS EUROPE, 2006).

O FPS foi definido como o quociente entre a dose eritematógena mínima (DEM) – energia requerida para a produção do primeiro eritema na pele dos voluntários, protegida com o fotoprotetor em análise (DEM p) – e em pele ausente de proteção (DEM np), após exposição à radiação UVB emitida por uma fonte artificial (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011). O DEM é a quantidade de energia efetiva, expressa em Joules/cm^2, requerida para a produção da primeira reação eritematógena perceptível e com bordas definidas (SHEU et al., 2003).

Dez voluntários fototipos I, II e III (FITZPATRICK, 1975) foram dermatologicamente avaliados e admitidos para participar do estudo. Alíquotas de 2,0 mg/cm^2 das formulações F3, F4 e do produto de referência P2 (FPS 16) foram aplicadas uniformemente no dorso (região entre a escápula e a linha do quadril) dos participantes, em áreas previamente delimitadas (35,0cm^2) e limpas com algodão seco. Após período de 15 minutos para a secagem do produto, as áreas definidas, foram submetidas a irradiação com um simulador solar artificial (Multiport® 601 UV Solar Simulator). Foram consideradas para definir a dose a ser utilizada, a DEM individual de cada participante e o FPS estimado das formulações (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011). A DEM de cada voluntário foi obtida por uma sequência de exposições à luz ultravioleta, aumentando-se a dose em 12% (progressão geométrica) entre cada exposição (UNITED STATES, 2011).

Após 20 ± 4 horas da exposição, as áreas foram avaliadas visualmente e simultaneamente, sob fonte de iluminação padrão. Assim, a DEM foi determinada na pele protegida (DEMp) e não protegida (DEMnp) e o cálculo do FPS *in vivo* foi efetuado utilizando-se a **Equação 5** (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011)

$$\mathrm{FPS} = \frac{\mathrm{DEMp}}{\mathrm{DEMnp}}$$

Equação 5. Fator de proteção solar *in vivo*

Legenda: DEMp – dose eritematógena mínima na pele protegida pela amostra ou formulação padrão (P2); DEMnp – dose eritematógena mínima na pele não protegida.

4.2.4.3 Avaliação da hidratação superficial da pele

A hidratação superficial da pele foi avaliada por meio da corneometria em 20 voluntários do sexo feminino e masculino com idade entre 20 e 35 anos. Os procedimentos para realização do teste, foram informados oralmente e por meio do TCLE.

Os voluntários permaneceram durante 30 minutos em sala com condições ambientais controladas (20 ± 2ºC e 50 ± 5% de umidade relativa) para climatização e tiveram demarcados, em seus antebraços, os sítios de aplicação e medição

corneométrica iniciais e finais. Um dos antebraços foi submetido à aplicação do produto-teste, enquanto o outro foi utilizado como controle (segundo aleatorização).

Apósitos epicutâneos foram aplicados no antebraço dos voluntários durante 4 horas, com medições iniciais (t0), 2 horas (t2) e 4 horas (t4). As formulações F3 e F4, avaliadas neste ensaio, foram aplicadas no antebraço de cada voluntário, com auxílio de seringa descartável de 1mL, em sítios randomizados e previamente demarcados em quantidade padronizada de 2 mg/cm^2. As formulações foram espalhadas, de modo padronizado, com o dedo protegido por dedeira descartável de látex. A medida de hidratação cutânea foi realizada em triplicada com auxílio do Corneometer® MPA 580 (Multi Probe Adapter – Courage & Khazaka).

4.2.5 Análise estatística dos resultados

Os dados foram avaliados no programa Minitab®, versão 17. As análises foram realizadas em triplicata, sendo o nível de significância igual a 5,0% ($p \leq 0,05$). Nas comparações entre duas amostras, os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico *t-Student*. Nas comparações entre três ou mais amostras foi utilizado o teste estatístico ANOVA *One-Way* seguido do teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo e estabilidade preliminar das emulsões dermocosméticas

O preparo das formulações do presente estudo contemplou a obtenção de quatro sistemas emulsionados do tipo óleo-em-água (O/A), contendo emulsionantes, emolientes e umectante, dentre outras matérias-primas compatíveis com a incorporação de substâncias com propriedades de proteção solar e bioativos. Durante o preparo das formulações, foram consideradas as matérias-primas utilizadas pelas indústrias de produtos fotoprotetores e que não apresentem incompatibilidades, físicas ou químicas, e que possam ser associadas entre si, visando obter produtos seguros, eficazes e cosmeticamente aceitáveis pelo público consumidor de fotoprotetores e critérios do formulador (BABY, 2007). Segundo Balogh e colaboradores (2011) produtos fotoprotetores são elaborados em diferentes formas cosméticas, sendo a emulsão O/A, selecionada para este estudo, uma das mais frequentes.

O sistema emulsionante selecionado para o preparo das formulações foi composto por *Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, PEG-40 Stearate, Ceteareth-20,* emulsionante não iônico, estabiliza emulsões O/A com altas concentrações de óleo, estável na faixa de pH entre 3,0 e 12, associado ao *Cetearyl Olivate, Sorbitan Olivate* - emulsionante não iônico, derivado do óleo de olivas, com estabilidade em ampla faixa de pH (3,0 – 12,0) e compatível com solventes orgânicos polares, que facilita a dispersão dos filtros solares, além de possuir certificação de produto orgânico (Ecocert* **-** organismo de inspeção e certificação de produtos orgânicos) e característica biodegradável.

Os componentes que fazem parte da emulsão são fundamentais para definir algumas características do produto, além do filme que será formado sobre a pele, a interação com os componentes e o deslocamento espectral (VELASCO et al., 2012), assim como a polaridade e pH dos solventes e das substâncias com ação de proteção solar, podem alterar e deslocar a absorção do filtro solar para uma maior faixa de frequência, alterando a eficácia antissolar do produto.

Interações químicas devem ser previstas entre os filtros solares utilizados e o sistema emulsionante, emolientes e outros componentes da formulação, visando evitar efeitos negativos na eficácia do produto final (VELASCO et al., 2008). Visando evitar interações negativas na preparação, o adipato de butila e os triglicérides de

ácido caprílico foram utilizados para solubilizar e dispersar os filtros orgânicos e inorgânicos, respectivamente.

A associação adequada de ambas as substâncias emulsionantes e os emolientes possibilitou manter a estabilidade de todas as amostras durante as análises (CHORILLI et al., 2006), sem observação de alterações na consistência durante a realização dos ensaios. O valor de pH final da emulsão foi um item crítico para a escolha do sistema emulsionante, considerou-se que o valor do pH deve ser compatível com os componentes da formulação e com a pele (VELASCO et al., 2012), assegurando assim a eficácia e segurança de um produto, mantendo a estabilidade das emulsões e a viabilidade dos seus componentes.

As formulações foram avaliadas macroscopicamente quanto estabilidade, valor de pH biocompatível com o cutâneo e características organolépticas adequadas, segundo critérios definidos pelo formulador/mercado e dados de literatura (VELASCO et al., 2012)

A estabilidade das emulsões dermocosméticas, com e sem propriedade antissolar e as mesmas acrescidas de 5,0% da substância bioativa, foi verificada por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico, utilizados para acelerar possíveis sinais de instabilidade inerentes aos sistemas emulsionados (ANVISA, 2004). A avaliação preliminar da estabilidade das formulações fotoprotetoras é responsável por fornecer informações indicativas do grau de estabilidade relativa de cada formulação (ANVISA, 2006; LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007). A mobilidade das partículas antecipa possíveis sinais de instabilidade nas formulações (ANVISA, 2006). As emulsões dermocosméticas obtidas no presente estudo apresentaram aspecto estável e homogêneo.

A **Tabela 5** descreve os resultados obtidos para os testes de centrifugação e estresse térmico, aos quais as formulações F1, F2, F3 e F4, foram submetidas durante o estudo de estabilidade preliminar.

Tabela 5: Avaliação das características organolépticas das emulsões dermocosméticas submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar

Formulações	Estudo de Estabilidade Preliminar	
	Centrifugação	Estresse Térmico
F1	N	N
F2	N	N
F3	N	N
F4	N	N

Legenda: N: normal

Os testes de centrifugação e estresse térmico são eficientes para selecionar as emulsões que serão submetidas, a seguir, ao teste de estabilidade acelerada e normal (ANVISA, 2004). As formulações F1, F2, F3 e F4 foram submetidas a ambos os testes e não foram observadas alterações como, separação de fases ou cremeação. Portanto, após o Estudo de Estabilidade Preliminar as formulações permaneceram macroscopicamente homogêneas e foram consideradas estáveis (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000) e aprovadas para a realização das análises seguintes (caracterização físico-química, atividade fotoprotetora *in vitro* e eficácia funcional)

5.2 Caracterização físico-química das formulações dermocosméticas antissolares contendo ou não EVM

As emulsões com e sem propriedades antissolares e as mesmas contendo o EVM 5,0% foram analisadas visualmente, 24 horas após o preparo, quanto às suas características organolépticas (aspecto, cor e odor). Uma alíquota de cada amostra foi depositada em um vidro de relógio apoiado sobre um fundo branco e as características foram analisadas em triplicata. O aspecto e cor foram avaliados visualmente e o odor foi verificado através do olfato (ANVISA, 2004). Adicionalmente, fez-se a verificação dos valores de pH. No momento do preparo das formulações, somente F1 e F3 tiveram o valor de pH corrigido para 6,5. A **Tabela 6** apresenta as características organolépticas e físico-químicas de F1, F2, F3 e F4.

Tabela 6: Características organolépticas e físico-química das formulações

Formulações	Aspecto	Características Organolépticas	Valor de pH
F1		Aspecto homogêneo, cor branca e odor característico	6,50 ± 0,08[A]
F2		Aspecto homogêneo, cor púrpura escura e odor característico	4,54 ± 0,16[B]
F3		Aspecto homogêneo, cor branca, odor característico	6,54 ± 0,16[A]
F4		Aspecto homogêneo, cor violeta escura e odor característico	6,10 ± 0,38[A]

Legenda: Resultados de valor de pH expressos como média ± desvio padrão n=3. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os valores dos grupos.

O aspecto homogêneo e consistência aparente apresentado pelas quatro amostras (sistema O/A) pode ser justificado em consequência do balanço adequado entre as substâncias emulsionantes/consistência e emolientes que facilitaram a emulsificação, a incorporação dos filtros solares (orgânicos e inorgânicos) e do EVM. O sistema emulsionante utilizado nas formulações é estável na faixa de pH entre 3 e 12, valores estes que não interferiram negativamente na estabilidade da formulação F2 que apresentou valor de pH 4,54 (± 0,16)

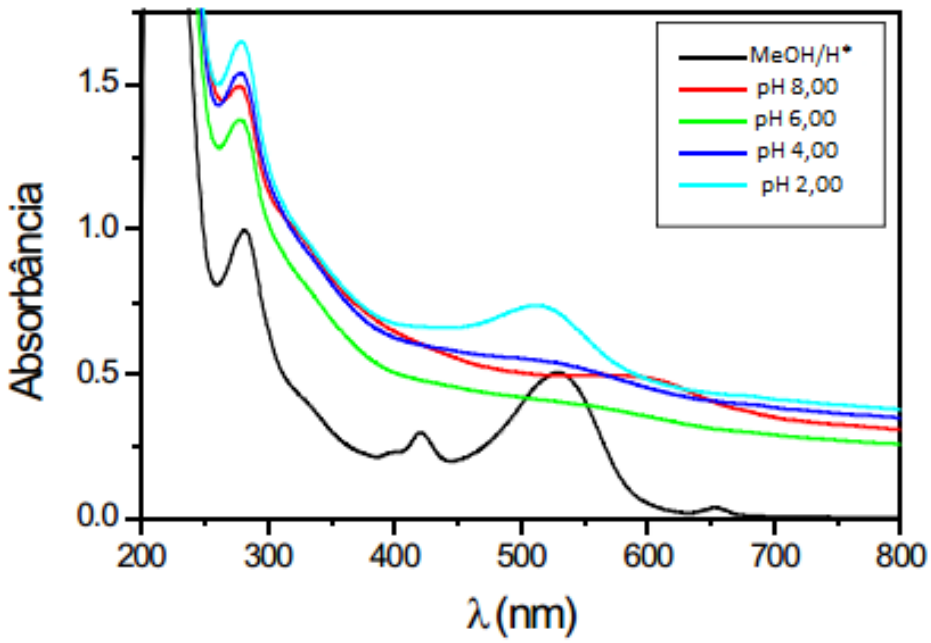
O perfil de estabilidade de um produto é um dos parâmetros utilizados para avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além da aceitação pelo consumidor (ANVISA, 2004). A incorporação do EVM nas emulsões não interferiu negativamente na estabilidade das mesmas, observou-se que tanto F1 e F3, sem adição do extrato quanto F2 e F4, permaneceram macroscopicamente estáveis, ratificando a estabilidade do sistema emulsionado.

As amostras apresentaram coloração entre o branco e o violeta escuro, a saber, F1 e F4, respectivamente. A amostra sem filtros UV adquiriu a coloração púrpura proveniente do EVM. As cores apresentadas pelas formulações F2 e F4, correspondem à coloração do EVM e da associação dos filtros solares com EVM.

Segundo Cavalcanti, Santos e Meireles (2001), as cores das antocianinas são percebidas por meio da ressonância do cátion flavilium, devido à presença de duplas ligações conjugadas que absorvem na região de 500 a 600nm.

Referente ao valor de pH, inicialmente, a emulsão base apresentou valor igual a 6,50 ± 0,08. Após a adição do EVM, F2 (emulsão dermocosmética base) apresentou valor de pH igual a 4,54 ± 0,16, inferior ao da base em que foi incorporado e coloração púrpura. As antocianinas em meio ácido (valor de pH próximo a 4) apresentam coloração vermelho/púrpura (GIUSTI; WROLSTAD, 2001) característico do cátion flavilium (**Figura 5**). Segundo Lima, Melo e Guerra (2007) o valor de pH interferiu diretamente na coloração apresentada pela formulação devido à presença de antocianinas no EVM. Este fato foi observado pelos registros de absorbâncias (**Figura 8**), quando se utilizaram soluções de antocianinas em diferentes meios.

Figura 8: Espectro de absorção de solução de antocianinas em diferentes pHs (LIMA; MELO; GUERRA, 2007)



Em meio ácido, as antocianinas são vermelhas, mas apresentam diminuição na intensidade da cor quando ocorre elevação no valor de pH. Em meio alcalino observa-se a cor azul (LOPES et al., 2007). As antocianinas possuem quatro diferentes formas químicas em meio ácido: cátion flavilium, base quinoidal, pseudobase carbinol e chalcona. Em valores de pH próximo a 2, observa-se o cátion flavilium, que possui cor vermelha. No momento do equilíbrio ácido-base pode ocorrer dois tipos de reações. A primeira é uma reação de hidratação do cátion, gerando um produto de coloração translúcida, o carbinol, que em pH com valor próximo a 6 transforma-se em chalcona, também translúcido; ou pode apresentar um segundo tipo de reação, a protonação do cátion, uma reação que gera a base quinoidal, de coloração azul (VIGUERA; BRIDLE, 1999).

Observou-se que a formulação contendo as substâncias fotoprotetoras associadas ao EVM (F4) adquiriu a coloração violeta/azulado e as alterações nos valores de pH não foram acentuadas, quando comparados ao valor de pH de F3. Em pH = 6,0 ou próximo deste, o cátion flavilium perdeu prótons, formando uma base quinoidal de coloração violácea (LIMA; MELO; LIMA, 2005).

Segundo Castañeda-Ovando e colaboradores (2009), a variedade de cores das antocianinas é explicada pela formação de sais flavilium. As antocianinas em

presença de metais formam produtos insolúveis. Estes, em relação às antocianinas livres, apresentam maior estabilidade frente ao calor, pH e oxigênio (BOBBIO; BOBBIO, 1995) e, também, alteram a cor apresentada pelas antocianinas na região do espectro visível. Uma das características das antocianinas com grupos hidroxila no anel B é a formação de complexos metal-antocianina; esse tipo de complexação promove a formação e a estabilização da cor entre o azul e o verde azulado (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). A formulação antissolar avaliada nesta pesquisa possuiu na composição o óxido metálico TiO_2, e o extrato de *Vaccinium mirtyllus* L., que possui antocianina (HABÁNOVÁ et al., 2013), portanto, o complexo antocianina-metal pode ter sido formado. O fato da formação do citado quelato justifica a manutenção do valor do pH inicial observado em F3 e na emulsão antissolar após a adição do EVM (F4), diferentemente do ocorrido com as amostras F2, que não continham o TiO_2 na composição e sofreram alteração do meio após a adição do extrato.

Na análise do odor, observou-se que as formulações F1 e F3 possuíam odor característico das matérias que presentes na emulsão e, F2 e F4 apresentaram odor característico do extrato utilizado, que permaneceram durante inalterados ao final do ensaio.

5.3 Atividade Antioxidante do Extrato de *Vaccinium Myrtillus* L.

O potencial antioxidante do EVM foi determinado por meio da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Método realizado em temperatura ambiente, o que elimina a possível degradação térmica das moléculas testadas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A avaliação da atividade sequestrante do DPPH• estima o poder redutor de um composto antioxidante, que ao doar elétron para um radical livre, oxida-se (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Visando reduzir interferentes do método, foram padronizadas variáveis. O radical livre DPPH• pode ter seu processo de decomposição acelerado pela luz, oxigênio e altas temperaturas, observando-se alterações nos valores de absorbância apresentados (OZCELIK, LEE; MIN., 2003)

O metanol foi o solvente de escolha pois assegura maior estabilidade ao radical DPPH•, colaborando com o rigor dos resultados obtidos na avaliação das amostras (SHARMA; BHAT, 2009). No caso específico do EVM, o metanol, não interferiu negativamente na capacidade antioxidante apresentada por este bioativo (Duarte–Almeida e colaboradores (2006).

A concentração da solução metanólica do DPPH• definida para os ensaios realizados foi de 70 µM, que segundo Molyneux (2004), obtém-se melhor valor para a observação da absorbância das análises. O tempo de reação entre o radical e amostra foi padronizado em 30 minutos, em temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C) e ao abrigo da luz.

O potencial antioxidante de uma substância corresponde à quantidade de DPPH• consumida por esta, em determinado tempo e, segundo Duarte–Almeida e colaboradores (2006), o EVM possui atividade antioxidante moderada. De acordo com a **Tabela 7** a atividade antioxidante (%) obtida do EVM na concentração de 40 µg/mL foi de 32,30%.

Tabela 7: Atividade Antioxidante do EVM em diferentes concentrações

Concentração do EVM (µg/mL p/v)	Atividade antioxidante (%)
0,04	17,17 ± 0,6^{A}
0,4	20,17± 0,8^{B}
4,0	21,92± 1,3^{c}
40,0	32,30± 1,2^{D}

Legenda: Resultados de atividade antioxidante expressos como média ± desvio padrão n=3. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os valores dos grupos; Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way* e Tukey.

Pela análise dos resultados na **Tabela 7**, constatou-se que as diferentes concentrações do bioativo EVM apresentaram atividade antioxidante mesmo em reduzidas concentrações. A porcentagem antioxidante referente ao EVM de 17,17; 20,17; 21,92 e 32,30%, respectivamente, para as concentrações iguais a 0,04; 0,4; 4,0 e 40,0 µg/mL, são corroboradas com o potencial antioxidante encontrado por Duarte-Almeida, et al., (2006), ao avaliar o extrato de mirtilo e a polpa congelada da fruta.

A avaliação da atividade antioxidante do EVM em concentrações superiores, não foi viável devido à intensa coloração púrpura apresentada pelo bioativo, promovendo interferência na visualização da descoloração do DPPH•, que inicialmente possui a cor púrpura e, após reação com o composto antioxidante que doa um hidrogênio à molécula, reduzindo-a e promovendo alteração de cor (passando a apresentar coloração amarela) e decréscimo nos valores de absorbância (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Considerando os resultados obtidos neste estudo e a literatura, foi possível constatar que compostos bioativos como o EVM, que possui comprovada atividade antioxidante, associado às formulações antissolares, representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de protetores solares multifuncionais (CALÒ, R., MARABINI, L. 2014).

5.4 Atividade fotoprotetora *in vitro*: fator de proteção solar (FPS) e fotoestabilidade

A combinação dos filtros utilizados nas amostras foi selecionada para propiciar espectro de absorção na região do UVB e UVA, ademais, a fotoestabilidade e a sinergia entre os filtros foram critérios utilizados. Visando obter otimização na proteção solar, os bioativos foram adicionados às formulações antissolares pois interagem com os filtros químicos e/ou físicos, alterando parâmetros que podem interferir na eficácia do FPS e comprimento de onda critico (VELASCO et al., 2008).

A atividade fotoprotetora *in vitro* das formulações F1 e F2 foi mensurada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração e o programa computacional acoplado ao equipamento converteu os valores de transmitância na faixa do UVA e UVB, definindo o FPS estimado e o comprimento de onda crítico (nm) das formulações F1 e F2. Através da avaliação do comprimento de onda crítico que é o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade ótica inicia em 290,0 nm e é igual a 90% da área integrada entre 290,0 e 400,0 nm, fornece-se a amplitude de proteção considerando o espectro da radiação UV (UNITED STATES, 2011).

Os valores de FPS estimado e o comprimento de onda crítico das amostras F1, F2, F3 e F4 estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8: Valores de FPS *in vitro* e comprimento de onda crítico das formulações (F1, F2, F3 e F4)

Formulação	Valor de FPS	Comprimento de Onda Crítico Λ (nm)
F1	$1,0 \pm 0,1^{A}$	N.A.
F2	$1,0 \pm 0,1^{A}$	N.A.
F3	$35,33^{B} \pm 0,76$	$381,66^{c} \pm 0,87$
F4	$18,33^{D} \pm 0,76$	$380,66^{c} \pm 0,76$

Legenda: F1: Emulsão base; F2: Emulsão base + EVM 5,0%; N.A. - não aplicável; F3 – emulsão antissolar; F4 – emulsão antissolar + 5,0% de EVM; FPS – Valor de proteção solar estimado; Λ crítico (nm) – comprimento de onda crítico; Resultados avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05); Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Foi possível observar na **Tabela 8**, que F1 e F2 apresentaram valores de FPS estimado, próximo a 1,0, sendo considerados não expressivos e os valores de absorbância (perfil espectral) apresentado pelas amostras foi próximo de zero, não sendo possível realizar a análise do comprimento de onda crítico e evidenciando a não eficácia fotoprotetora das amostras.

A Legislação Brasileira determina que para um produto ser considerado protetor solar, o comprimento de onda crítico deve ser no mínimo 370 nm e o FPS acima de 6 (BRASIL, 2012). Partindo desses dados, os itens expostos na tabela demonstram que as formulações F3 e F4 foram consideradas fotoprotetoras.

De acordo com a **Tabela 8**, as formulações antissolares F3 e F4 não apresentaram diferenças em relação ao comprimento de onda crítico. Em relação ao valor de FPS estimado houve redução na eficácia anti–UVB em F4 que continha filtros UV e o EVM (bioativo).

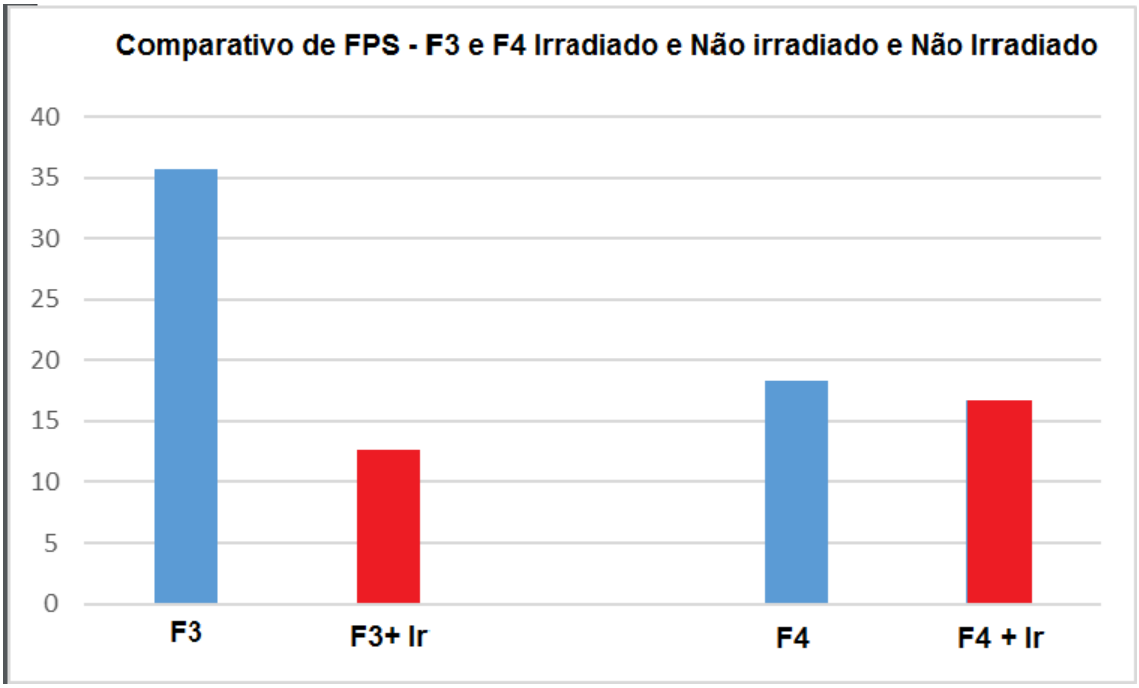
Segundo Nishikawa (2012), a presença de concentrações elevadas (acima de 0,1%) de bioativo pode propiciar a formação de aglomerados que dificultaram o espalhamento das formulações e a não obtenção de resultados sinérgicos satisfatório no perfil de FPS desenvolvido pelas mesmas.

De acordo com Brouillard, Wigand e Dangles (1991), os flavonoides demostram alta absorbância na faixa de 250 a 270 nm (região UV) e, as antocianinas, absorção intensa, entre 520 a 560 nm (região visível) e, segundo Schalka e colaboradores (2012), os protetores solares coloridos possuem a

característica de absorver na faixa de 400nm, propriedade que pode ter sido transferida pelo bioativo avaliado neste estudo que conferiu coloração violácea intensa, atribuída às antocianinas presentes no EVM, à formulação F4.

As formulações F3 e F4 foram avaliadas após irradiação, sendo possível prever possíveis degradações dos filtros solares e/ou compostos bioativos, quando expostos à radiação ultravioleta. Na **Figura 9** observam-se, os parâmetros de FPS irradiados, comparados com aqueles da pré-irradiação.

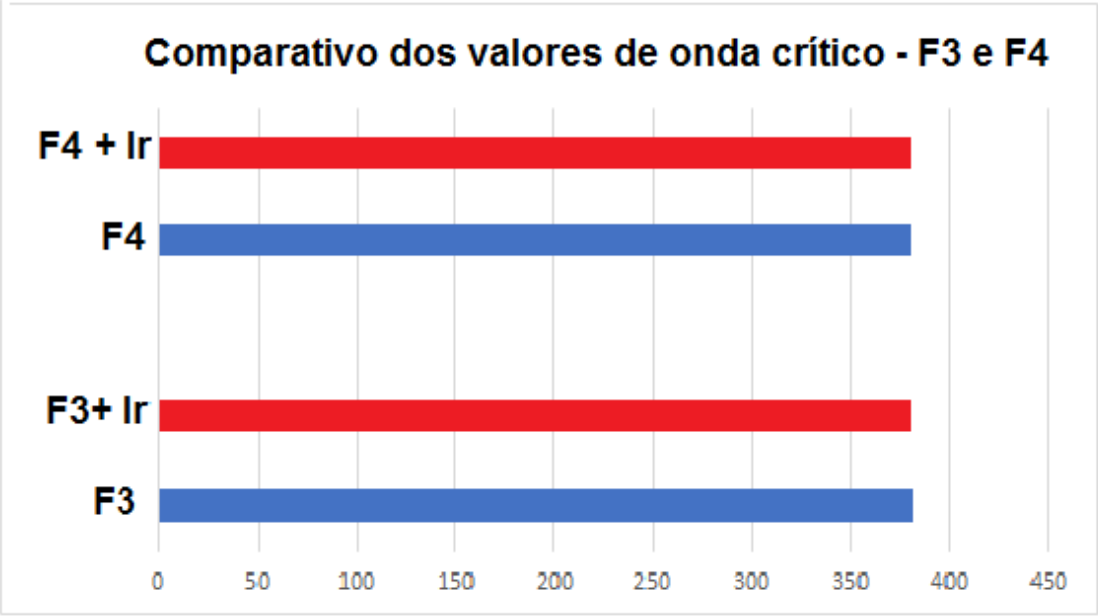
Figura 9: Comparativo de FPS estimado entre as formulações F3 e F4 antes e após irradiação



Legenda: F3 – emulsão antissolar; F3+Ir – emulsão antissolar após irradiação; F4 – emulsão antissolar + 5,0% de EVM; F4+Ir - emulsão antissolar + 5,0% de EVM após irradiação.

Na **Figura 10** pode-se observar os parâmetros de comprimento de onda crítico irradiados comparados com aqueles da pré-irradiação.

Figura 10: Comparativo de valores de onda crítico entre as formulações F3 e F4 antes e após irradiação



Legenda: F3 – emulsão antissolar; F3+Ir – emulsão antissolar após irradiação; F4 – emulsão antissolar + 5,0% de EVM; F4+Ir - emulsão antissolar + 5,0% de EVM após irradiação.

De acordo a **Figura 9**, o FPS de F3 (formulação antissolar) sofreu redução após a incorporação de 5,0% do EVM. Fato que também ocorreu após a irradiação de ambas as formulações avaliadas (F3 e F4), no entanto a amostra (F4) contendo o composto bioativo favoreceu a fotoestabilidade da formulação. Mesmo com a atividade antioxidante comprovada de diversos bioativos, resultados apresentados por Daher, 2014 não demonstraram eficácia fotoprotetora ou potencialização do FPS em formulações contendo filtros solares aditivadas com ativos naturais. Essas, mesmo não sendo eficazes na absorção da radiação UV, foram capazes de reduzir o fotoeritema (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010) e reduzir os radicais livres gerados pela radiação UVB. No entanto, apesar do EVM incorporado às formulações fotoprotetoras não ter aumentado o FPS, não se deve descartar a possibilidade do bioativo atuar como antioxidante, por meio de inibir a formação de radicais livres provenientes do contato da pele com a radiação UV e, também, como potencial agente fotoestabilizador.

5.5 Avaliação do potencial de irritação ocular

O ensaio HET-CAM (*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*) é um método alternativo à experimentação animal, embasa-se na similaridade da membrana corioalantoide (CAM) de um ovo de galinha embrionado e a mucosa do olho humano ou de coelho, devido ao semelhante tecido vascularizado. Seus resultados são comparados àqueles obtidos no teste de Draize *in vivo,* atualmente não recomendado para testar matérias-primas ou produtos cosméticos (ALLTOX, 2016).

O ICCVAM (Interagency Coordinating Commitee on Validation of Alternative Methods) preconiza que os resultados podem ser aceitos somente se o controle positivo for classificado como fortemente irritante por meio do índice de irritação ocular (IS) (ICCVAM, 2010).

O controle positivo apresentou os fenômenos de hemorragia e lise no tempo médio de 2 segundo, sendo o resultado considerado aceitável.

A formulação F4 (emulsão fotoprotetora acrescida de 5,0% de EVM), apresenta coloração arroxeada, que poderia dificultar a visualização dos fenômenos ocorridos na CAM. Esta dificuldade foi contornada quando a amostra F4 foi diluída a 10,0% (p/v) em solução fisiológica (BLEIN et al.,1991) e aplicada na CAM e durante os 5 min (300seg) de ensaio, como pode ser observado na **Figura 11,** não foram observadas envidencias de coagulação, lise ou hemorragia dos vasos. Baseado no resultado obtido por meio da **Equação 4,** com os dados descritos na **Tabela 9** e de acordo com o **Quadro 2**, a formulação foi considerada NÃO IRRITANTE.

Figura 11: Imagens obtidas do efeito da formulação F4 em diferentes tempos – sobre a membrana corioalantoide

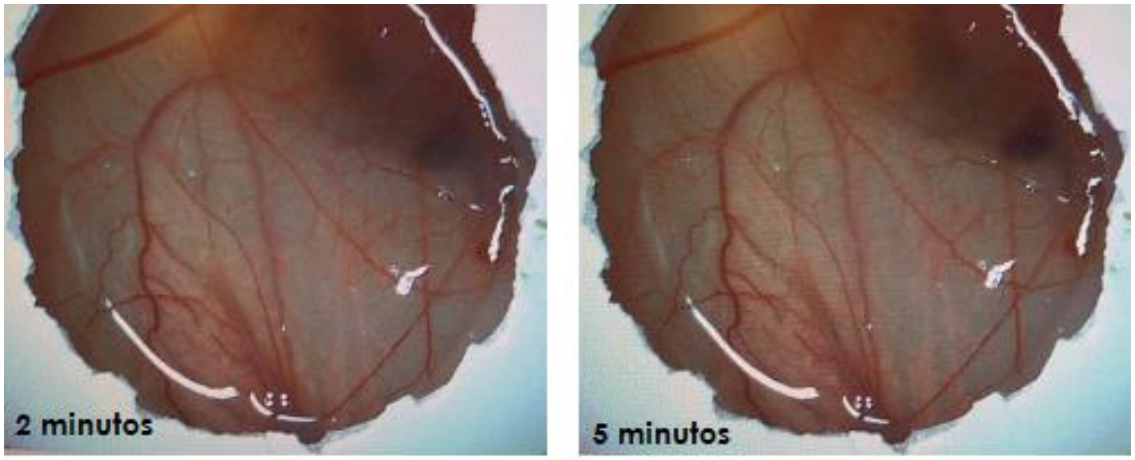


Figura 12: Imagens obtidas do efeito da solução fisiológica (cloreto de sódio – NaCl – a 0,9% p/v) - controle negativo - em diferentes tempos – sobre a membrana corioalantoide

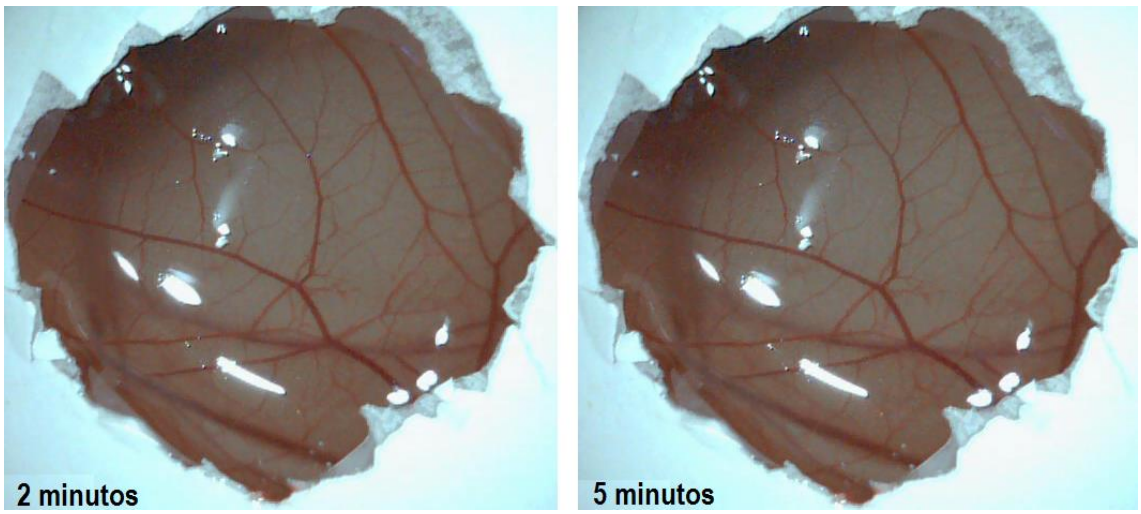


Figura 13: Imagens obtidas do efeito da dispersão de SDS (1,0% p/v) – controle positivo - em diferentes tempos – sobre a membrana corioalantoide

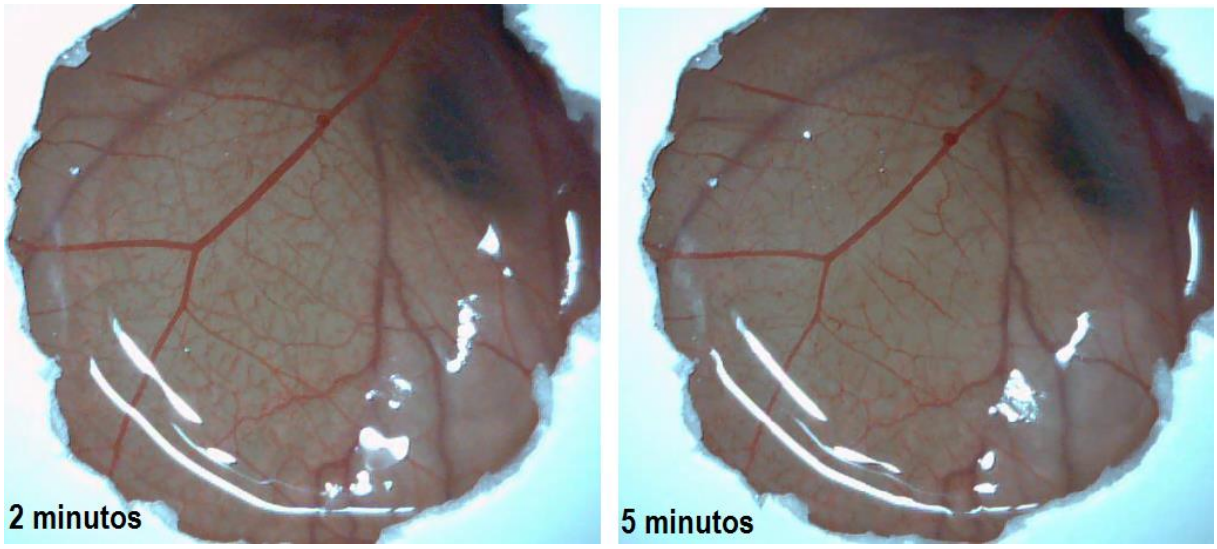


Tabela 9: Classificação do potencial de irritação ocular – Hen´s Egg Test – Chorioallantoic Membrane method (HET-CAM) da formulação F4

Formulação/ Produto	Concentração (%p/p)	$T_{médio}$ (S) Hemorragia	$T_{médio}$ (S) Lise	IS	Classificação
F4	10,0	-	-	0,1	NI
SDS	1,0	2	2	11,96	SI

Legenda: F4 – Formulação Fotoprotetora com 5,0% (p/p) de EVM (Diluída a 10%); SDS – Dodecilsulfato de sódio (controle positivo); IS – potencial irritante ocular; NI – não irritante; SI – fortemente irritante.

Cálculo do ensaio *in vitro* HET-CAM, segundo Equação 4:

$$\mathbf{IS} = \frac{(301 - \mathbf{H})}{300} \times 5 + \frac{(301 - \mathbf{L})}{300} \times 7 + \frac{301 - \mathbf{C}}{300} \times 9$$

IS= 0,1

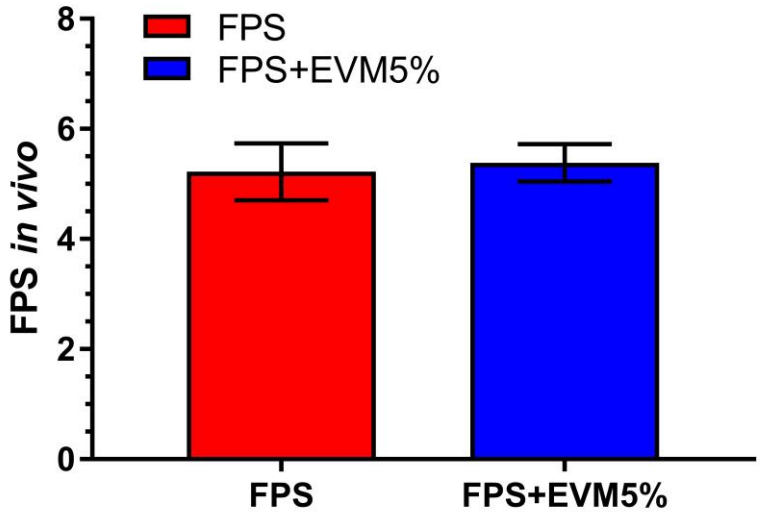
O protetor solar é um produto aplicado na face e pode ter contato com os olhos. O resultado obtido no ensaio HET-CAM, classificando o produto como NÃ'O IRRITANTE, sugere que o a formulação é segura e não apresenta riscos eminentes de provocar reações adversas na pele/mucosa.

5.6. Avaliação da eficácia fotoprotetora

As formulações F3 e F4 foram avaliadas quanto à eficácia fotoprotetora *in vivo*, por meio da definição do FPS obtido em voluntários.

O estudo envolveu sujeitos de fototipo entre I e III e foi considerado válido com intervalo de confiança de 95%. As análises encontraram-se no intervalo da variação de ± 17% do FPS médio em função das formulações-teste e para o padrão, itens de acordo com as agências regulatórias (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011). A **Figura 14** descreve que a formulação F4 (EVM – 5,0% p/p) não apresentou aumento significativo de FPS em comparação com F3 (sem EVM).

Figura 14: Avaliação da eficácia fotoprotetora das formulações F3 (sem EVM) e F4 (EVM – 5,0% p/p)



Legenda: FPS – emulsão antissolar (F3); FPS+EVM5,0% - emulsão antissolar + 5,0% de EVM (F4).

De acordo com a **Figura 14,** as formulações não foram consideradas fotoprotetoras por não apresentarem FPS ≥ 6 (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011). Foi observado que F4 (emulsão com filtros solares orgânicos, inorgânicos e 5,0% EVM) não apresentou elevação na proteção desenvolvida, com possível explicação da formação de aglomerados que são imperceptíveis à visão, pelos bioativos em altas concentrações, que dificultariam o espalhamento da formulação sobre a superfície de atuação, proporcionando assim, interferência negativa sobre a formação de filmes sobre a pele e a não obtenção de resultados sinérgicos satisfatórios no perfil de FPS (NISHIKAWA, 2012).

As análises da avaliação da eficácia fotoprotetora *in vivo* das amostras F3 e F4, que apresentaram FPS inferiores aos obtidos na verificação da atividade fotoprotetora *in vitro*, foram realizadas 24 (vinte e quatro) semanas após o preparo das formulações. Segundo Magari (2004), as substâncias ativas presentes nas formulações podem apresentar processo de degradação durante o armazenamento, ocasionando alterações negativas nos parâmetros de estabilidade como viscosidade, eficácia dos conservantes, no comportamento reológico e no valor de FPS desenvolvido pelo produto final (GIANETTI et al., 2012; GUARATINI et al., 2009). Em estudo realizado por Seixas (2014), foi observado que a atividade catalítica dos filtros inorgânicos promove degradação dos filtros UV orgânicos e, o octocrileno (filtro UV) quando presente na mesma formulação que o dióxido de titânio, apresentou acentuada degradação. Fato que pode ter impactado negativamente na eficácia fotoprotetora *in vivo* de F3 e F4. A alta reatividade catalítica do filtro inorgânico pode explicar a possível degradação e não eficácia do composto bioativo presente na amostra F4 (LIMA; SERRA, 2013).

O método para obtenção do FPS avalia a proteção proporcionada nos comprimentos de onda UVB. Células da linhagem HaCaT foram previamente tratadas com EVM e irradiadas no intervalo do UVB, porém, não houve proteção das mesmas quanto aos efeitos nocivos causados pela radiação. No entanto quando expostas à radiação UVA, promoveu proteção significativa, evitando a formação de espécies reativas de oxigênio e inibindo o desencadeamento da reação de oxidação nos lipídeos da membrana celular (CALÒ, R., MARABINI, L. 2014). Fato corroborado com os resultados de Lima, Melo e Lima 2005 que demonstraram significativa

absorbância, na região do UVA, quando as antocianinas se encontravam em valor de pH 6,0; meio das formulações F3 e F4.

Referente aos bioativos presentes na formulação F4 e de acordo com Brouillard, Wigand e Dangles (1991), os flavonoides demostram alta absorbância na faixa de 250 a 270 nm (região UV) e, as antocianinas como as presentes no EVM, possuem intensa absorção na faixa de 520 a 560 nm (região visível), não atribuindo intensa absorção na região do UVB, o que justifica a não observação de aumento no FPS desenvolvido por F4.

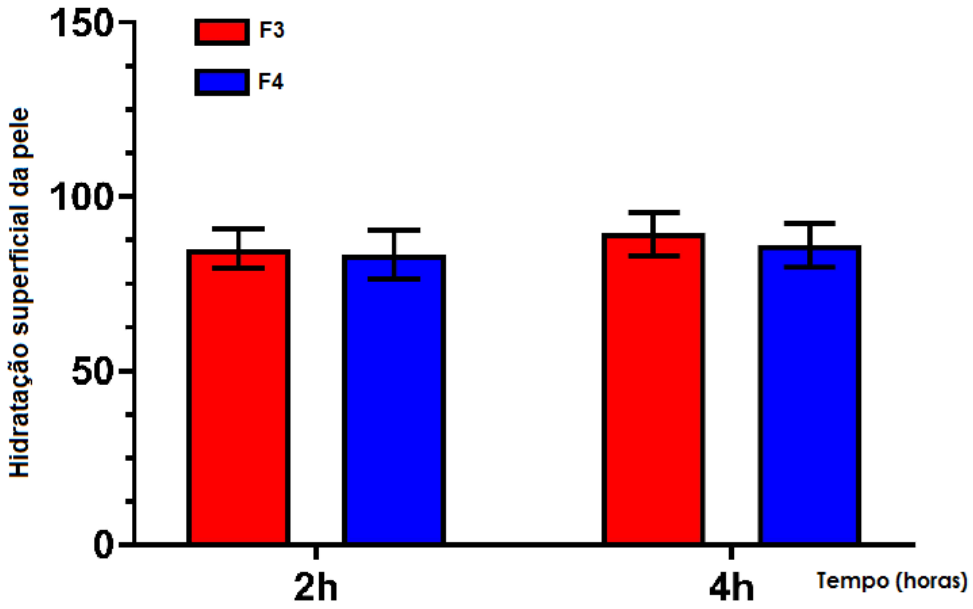
Os resultados obtidos no ensaio de FPS *in vivo* foram corroborados com os resultados obtidos por Daher, 2014 no qual a associação do extrato de açaí 5,0% em formulação fotoprotetora não propiciou acréscimo significativo no valor de FPS. Todavia, a formulação fotoprotetora contendo EVM apresentou proteção mais homogênea, quando comparada à mesma formulação fotoprotetora sem EVM.

5.7. Hidratação superficial da pele

O potencial de hidratação superficial da pele foi mensurado por meio da corneometria, utilizando água como controle negativo (PINNAGODA et al., 1990), em 20 voluntários do sexo feminino e masculino com idade entre 20 e 35 anos que foram selecionados de acordo com os termos de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo.

Foram avaliadas, quanto ao perfil de hidratação superficial da pele, as formulações F3 e F4 e o desempenho de ambas está descrito na **Figura 15.**

Figura 15: Perfil de Hidratação – Formulações Fotoprotetoras com e sem EVM (5,0%)



Legenda: F3 – emulsão antissolar; F4 - emulsão antissolar + 5,0% de EVM.

Os resultados demonstraram que o EVM não alterou a hidratação superficial da pele, por meio da formulação F4, mantendo-a por período de quatro horas. Segundo Velasco e colaboradores (2012) a adição de substâncias formadoras de filme, que possibilitassem a formação de uma camada oclusiva sobre a pele, poderiam alterar positivamente o perfil de hidratação superficial da pele. No presente estudo, pode-se inferir que a formação de filme promovida pela amostra não favoreceu a elevação da hidratação superficial da pele, por exemplo, pelo desenvolvimento de filme não adequadamente uniforme e não-oclusivo na superfície cutânea.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Preparo das formulações fotoprotetoras e estabilidade

Todas as emulsões preparadas, contendo ou não o extrato de *Vaccinium myrtillus* L. e octocrileno, MBBT e TiO_2, apresentaram valor de pH levemente ácido. O aspecto, a cor e o odor das amostras permaneceram macroscopicamente inalterados, após a estabilidade preliminar.

- Atividade antioxidante do Extrato de *Vaccinium myrtillus* L.

O EVM desenvolveu perfil antioxidante, comprovado pelo ensaio do DHPP, em diversas concentrações.

- Ensaios *in vitro*

A formulação F4, que continha 5,0% de EVM, foi testada quanto ao perfil de segurança pelo teste de HET-CAM e foi considerada não irritante. Por meio da determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro*, verificou-se que a presença do EVM reduziu a proteção anti-UVB. Referente ao parâmetro do comprimento de onda crítico, todas as amostras apresentaram valor superior à 370nm.

- Ensaios *in vivo*

O valor FPS das formulações F3 e F4, foram semelhantes e não apresentaram valores superiores a 15, portanto, não foram consideradas de amplo espectro de proteção. A formulação fotoprotetora F4, que continha 5,0% de EVM em sua composição, foi avaliada quanto ao perfil de hidratação e não alterou este parâmetro da pele, mantendo-a inalterada por período de quatro horas.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução - RDC nº 47, de 16 de março de 2006**. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes. Brasília, 2006. Diário oficial da República do Brasil, Poder Executivo, Brasília. p. 6-10.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasilia: Anvisa, 2004. v. 1, 45 p. (Séries temáticas da Anvisa. Qualidade em cosméticos, 1).

ALLTOX. Non-animal Methods for Toxicity Testing. **Table of Validated and Accepted Alternative Methods**. Validation & Regulatory Acceptance Status of Alternative Test Methods & Testing Strategies. Disponível em: http://www.alltox.org/ttrc/validation-ra/validated-ra-methods.html. Acesso em 23 oct 2016.

ANDERSEN, O. M.; CABRITA, L.; FOSSEN, T. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**, v. 63, n.4, p. 435-440, 1998.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568p.

ANTONIOU, C.; KOSMADAKI, M. G.; STRATIGOS, A. J.; KATSAMBAS, A. D. Sunscreens - what´s important to know. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, V. 22, p. 1110-1119, 2008.

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 151-158, 2002.

BABY, A. R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

BABY, A. R.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I.; VELASCO, M. V. R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catiguá* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 88, p. 1015-1019, 2005.

BALOGH, T. S.; VELASCO M. V. R.; PEDRIALI C .A.; KANEKO T. M.; BABY A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras. Dermatol**, v. 86, n.4, p. 732–742, 2011.

BLEIN,O; ADOLPHE,; LAKHDAR,B.;CAMBAR, J.GUBANSKI, G.;CASTELLI, D.; CONTIE,C.; HUBERT, F.; LATRILLE, F.; MASSON, P.; CLOUZEAU, J.; LE BIGOT, J.F.; De SILVA, O.; DOSSOU, K.G. Correlation and validation of alternatives to the Draize eye irrition test. **Toxicology *in vitro***, *v.5, p.* 555-557, 1991.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Química do processamento de alimentos: **Pigmento**s. 2ª ed.,Campinas: Varela, p 105-120, 1995

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M; MARTINI, M. C. Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 44-50, 1995.

BORDIGNON, C. L. Jr.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183, 2009.

BRACA, A., TOMMASI, N., BARI, L. D., PIZZA, C., POLITI, M., MORELLI, I.. Antioxidant principles from Bauhinia tarapotensis. **Journal of Natural Products**, v.64, n.1, p.892-895, 2001.

BRANDÃO, L. A. Index ABC: **ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. 3ª. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 1460p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n^{0}466, de 12 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília. 2012.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 317-33, 1998.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Foodchemistry,** v. 58, p.103-9, 1997.

B&T Company. 2010.

BROUILLARD, R. The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants, **Phytochemistry**, v. 22, p.1311–1323, 1983.

BROUILLARD, R.; WIGAND, M.C.; DANGLES, O. pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. **Journal Chemical Society Perkin Trans**. v.2, p.1235-1241, 1991.

CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista científica do ITPAC**, Araguaina, v. 4, n. 3, 2011.

CALÒ, R.; MARABINI, L. Protective effect of Vaccinium myrtillus extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). **J Photoch Photobio B, V. 132, p.**35, 2014

CASTAÑEDA-OVANDO, A. M. L.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. E.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, J. A. R.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of Anthocyanins: A review. **Food Chem**., v. 4, n. 113, p. 859-871, 2009.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilizations mechanisms of anthocyanins in model and food system – An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011.

CESTARI, T.F.; OLIVEIRA, F.B.; BOZA, J.C. Considerations on photoprotection and skin disorders. **Ann Dermatol Vener**, v.139, p.S135-S143, 2012.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Analysis of cosmetics products: UV filters in sunscreens and other cosmetics: **Regulatory aspects and analytical methods**. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. Cap.3, p.83-88.

CHORILLI, M.; UDO, M. S.; CAVALLINI, M. E.; LEONARDI, G. R. Desenvolvimento e estudos preliminares e estabilidade de formulações de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux® GAI-45 TS. **Rev. Ciênc. Farm. Básica** Apl., v.27, n. 3, p.237-246, 2006.

CORREA, M. A. **Cosmetologia ciência e técnica**. 1ª ed. São Paulo: Medfarma, 2012. 492p.

COSMETICS EUROPE. COLIPA. **Guidelines. International sun protection fator (SPF) test methods**. Auderghem; CTFA SA, JCIA, CTFA, p.46, 2006.

CRETU, g. C.; MORLOCK, G.E. Analysis of anthocyanins in powdered berry extract by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 146, p. 104-112, 2014.

DAHER, C.C. **Desenvolvimento de emulsões o/a contendo extrato glicólico de açaí e avaliação da atividade fotoprotetora**. 2014. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

DIFFEY, B.L.; TANNER, P.R.; MATTS, P.J.; NASH, J.F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of suscreen products. Journal **American Academy Dermatology**, v.43, n.6, p.1024-1035, 2000.

DROMGOOLE, S, H.; MAIBACH, H. I. Sunscreening agent intolerance: contact and photocontact sensitization and contact urticaria. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 22, p. 1068-1078, 1990.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p.109-120, 2011.

FEILD, T. S.; LEE, D. W.; HOLBROOK, N. M. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. **Plant Physiology**, v. 127, p. 566–574, 2001.

FITZPATRICK, T.B. Soleil et peau (Sun and skin). **Journal de Médecine Esthétique**, v.2, p.33-34, 1975.

FLOR, J.; DAVALOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153–158, 2007.

FREITAS, A. A. **Reatividade química e fotoquímica de antocianinas em sistemas organizados**. 2005. 208 f. Tese (Doutoramento em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

GIANETTI, M. D.; WAGEMAKER, T. A. L.; SEIXAS, V. C.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Benefits of combination of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetics formulations. **Molecules**, v. 17, p.2219-2230, 2012

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York, unit. F1.2, p. 1-13, 2001.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-626, 2008.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

HABÁNOVÁ, M.; HABÁN, M.; KOBIDOVÁ, R.; SCHWARZOVÁ, M.; GAŽO. Analysis of biologically active substances in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in selected natural localities of Slovak Republic. **Journal of Central European Agriculture**, v. 14, n. 3, p. 1210-1219, 2013.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.55, n.6, p.481-504, 2000.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

ICCVAM. **Iccvam test method evaluation report: current validation status of *in vitro* test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products. NHI Publication** No: 07-4517. Research Triangle Park, NC: NIEHS, 2010.

ICHIHASHI, M.; ANDO, H.; YOSHIDA, M.; NIKI, Y.; MATSUI, M. Photoaging of the skin. **Anti-Aging Medicine**, v .6, p. 46-59, 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa Incidência de câncer no Brasil, 2016. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 10 março. 2017.

JANSEN, R.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; OSTERWALDER, U.; LIM, H. W. Photoprotection. Part I. Photoprotection by naturally occurring physical, and systemic agentes. **J. Am Acad Dermatol**, v. 69, n. 6, p. 853.e1-e12, 2013

JAPAN. Ministry of Health and Welfare. **Standards for cosmetics**. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2000. (Notification N0331). Disponível

em:http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/0000032704.pdf. Acessado em: 14 abr 2016.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 628-633, 2003.

KALWEIT, S.; BESOKE, R.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. **Toxicology *in vitro***, v. 4, n. 4/5, p. 702-706, 1990.

KECHINSKI, C. P.; Guimarães, P. V,; Noreña, C. P.; Tessaro, I.C.; Marczak, L. D. Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 173–176, 2010.

KRAUSE, M; KLIT, A.; BLOMBERG, J, M.; SØEBORG, T.; FREDERIKSEN, H.; SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; SKAKKEBAEK, N. E.; DRZEWIECKI, K. T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 424-436, 2012.

KUSKOSKI, E. M.; AGUSTÍN, G. A.; PARILLA, M. C. G.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociânicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment,** v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. **Photoprotection.** The Lancet, v. 370, p. 528–537, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Correlação entre o teor de antocianinas e caracterização cromática de polpas de diferentes genótipos de aceroleira. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 1, p. 51-55, 2007.

LIMA, V. L.; MELO, E.; LIMA, D. Efeito da luz e da Temperatura de Congelamento sobre a Estabilidade das Antocianinas da Pitanga Roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p.553-559, 2005.

LIMA, V. L. A. G.; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M.S.; GOMES, P.B.; GUERRA, N.B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade federal rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 927-935, 2006.

LIMA, J.F.; SERRA, O.A. Cerium phosphate nanoparticles with low photocatalytic activity for UV light absorption in photoprotections. **Dyes and Pigments**, v.97, p.291-296, 2013.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291- 297, 2007.

LÓPEZ O. P.; JIMÉNEZ A. R.; VARGAS F. D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

MAGARI, R.T.; MUNOZ-ANTONI, I.; BAKER, J.; FLAGLER, D. J. Determining shelf life by comparing degradations at elevated temperatures. **J Clin Lab Anal**. v.18, n.3, p.159-164, 2004.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MANSUR, M.C.P.P.R.; LEITÃO, S.G.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.; VERMELHO, A.B.; SILVA, R.S.; PRESGRAVE, O.A.F.; LEITÃO, A.A.C.; LEITÃO, G.; RICCI-JUNIOR, E.; SANTOS, E.P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, n.2, p.251-258, 2016.

MARTÍNEZ-FLORES, S. Los flavonoides: propriedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin **Journal of Science and Technology**, v, 26, n.2, p.211-219, 2004.

NARAYAN, M. S.; AKHILENDER, N. K.; RAVISHANKAR, G. A.; SRINIVAS, L.; VENKATARAMAN, L. V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 60, n.1, p. 1-4, 1999.

NASH, J. F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 35-51, 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIROMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS). **ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT: *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. NHI Publication No: 07-4517**. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/oteval/otevalrpt.pdf>. Acesso em: 01 out.2016

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD E.; VAN HOORN D. E.; BOELENS P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**; v. 74, n .4, p. 418-25, 2001.

NISHIKAWA, D. O. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de formulações fotoprotetoras bioativas**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

OZCELIK, B.; LEE, J. H.; MIN, D. B. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, p. 487-490, 2003

PALM, M.; O'DONOGHUE, M. Update on photoprotection. **Dermatology Therapy**. v. 20, n. 5, p. 360-376, 2007.

PARK, K; LEE, J. Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. **Oncol. Rep.**, v. 19, n. 2, p. 413-417, 2008.

PERES, D.D.; ARIEDE, M.B.; CANDIDO, T.M.; DE ALMEIDA, T.S.; LOURENÇO, F.R.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEBO, T. M.; VELASCO, M.V.; BABY, A.R. Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experimente applied to the development of mulfuncional sunscreens. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. V.43, n.2, p.246-256, 2017.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v.63, n.7, p.1035-42, jul.2000.

PINNAGODA, J.; TUNKER, R. A.; AGNER, T.; SERUN, J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standartization Group of the European society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.22, 164-178p, 1990.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. **J Am Acad Dermatol**, v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

POLONINI, H. C.; LOPES, R. S.; BEATRIZ, A.; GOMES, R. S.; SILVA, A. O.; LIMA, R. V.; NUNES, G.A. A.; BRANDÃO, M. A.; RAPOSO, N. R. B.; LIMA, D. S. P. Synthesis and evaluation of octocrylene-inspired compounds for UV-filter activity. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1004-1009, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

RAI, R.; SHANMUGA, S. C.; SRINIVAS, C. R.; Update on photoprotection. **Indian J Dermatol**, v. 57, n. 5, p. 335–342, 2012.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. A cultura do Mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.). Pelotas: **Embrapa Clima temperado**, Documentos 121. n. 121, p. 69, 2004.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, p. 129-141, 2013.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: an overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 748-758, 2011.

SARAF, S.; KAUR, C. D. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. **Pharmacogn. Rev.**, v. 4, n. 7, p. 1-11, 2010.

SCHALKA, S.; ADDOR, F. Protetores solares. **Revista brasileira de medicina**. v. 65, p. 6-11, 2008.

SCHALKA, S.; ADDOR, F. A. S.; AGELUNE, C. M.; PEREIRA, V. M. C. Proteção oferecida por fotoprotetores contra luz visível – uma proposta de avaliação. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 3, n. 4, p. 45-52, 2012.

SEIXAS, V.C. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e eficácia de formulações cosméticas contendo fosfato de cério com propriedades fotoprotetoras. 2014. 154 f. Tese (Doutoramento em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2014.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH• antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.133, p.1202-1205, 2009.

SOUZA, F. P.; CAMPOS, G. R.; PACKER, J. F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 69-77, 2013.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K. F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 380, n. 2-3, p. 155-164, 1999.

TEIXEIRA, J.; GASPAR.; GARRIDO, E. M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview**. Biomed Res Int**, v. 20, p. 1-11, 2013.

TUCHINDA, C.; LIM, H. W.; OSTERWALDER, U.; ROUGER, A. Novel emerging sunscreen technologies. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 105-117, 2006.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CFR Parts 201 and 310. Labeling and effectiveness testing; sunscreens drug products for over-the-counter human use. **Federal Register**, v.76, n.117, p.35620-35665, 2011.

VEBERIC, R.; SLATNAR, A.; BIZJAK, J.; MIKULIC-PETKOVSEK, M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. LWT - **Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 509–517, 2015.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 23–27, 2008.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. **Revista de Ciênc Farm Básica Apl**., v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

VELASCO, M. V.; SARRUF, F. D.; OLIVEIRA, C. A.; SILVA, A. P. M.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 1, n. 9, p. 119-130, 2012

VIGUERA, C. G.; BRIDLE, P. Influence of structure on color stability of Anthocyanins and flavylium salts with ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 64, p. 21-26, 1999.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 36, n. 7, p. 829-837, 2004.

WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic therapy**, v. 23, n. 1, p. 31–47, 2010.

WU, T. H.; YEN, F. L.; LIN, L. T.; TSAI, T. R.; LIN, C. C.; CHAM, T. M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 160-168, 2008.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 9, p. 422-433, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 502-509, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – Currículo Lattes

Nadia Ruscinc

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/5947255357740667
Última atualização do currículo em 14/07/2016

Farmacêutica Industrial Pós Graduação em Cosmetologia. Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento de produtos cosméticos, higiene pessoal e maquiagem. Professora do curso de Pós Graduação em Farmácia Magistral, Enfermagem Dermatológica, Cosmiatria, Fitocosméticos e Fitoterapia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Nadia Ruscinc
Nome em citações bibliográficas	RUSCINC, Nadia

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015	Mestrado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica de fotoprotetores bioativos contendo extrato de Vaccinium myrtillus,Orientador: André Rolim Baby.
2001 - 2002	Especialização em Especialização em Cosmetologia. (Carga Horária: 90h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Especialização em Cosmetologia.
2000 - 2001	Especialização em Pós Graduação Lattu Sensu em Cosmetologia. (Carga Horária: 396h). Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil. Título: Desenvolvimento de Emulsões com Protetor Solar. Orientador: Maria Inês Harris.
2005 - 2006	Aperfeiçoamento em Aperfeiçoamento em Síntese de Biomateriais Aplica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Síntese de Derivados de Sacarose para Uso Cosmético. Ano de finalização: 2006. Orientador: Bronislaw Polakiewicz.
1985 - 1989	Graduação em Farmácia Industrial. Faculdades Osvaldo Cruz, FOC*, Brasil. Título: Farmacêutica.

Formação Complementar

2005 - 2005 Business English. (Carga horária: 360h).
Geos Language Academies, GEOS, Canadá.

Atuação Profissional

CCB Indústria e Comércio de Ltda, CCB, Brasil.

Vínculo institucional
2000 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional: Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cosmét, Carga horária: 20
Outras informações Gestora de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cosméticos, Higiene Pessoal e Maquiagem.
Atividades
10/2000 - Atual Pesquisa e desenvolvimento , CCB Indústria e Comércio de Ltda, .
Linhas de pesquisa
Cosméticos

Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil.

Vínculo institucional
2006 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional: Professor Assistente, Carga horária: 8

Outras informações Professora do Curso de Pós Graduação Latu Sensu em Farmácia Magistral
Atividades
03/2006 - Atual Ensino, Farmácia Magistral, Nível: Pós-Graduação
Disciplinas ministradas
Excipientes para a Farmácia Magistral
Fitoterápicos e Fitocosméticos na Farmácia Magistral
Incompatibilidades Farmacotécnicas
Manipulação Fórmulas Dermatológicas
Manipulação Fórmulas Odontológicas
Gerenciamento de Resíduos na Indústria de Cosméticos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Brasil.

Vínculo institucional
2010 - Atual Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 10
Outras informações Professora de Pós graduação de Fitoterápicos e Fitocosméticos

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

Vínculo institucional
2008 - Atual — Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor Convidado, Carga horária: 5
Outras informações — Prof. Pós Graduação em Enfermagem Dermatológica
Atividades
03/2008 - Atual — Ensino, Enfermagem Dermatológica, Nível: Pós-Graduação
Disciplinas ministradas
Funções da Pele -Barreira
Podiatria

Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Brasil.

Vínculo institucional
2009 - Atual — Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor convidado
Outras informações — Prof. convidado Curso Graduação Farmácia - Cosmetologia
Atividades
08/2009 - Atual — Ensino, Farmacia, Nível: Graduação
Disciplinas ministradas
Cosmetologia - Preparações de Fórmulas para Maquiagem
Cosmetologia - Nanotecnologia para Cosméticos

Terapeutica Farmácia de Manipulação, TERAP, Brasil.

Vínculo institucional
1992 - 1999 — Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Gerente de Laboratório Uso Dermatológico, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.
Atividades
02/1992 - 12/1999 — Serviços técnicos especializados , Terapeutica Farmácia de Manipulação, .
Serviço realizado
Desenvolvimento Farmacotécnico Uso Tópico.

Faculdade de Pindamonhangaba, FAPI, Brasil.

Vínculo institucional
2006 - 2010 — Vínculo: , Enquadramento Funcional: Professor Assistente, Carga horária: 4
Outras informações — Ministrante da Disciplina de Cosmetologia Teórico e Prática
Atividades
08/2006 - Atual — Ensino, Farmácia Bioquímica, Nível: Graduação
Disciplinas ministradas
Cosmetologia

Centro de Est. em Enfermagem Saúde Coletiva e Orient. Profissional, CEDESCOP, Brasil.

Vínculo institucional
2008 - Atual — Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: colaborador
Outras informações — Docente no curso de Pós-graduação em Fitocosméticos e Fitoterápicos

Linhas de pesquisa

1. Cosméticos

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica/Especialidade: Cosméticos.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Formulario Magistral Dermatologia.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Farmacotecnia.
4. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Análise e Controle de Medicamentos.
5. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Enfermagem.
6. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Odontologia / Subárea: Formulario Magistral Odontologia.

Idiomas

Alemão — Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.
Espanhol — Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês — Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2006 — 3º Lugar Pôster "Síntese de moléculas derivadas de rutina com potencial de fotoproteção (FPS) para emprego em dermocosméticos", Associação Brasileira de Cosmetologia.

Produções

Produção bibliográfica

Livros publicados/organizados ou edições

1. José Antonio Batisttuzzo ; **RUSCINC, Nadia** . Formulário Médico Farmacêutico 5ª Edição Revista e Ampliada. 5ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. v. 1. 812p .
2. Meyer, Augusto Cesar de Andrade ; José Antonio Batisttuzzo ; **RUSCINC, Nadia** . Manual Odontológico de Formulações Manipuladas. 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 2007. v. 1.
3. José Antonio Batisttuzzo ; **RUSCINC, Nadia** . Formulário Médico Farmacêutico 3ª Ed. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006. v. 1. 670p .
4. **RUSCINC, Nadia**. Formulário Médico Farmacêutico. 2. ed. São Paulo: Tecnopress, 2002. v. 1.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. **RUSCINC, Nadia.** Síntese de Derivados de Sacarose para Uso Cosmético. In: 20º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2006, São Paulo. Sintese de Derivados de Sacarose para uso cosmético, 2006.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **RUSCINC, Nadia.** Síntese de Derivados da Sacarose para Uso Cosmético. In: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF USP, 2005, São Paulo. X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF USP. São Paulo: Biblioteca do Conjunto das Químicas, 2005.
2. ARAUJO, C. B. F. ; **RUSCINC, Nadia** ; Bronislaw Polakiewicz . Synthesis of soluble derivates of Beta escin. In: International Congress of Pharmaceutical Science, 2005, Ribeirão Preto. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science. São Paulo: Biblioteca do Conjunto das Químicas, 2005. v. 41. p. 417-417.

Demais tipos de produção técnica

1. **RUSCINC, Nadia.** Qualidade de vida na melhor idade. 2007. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
2. **RUSCINC, Nadia.** Incompatibilidade e Estabilidade de Substâncias na mesma Formulação. 2006. .
3. **RUSCINC, Nadia.** Cuidados com a Pele: Prevenção e Recuperação. 2006. .
4. **RUSCINC, Nadia.** Aplicação de pigmentos em formulações dermatológicas. 2002. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Reunião Científica da Sociedade Brasileira de Enfermagem em Dermatologia.Feridas - Prevenção e Recuperação da Pele. 2013. (Simpósio).
2. SEFARM - UFMG.Cosmetologia Magistral. 2012. (Simpósio).
3. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira/ANVISA.Formulações para comporem o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira. 2010. (Encontro).

Orientações

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Diego Henrique de Lima Souza. Extração de Óleo Essencial de Gengibre para Formulação de Perfume. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Paraíba. Orientador: Nadia Ruscinc.
2. Amanda Auxiliadora do Prado. Uso da Papaína em Cicatrização: uma revisão de literatura. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia Bioquímica) - Faculdade de Pindamonhangaba. Orientador: Nadia Ruscinc.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 10/01/2018 às 16:51:35

ANEXO B: Ficha do Aluno

NUSP: 4777196 Nome: Nadia Ruscinc

Ficha do Aluno

	Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
	Especial	Tecnologia Químico-Farmacêutica (9135)	2		
	Especial	Produção e Controle Farmacêuticos (9139)	1		
	Especial	Insumos Farmacêuticos (9138)	1		
➔	Mestrado	Produção e Controle Farmacêuticos (9139)	2	Matrícula Regular	

Preparar para imprimir

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 4777196/2 - Nadia Ruscinc

Email:	nadia_13@usp.br
Data de Nascimento:	10/01/1967
Cédula de Identidade:	RG - 14.164.756-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 1991

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	15/07/2015
Início da Contagem de Prazo:	15/07/2015
Data Limite para o Depósito:	15/01/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 15/07/2015 até o presente. Email: andrerb@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/07/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 31/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 15/07/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula Regular em 06/07/2017
Impresso em: 10/01/2018 19:23:29

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 4777196/2 - Nadia Ruscinc

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	75	A	N	Concluída
FBF5777-3/5	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/08/2015	25/11/2015	45	3	87	A	N	Concluída
FBF5756-4/2	Segurança Biológica de Produtos Farmacêuticos	02/03/2016	05/04/2016	90	6	90	A	N	Concluída
FBF5704-6/4	Análise Espectrométrica de Fármacos	02/03/2016	14/06/2016	150	10	95	A	N	Concluída
QBQ5733-8/1	Radicais Livres em Sistemas Biológicos (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	06/04/2016	28/06/2016	180	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5778-2/2	Estudos Biofarmacotécnicos para Avaliação in vitro da Permeabilidade de Fármacos e Candidatos a Fármacos Empregando Culturas Celulares	18/05/2016	28/06/2016	60	4	85	A	N	Concluída
FBF5779-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	07/07/2017	07/09/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5830-1/1	Formulações Cosméticas e Dermatológicas: Aspectos Clínicos	09/10/2017	12/11/2017	75	5	80	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	40
Estágios:			
Total:	0	25	40

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 06/07/2017
Impresso em: 10/01/2018 19:23:29

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 4777196/2 - Nadia Ruscinc

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3755071	André Rolim Baby	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula Regular em 06/07/2017
Impresso em: 10/01/2018 19:23:29

ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – para o ensaio de Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR - FPS

I. Nome do participante_____

Documento de Identidade (tipo) _____ Nº _____ Sexo: ( ) M ( ) F

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ___ / ___ / _____

Endereço:_____

Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____

Cidade:_____ Estado: _____

Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

II. **DADOS SOBRE A PESQUISA**

Título da Pesquisa: Caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica de fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.)

1. **Pesquisador responsável**: André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033
Nº de registro do Conselho Regional de Farmácia: CRF-SP 30976
Cargo/Função: Professor Doutor da Universidade de São Paulo
Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia

Colaboradora: Nadia Ruscinc / fone (12)40092730 e (12)982089400
Cargo/Função: Mestranda Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia

Colaboradora: Leila Bloch /fone: (11) 2609-4000/(11) 97030-2777
Cargo/Função: Dermatologista / Médica responsável CRM: 108.287
Responsável pela aplicação do TCLE
Empresa: IPclin Pesquisa Integrada

2. Avaliação do risco da pesquisa

Risco Mínimo (X)

3. Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

4. Duração da Pesquisa: 2 dias

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR - FPS

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE DO TESTE SOBRE A PESQUISA:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

Este trabalho se propõe avaliar a eficácia das formulações dermocosméticas fotoprotetoras por meio da determinação do fator de proteção solar (FPS).

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos experimentais:

- Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Pedimos que leia detalhadamente esse Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você).
- Todas as dúvidas surgidas durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.
- Para a realização deste teste serão convidados 20 participantes, sendo 10 participantes avaliáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos e que queiram participar desta pesquisa.
- Para a realização deste teste, você comparecerá ao Instituto de Pesquisa em dois dias consecutivos.
- No primeiro dia você virá ao Instituto para uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação do(s) produto(s), que estão sendo avaliados nessa pesquisa, em suas costas.
- Após 20 minutos da aplicação, a área contendo o(s) produto(s) avaliados nessa pesquisa será exposta (durante 1 a 3 minutos) a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar (UVB) emitida pelo sol em um dia ensolarado.
- Adicionalmente, uma área de suas costas que não foi utilizada para aplicação do(s) produto(s) avaliados nessa pesquisa, será utilizada como controle do teste, e também será exposta (durante 1 a 3 minutos) à fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. A intensidade dessa radiação será aumentada em progressão geométrica (com aumento constante) e este ensaio terá a duração de 1 a 3 minutos apenas, causando pouco e suportável desconforto, semelhante ao contato com uma superfície quente durante poucos minutos. Por se tratar de um teste de curta duração, não será necessário que você realize refeições no local onde está sendo realizado o teste (Instituo de Pesquisa).

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

- No dia seguinte você deverá retornar ao Instituto de Pesquisa para que seja realizado o exame das áreas expostas à fonte emissora de luz que reproduziu a radiação solar.

Solicitamos que durante o período do teste você siga algumas recomendações e somente se concordar deverá assinar este termo de consentimento livre e esclarecido:

- Não estar grávida ou com intenção de engravidar durante o teste;
- Não alterar hábitos cosméticos, de higiene, de dieta e de exercícios;
- Evitar prática intensiva de esportes;
- Evitar exposição solar intensa, banhos de mar ou piscina durante todo o teste;
- Não alterar o tratamento hormonal, nem o método contraceptivo medicamentoso;
- Não utilizar medicações de uso tópico ou sistêmico: anti-inflamatórios não hormonais de uso contínuo (a ser avaliado pelo médico responsável); corticoides; anti-histamínicos; imunossupressores; vitamina A ácida;
- Não realizar tratamento estético, cosmiátrico ou dermatológico;
- Não retirar ou molhar o adesivo;
- Não usar produtos cosméticos próximos à área do teste;
- Não se vacinar durante o teste;
- Evitar roupas muito justas para não tirar o adesivo e não irritar a pele.

3. Desconforto e riscos esperados

Todas as substâncias que compõem o produto são regularmente utilizadas em formulações de produtos cosméticos e são consideradas seguras para a finalidade (uso cosmético para proteção da pele) que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica (o produto permanece na superfície da pele, apenas com efeito local) dos produtos avaliados nessa pesquisa, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato (reação inflamatória na pele quando exposta a um agente capaz de causar irritação) e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista, durante todas as etapas do teste. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiai / SP, CEP:13209-410, telefone: (11)4087-0092 (horário comercial) ou com o pesquisador responsável Dr.ª Leila Bloch (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre segurança e eficácia de produtos cosméticos.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DE PESQUISA

- Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

- Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento do teste, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento e deixar de participar do teste, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

- Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este teste, poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do teste forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

- Garantimos que eventuais despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone (11)4087-0092 (horário comercial) ou telefone da Dr.ª Leila Bloch (11) 97030-2777.

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo (Rua São Vicente de Paulo. 223 – Centro – Jundiaí – São Paulo, CEP.:13201-625, telefone (11) 4583-8155), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR - FPS

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do participante da Pesquisa Assinatura do responsável por aplicar o TCLE

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com: ***Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo*** *– Av Prof Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900, Telefone (11) 3091-3677 – e-mail:* ***cepfcf@usp.br****.*

ANEXO D: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – para o ensaio de Hidratação Cutânea

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA PELE

I. Nome do participante_____

Documento de Identidade (tipo) _____ Nº _____ Sexo: ( ) M ( ) F

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ___ / ___ / _____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

II. **DADOS SOBRE A PESQUISA**

Título da Pesquisa: Caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica de fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.)

1. **Pesquisador responsável**: André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033
Nº de registro do Conselho Regional de Farmácia: CRF-SP 30976
Cargo/Função: Professor Doutor da Universidade de São Paulo
Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia

Colaboradora: Nadia Ruscinc / fone (12)40092730 e (12)982089400
Cargo/Função: Mestranda Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia

Colaboradora: Leila Bloch /fone: (11) 2609-4000/(11) 97030-2777
Cargo/Função: Dermatologista / Médica responsável CRM: 108.287
Responsável pela aplicação do TCLE
Empresa: IPclin Pesquisa Integrada

2. Avaliação do risco da pesquisa

Risco Mínimo (X)

3. Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

4. Duração da Pesquisa: 2 dias (9 horas no primeiro dia e 1 hora no segundo dia)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA PELE

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE DO TESTE SOBRE A PESQUISA:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a hidratação da pele após a aplicação de produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o teste serão prontamente esclarecidas.

Para a realização deste teste, você comparecerá ao local da pesquisa dois dias consecutivos, permanecendo no local por um período de 9 (nove) horas no primeiro dia e 1(uma) hora no segundo dia.

No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele. Se você atender aos requisitos para o teste, você ficará durante 30 minutos em uma sala gelada, com temperatura e umidade relativa do ar, a 20,0 ± 2,0°C e 45,0 ± 5,0%, respectivamente, e então será feito um exame inicial no seu antebraço com auxílio da sonda de um equipamento. Esta medição é feita encostando o equipamento na região a ser medida por alguns segundos e não causará nenhum tipo de desconforto. Após este exame, os produtos serão aplicados em uma região do antebraço e novas medidas serão feitas após 2, 4 e 8 horas. Após esta etapa, você será orientado sobre o horário que deverá comparecer no próximo dia e poderá deixar as dependências do local da pesquisa. Durante o período de permanência na instituição, será oferecida refeição.

No segundo dia, a última medição será realizada (24 horas após a aplicação do produto) e após esta etapa, você poderá deixar as dependências do local da pesquisa definitivamente. Os resultados obtidos através do equipamento serão posteriormente avaliados, por pesquisadores treinados, para determinação da hidratação natural da pele (exame inicial) e também da hidratação da pele após tratamento com o(s) fotoprotetor(es) na área de aplicação.

Todas as substâncias que compõem o produto são regularmente utilizadas em formulações de produtos cosméticos e são consideradas seguras para a finalidade (uso cosmético para proteção da pele) que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica (o produto permanece na superfície da pele, apenas com efeito local) dos produtos avaliados nessa pesquisa, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato (reação inflamatória na pele quando exposta a um agente capaz de causar irritação) e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista, durante todas as etapas do teste. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP:13209 410, telefone: (11)4087-0092 (horário comercial) ou com o pesquisador responsável Dr.ª Leila Bloch (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA PELE

Solicitamos que durante o período de teste (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização), você siga algumas recomendações e somente se concordar deverá assinar este termo de consentimento livre e esclarecido:

- Não estar grávida ou com intenção de engravidar durante o teste;
- Não alterar hábitos cosméticos, de higiene, de dieta e de exercícios;
- Evitar prática intensiva de esportes;
- Evitar exposição solar intensa, banhos de mar ou piscina durante todo o teste;
- Não alterar o tratamento hormonal, nem o método contraceptivo medicamentoso;
- Não utilizar medicações de uso tópico ou sistêmico: anti-inflamatórios não hormonais de uso contínuo (a ser avaliado pelo médico responsável); corticoides; antihistamínicos; imunossupressores; vitamina A ácida;
- Não realizar tratamento estético, cosmiátrico ou dermatológico;
- Não retirar ou molhar o adesivo;
- Não usar produtos cosméticos próximos à área do teste;
- Não se vacinar durante o teste;
- Evitar roupas muito justas para não tirar o adesivo e não irritar a pele.

3. Desconforto e riscos esperados

Todas as substâncias que compõem o produto são regularmente utilizadas em formulações de produtos cosméticos e são consideradas seguras para a finalidade (uso cosmético para proteção da pele) que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica (o produto permanece na superfície da pele, apenas com efeito local) dos produtos avaliados nessa pesquisa, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato (reação inflamatória na pele quando exposta a um agente capaz de causar irritação) e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista, durante todas as etapas do teste. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP:13209-410, telefone: (11)4087-0092 (horário comercial) ou com o pesquisador responsável Dr.ª Leila Bloch (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre segurança e eficácia de produtos cosméticos.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA PELE

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

- Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

- Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento do teste, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento e deixar de participar do teste, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

- Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este teste poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do teste forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

- Garantimos que eventuais despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone (11)4087-0092 (horário comercial) ou telefone da Dr.ª Leila Bloch (11) 97030-2777.

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo (Rua São Vicente de Paulo. 223 – Centro – Jundiaí – São Paulo, CEP.:13201-625, telefone (11) 4583-8155), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DETERMINAÇÃO DA HIDRATAÇÃO DA PELE

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do participante da Pesquisa Assinatura do responsável por aplicar o TCLE

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com: ***Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo*** *– Av Prof Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900, Telefone (11) 3091-3677 – e-mail:* ***cepfcf@usp.br****.*

ANEXO E: Certificado de Análise do Insumo*: Vaccinium myrtillus* L.

ActivePharmaceutica

CERTIFICADO DE ANÁLISES N° 87/14
INSUMO: **BILBERRY P.E.**
NOME BOTÂNICO: *Vaccinium myrtillus* L.
MÉTODO DE EXTRAÇÃO: Extraído com etanol e água em *Spray Dry*
LOTE: HK140413-A
ORIGEM: China
FABRICAÇÃO: 13/04/ 2014 VALIDADE: 13/04/2017

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Descrição	Pó fino roxo escuro com odor e sabor característicos.	Conforme
Antocianidinas (UV)	25%	25.02%
Perda por dessecação	<5.0%	3.22%
Cinzas	<10.0%	4.50%
Resíduos de solvente	<0.05%	Conforme
Solubilidade (USP 36)	Solúvel em água	Conforme
Tamanho de Partícula	100% deve passar em malha 80	Conforme
Metais Pesados	< 10 ppm	Conforme
Arsênico	< 0.5 ppm	Conforme
Chumbo	< 0.5 ppm	Conforme
Cadmio	< 0.5 ppm	Conforme
Mercúrio	Não detectar	Conforme
Microbiológico:		
Contagem total	< 1000ufc/g	< 10ufc/g
Bolores e Leveduras	< 100ufc/g	< 10ufc/g
Samonella	Negativo	Conforme
E. Coli	Negativo	Conforme
Staphylococcus	Negativo	Conforme

Referências: FABRICANTE

Parecer: Extrato vegetal conforme especificações.

Armazenamento: Conservar em recipientes bem fechados ao abrigo de luz, calor e umidade.

Responsável Técnica: Francielly Grassi – CRF/SC 3557 Francielly Grassi CRF-SC 3557

São José, 12 de dezembro de 2014.

Rua Palmira Laura Florêncio, 1997 – Real Parque – São José – Santa Catarina – CEP 88113-320
www.activepharmaceutica.com.br - Telefone: (48) 3207-7049
CNPJ: 09.026.759/0001-18