



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ÉRIKA SABÓIA GUERRA DIÓGENES

ANÁLISE DA ATIVIDADE CLAREADORA, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA
DO EXTRATO AQUOSO DE *Myracrodruon urundeuva* E DESENVOLVIMENTO
DE UM SÉRUM FACIAL MULTIFUNCIONAL

FORTALEZA
2023

ÉRIKA SABÓIA GUERRA DIÓGENES

ANÁLISE DA ATIVIDADE CLAREADORA, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA
DO EXTRATO AQUOSO DE *Myracrodruon urundeuva* E DESENVOLVIMENTO DE
UM SÉRUM FACIAL MULTIFUNCIONAL

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Nicolete
(Fundação Oswaldo Cruz e Universidade Federal do Ceará)

Coorientadora: Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo (Universidade Federal do Ceará)

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D622a Diógenes, Érika Sabóia Guerra.

Análise da atividade clareadora, antioxidante e fotoprotetora do extrato aquoso de Myracrodruon urundeuva e desenvolvimento de um sêrum facial multifuncional / Érika Sabóia Guerra Diógenes. – 2023.

119 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - Associação UFC/UFPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Roberto Nicolete.

Coorientação: Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo.

1. Aroeira-do-sertão. 2. Melasma. 3. Clareador. I. Título.

CDD 615.1

ÉRIKA SABÓIA GUERRA DIÓGENES

ANÁLISE DA ATIVIDADE CLAREADORA, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO DE *Myracrodruon urundeuva* E DESENVOLVIMENTO DE UM SÉRUM FACIAL MULTIFUNCIONAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Roberto Nicolete

Edilson Martins Rodrigues Neto

Mary Anne Medeiros Bandeira

Bianca Oliveira Louchard

Angelo Roncalli Alves e Silva

A Deus,
Aos meus pais,
A minha irmã,
A minha família e amigos
E aos meus professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida, por minha saúde e por colocar no meu caminho tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais Regina Diógenes e Robério Diógenes que nunca mediram esforços para a minha educação e são os meus maiores incentivadores.

A minha irmã e sócia Marília Guerra, por tudo que representa na minha vida, por ser sempre amparo e estar presente.

A minha orientadora professora Tamara Gonçalves por ter acreditado em mim desde a graduação, sempre orientando da forma mais engrandecedora possível. Por ser exemplo de postura e profissionalismo, na qual me inspiro bastante.

Ao meu orientador professor Roberto Nicolete por esses anos de dedicação, sempre disponível para o avanço deste trabalho.

A Farmácia Escola, local que sempre estive de portas abertas para esta pesquisa. A todos que fazem parte e, em especial, à professora Cristiani Lopes, à Dra. Socorro Vieira e à Janete Lima.

Ao Centro Nordestino de aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) e ao professor Edilberto Silveira, grande exemplo de pesquisador e de dedicação ao trabalho, que tanto me ensinou e contribuiu com esta pesquisa.

A todos os alunos do LabCos, laboratório a qual faço parte com muito orgulho. Em especial à Laís Coelho que estive comigo durante quase todos os experimentos. Agradeço também a Rebeca Lima e ao Pedro Igor.

À Nayara Aquino por todo o trabalho desenvolvido no seu doutorado e que serviram de base para este.

Aos parceiros que brilhantemente contribuíram com esta pesquisa, em especial: Dr. Cirineu Neto, professora Kalyne Leal, professora Nylane Alencar, Liviane Rabelo, Dra. Edilene Gadêlha, professora Davila Zampieiri e ao Centro de Desenvolvimento e Ensaios Farmacêuticos – CEDEFAR.

A todos os professores do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará e da Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPgDITM).

Aos funcionários do Departamento de Farmácia e do PPgDITM, em especial à Jéssica Castro.

A minha empresa mQSi, na verdade, em ordem invertida. O mQSi que é grato a todo o aprendizado durante este projeto, pois foram fundamentais para a sua fundação e desenvolvimento.

A minha amiga Lídia que tanto me incentivou para que eu desse esse passo de ingressar no doutorado, e não mediu esforços para me ajudar.

A minha família, aos meus da amigos de graduação, em especial Allana Bezerra.

A todos os problemas e momentos difíceis que enfrentei até aqui, pois sempre foi Deus me fortalecendo e me preparando.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do meu projeto e da bolsa de doutorado.

Além desses, agradeço a todos os amigos e familiares que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. A todos vocês o meu muito obrigada!

RESUMO

ANÁLISE DA ATIVIDADE CLAREADORA, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO DE *Myracrodruon urundeuva* E DESENVOLVIMENTO DE UM SÉRUM FACIAL MULTIFUNCIONAL

Myracrodruon urundeuva Fr. Allem. é a designação científica para a aroeira-do-sertão, uma árvore de grande porte, com tronco alto, linheiro. Pertencente à família Anacardiaceae, ocorre na caatinga e matas secas, desde o Ceará até os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul. O uso é bastante comum no tratamento de afecções cutâneas, problemas relacionados com doenças respiratórias e urinárias, além de excelente “banho-de-assento” no pós-parto e em outros problemas ginecológicos. O melasma possui uma patogênese multifatorial, as manchas melânicas ocorrem, em geral, devido a um aumento na pigmentação local e o seu tratamento deve incluir uma abordagem multimodal com terapêutica combinada que incorpore agentes clareadores, antioxidantes e fotoprotetores. Assim, o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de um sérum facial com ação clareadora com o extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (EAFMU). Inicialmente, realizou-se análise química do EAFMU através de ressonância magnética nuclear; quantificação de fenóis totais, de flavonoides, caracterização físico-químicas e organolépticas. Pelo fato das hiperpigmentações poderem ser de origem multifatoriais, foi analisada a inibição da enzima tirosinase, assim como a capacidade quelante uma vez que a enzima é cupro-dependente. Avaliou-se também a ação antioxidante pelos métodos de TBARS, DPPH e pelo radical hidroxil. Foi realizada a varredura nos comprimentos de onda equivalentes ao UVB e UVA (280 a 400 nm), dessa forma pode-se fazer a comparação com o espectro obtido do padrão benzofenona-3 nos mesmos comprimentos de onda; e através da metodologia de Mansur, obteve-se o FPS do EAFMU e padrão. Avaliou-se a segurança do extrato através do ensaio citotoxicidade em células de fibroblastos murinos pelo método da sulforodamina B. Posteriormente, foi realizado o estudo para o desenvolvimento do sérum facial (SFMU) sendo realizado o estudo de pH, viscosidade, densidade, teste de centrifugação e ensaio de estabilidade preliminar e acelerada. O SFMU e o Branco (sérum sem o extrato) foram avaliados em seis tempos diferentes, em temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0$ °C), temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura alta ($40,0 \pm 2,0$ °C). A segurança da formulação foi realizada por *patch*

test. O EAFMU demonstrou excelente ação inibidora da tirosinase, sendo que na concentração de 1.500 µg/mL inibiu 76,48% da enzima enquanto o ácido kójico na mesma concentração inibiu 96,16%; foi demonstrado também que o extrato agiu quelando o íon cobre. Nos três ensaios antioxidantes o EAFMU demonstrou satisfatória atividade *in vitro*; na concentração de 50 µg/mL inibiu 49,59% das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; 76,46% do radical DPPH e 51,07% do radical hidroxila. Em relação à proteção contra os raios ultravioletas, o EAFMU e a benzofenona-3 apresentaram FPS de 14,43 e 20,39, respectivamente. A formulação foi desenvolvida usando 1% de EAFMU, os parâmetros foram organolépticos (aspecto, cor e odor); físico-químicos (viscosidade, densidade e pH); e químico (quantificação de ácido gálico). A formulação apresentou-se segura através do ensaio *patch test*, ou seja, o produto não induziu processo de irritação e sensibilização cutânea; também se demonstrou estável. Dessa forma, a aroeira-do-sertão, planta tão usada para diversas finalidades, sobretudo no sertão nordestino, mostrou ter o potencial clareador de melasma.

Palavras-chave: Aroeira-do-sertão; melasma; clareador.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE WHITENING, ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY OF THE AQUEOUS EXTRACT OF *Myracrodruon urundeuva* AND DEVELOPMENT OF A MULTIFUNCTIONAL FACIAL SERUM

Myracrodruon urundeuva Fr. Allem. is the scientific designation for the aroeira-do-sertão, a large tree, with a tall trunk, straight. It belongs to the Anacardiaceae family and occurs in the caatinga and dry forests, from Ceará to the states of Paraná and Mato Grosso do Sul. Its use is common in the treatment of skin disorders, problems related to respiratory and urinary diseases, as well as an excellent "sitz bath" in postpartum and other gynecological problems. Melasma has a multifactorial pathogenesis. Melanic patches occur, in general, due to an increase in local pigmentation and its treatment must include a multimodal approach with combined therapy that incorporates bleaching agents, antioxidants and photoprotectors. Thus, the present study aims to develop a facial serum with whitening action with the aqueous extract of the leaves of *Myracrodruon urundeuva* (EAFMU). Initially, a phytochemical analysis of the EAFMU was carried out using nuclear magnetic resonance, quantification of total phenolic compounds, flavonoids and physicochemical and organoleptic characterization

. Because hyperchromia is related to a multifactorial origin, the inhibition of the tyrosinase enzyme was analyzed, as well as the chelating capacity, since the enzyme is cupro-dependent. The antioxidant effect was also evaluated by the TBARS, DPPH and hydroxyl radical methods. Scanning was carried out at wavelengths equivalent to UVB and UVA (280 to 400 nm), so a comparison can be made with the spectrum obtained from the benzophenone-3 standard at the same wavelengths; and through Mansur's methodology, the FPS of the EAFMU and standard was obtained. The safety of the extract was evaluated through the cytotoxicity assay in murine fibroblast cells by the Sulforhodamine B method. Subsequently, the facial serum development study (SFMU) was carried out, with the study of pH, viscosity, density, centrifugation test and preliminary and accelerated stability testing. SFMU and the blank (serum without extract) were evaluated at six different times, at low temperature ($5,0 \pm 2,0$ °C), room temperature ($25,0 \pm 2,0$ °C), and high temperature ($40,0 \pm 2,0$ °C). Formulation safety

was performed by patch test. EAFMU showed excellent tyrosinase inhibitory action, and at a concentration of 1,500 µg/mL inhibited 76.48% of the enzyme, while kojic acid at the same concentration inhibited 96.16%. It was also demonstrated that the extract acted by chelating the copper ion. In the three antioxidant assays, EAFMU demonstrated satisfactory in vitro activity: at a concentration of 50 µg/mL, it inhibited 49.59% of substances reactive to thiobarbituric acid; 76.46% of the DPPH radical and 51.07% of the hydroxyl radical. Regarding protection against ultraviolet rays, EAFMU and benzophenone-3 showed SPF of 14.43 and 20.39, respectively. The formulation was developed using 1% EAFMU, the parameters evaluated were organoleptic (appearance, color and odor); physical-chemical (viscosity, density and pH); microscopy and chemical (gallic acid quantification). The formulation was shown to be safe through the patch test, that is, the product did not induce skin irritation and sensitization; as well as being stable. In this way, the aroeira-do-sertão, a plant that is commonly used for various purposes, especially in the northeastern hinterland, proved to have the potential to whiten melasma.

Keywords: Aroeira-do-sertão; melasma; whitening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Myracrodruon urundeuva</i> (1- árvore, 2 – folhas)	19
Figura 2 – Locais no Brasil identificados de ocorrência natural de aroeira-do-sertão (<i>Myracrodruon urundeuva</i>),.....	19
Figura 3 - Esquema de biossíntese dos pigmentos eumelanina e feumelanina	26
Figura 4 - Estrutura da enzima tirosinase	27
Figura 5 - Representação do fototipo pigmentar da Escala de Fitzpatrick.....	28
Figura 6 - Espectro do EAFMU obtido por RMN ¹ H	54
Figura 7 - Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS a 785 nm	56
Figura 8 - Curva de calibração da rutina obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS a 785 nm.....	57
Figura 9 - EAFMU - Extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> liofilizado (extrato seco)	58
Figura 10 - Comparação da inibição de Tirosinase pelo Ácido Kójico e EAFMU nos tempos de 30 e 60 minutos	59
Figura 11 - Taxa de inibição de Tirosinase de acordo com o tempo e as concentrações de Ácido Kójico e EAFMU.....	59
Figura 12 - Espectros de absorção de UV/VIS do EAFMU (A) e ácido kójico (B) com e sem CuSO ₄ para avaliação capacidade quelante de íons de cobre	60
Figura 13 - Avaliação da atividade antioxidante do EAFMU e do trolox através da metodologia de TBARS.....	60
Figura 14 - Avaliação da atividade antioxidante do EAFMU e da vitamina C através da metodologia de DPPH.....	61
Figura 15 - Avaliação da atividade antioxidante do EAFMU através da metodologia do radical hidroxil	62
Figura 16 - Varredura do EAFMU e da Benzofenona-3 nos comprimentos de onda de 280 a 400 nm	62
Figura 17 - Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com EAFMU pelo método de SRB, após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (c).....	64
Figura 18 - Avaliação da compatibilidade do EAFMU com os agentes de viscosidade	65
Figura 19 - Análise visual da mudança da cor do SFMU nos pH de 4,0 a 9,5.....	65

Figura 20 - Teste de centrifugação do SFMU e Branco.....	67
Figura 21 - Cor do SFMU e Branco nos tempos T0, T7, T15, T30, T60 e T90.....	70
Figura 22 - Regressão linear do estudo de estabilidade do pH, viscosidade e densidade do SFMU e Branco	71
Figura 23 - Curva de calibração do ácido gálico obtida por CLAE.....	72
Figura 24- Regressão linear da densidade da concentração de ácido gálico.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas dos compostos isolados do EAFMU.....	21
Tabela 2 - Classificação dos fototipos de pele segundo Fitzpatrick.....	28
Tabela 3 - Artigos encontrados em cada base de dados.....	38
Tabela 4 - Formulação quali e quantitativa do SFMU e função dos ingredientes.....	48
Tabela 5 - Concentração de fenóis totais do EAFMU obtidos por espectrofotometria UV/VIS a 785 nm.....	55
Tabela 6 - Absorbância do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria UV/VIS a 785 nm	55
Tabela 7 - Concentração de flavonoides do EAFMU obtidos por espectrofotometria UV/VIS a 415 nm.....	56
Tabela 8 - Valores de absorbância, concentração de flavonoides e percentual do ELFLF obtidos por espectrofotometria UV-VIS a 415nm.....	57
Tabela 9 - Caracterização física-química do EAFMU	58
Tabela 10 - Avaliação da atividade inibidora da tirosinase do EAFMU e ácido kójico nos tempos de 30 e 60 minutos	59
Tabela 11 - Valores de FPS de EAFMU e benzofenona-3	63
Tabela 12 - Análise de pH, viscosidade e densidade do SFMU e Branco.....	66
Tabela 13 - Avaliação das características organolépticas de SFMU	66
Tabela 14 - Valores de pH, viscosidade, densidade com suas respectivas % de variação, desvio padrão e aspectos organolépticos do SFMU em T0, T7, T15, T30, T60 e T90	68
Tabela 15 - Valores de pH, viscosidade, densidade com suas respectivas % de variação, desvio padrão e aspectos organolépticos do Branco em T0, T7, T15, T30, T60 e T90	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MSH	Hormônio estimulante de alfa-melanócitos;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
BHT	Hidroxitolueno butilado;
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil;
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
EAFMU	Extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> ;
EAG/g	Equivalente ácido gálico por grama;
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético;
EROs	Espécies reativas de oxigênio;
ERU/g	Equivalente rutina por grama;
FPS	Fator de proteção solar;
IPCLIN	Instituto de Pesquisa Clínica e Integrada;
INCI	<i>Internacional Nomenclature of Cosmetic</i>
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial;
LLNA	Ensaio do linfonodo local murinho;
MDA	Malondialdeído;
MEC	Matriz extracelular;
MITF	Fator de transcrição associado à microftalmia;
MMA	Ministério do Meio Ambiente;
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium];
O/A	Óleo em água;
ppm	Parte por milhão;
pH	Potencial hidrogeniônico;
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada;
RMN	Ressonância Magnética Nuclear;
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton;
rpm	Rotações por minuto;

SFMU	Sérum facial com extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> ;
SRB	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado;
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> ;
TYR	Tirosinase;
T0	Tempo após 24 horas do preparo;
T7	Tempo no 7º dia;
T15	Tempo no 15º dia;
T30	Tempo no 30º dia;
T60	Tempo no 60º dia;
T90	Tempo no 90º dia;
UV	Radiação ultravioleta;
UVA	Radiação ultravioleta A;
UVB	Radiação ultravioleta B;
UV-VIS	Ultravioleta-visível.

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas;
° C	Graus Celsius;
h	Horas;
µg	Microgramas;
µg/mL	Microgramas por mililitro;
µL	Microlilitros;
µM	Micromolar
M	Molar;
mg	Miligramas;
min.	Minutos;
mM	Micromolar;
mm	Micrometros;
nm	Nanômetros;
®	Marca registrada;
%	Porcentagem.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Myracrodruon urundeuva	18
1.1.1 Aspectos agrônômicos	18
1.1.2 Aspectos químicos das folhas	20
1.1.3 Atividade biológica	23
1.2 Morfologia e fisiologia da Pele	24
1.3 Melanogênese	25
1.4 Melasma	30
1.4.1 Diagnóstico e Tratamento	32
1.5 Formulações cosméticas	35
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVO	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Preparo do EAFMU	40
4.2 Caracterização química do extrato	40
4.2.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear – RMN	40
4.2.2 Quantificação de fenóis totais	40
4.2.3 Teor de flavonoides	41
4.2.4 Caracterização físico-química e organoléptica	42
4.3 Atividade clareadora	40
4.3.1 Inibição da enzima tirosinase	43
4.3.2 Quelação do íon cobre	43
4.4 Avaliação da atividade antioxidante	44
4.4.1 Sustâncias Reativas ao Ácido Tiobútrico – TBARS	44
4.4.2 Método do DPPH	45
4.4.3 Radical hidroxil	45
4.5. Avaliação da atividade fotoprotetora	45
4.5.1 Varredura UVB e UVA	45
4.5.2 Análise de FPS	46
4.6. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	46
4.6.1 Cultivo das linhagens de fibroblastos murinos	46
4.6.2 Avaliação do efeito do EAFMU na viabilidade de fibroblastos murinos pelo método da Sulforodamina B (SRB)	47
4.7 Desenvolvimento da fórmula	47
4.7.1 Estudo de compatibilidade do agente de viscosidade	47
4.7.2. Preparação da formulação	48
4.7.3 Estudo do pH da formulação	49
4.7.4 Análise físico-química	49

4.7.5 Análise das características organolépticas	50
4.8 Análise segurança da formulação	51
4.8.1 irritabilidade dérmica primária, acumulada e a sensibilização	51
4.9 Análise de estabilidade da formulação	51
4.9.1 Teste de centrifugação.....	51
4.9.2 Teste de estabilidade	51
4.10 Análise estatística	53
5. RESULTADOS.....	54
5.1 Caracterização química.....	54
5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear – RMN	54
5.1.2 Quantificação de fenóis totais	55
5.1.3. Teor de flavonoides.....	56
5.1.4 Caracterização físico-química e organoléptica	57
5.2 Avaliação da atividade clareadora	58
5.2.1 Inibição da enzima tirosinase.....	58
5.2.2 Quelação do íon cobre.....	60
5.3 Avaliação da atividade antioxidante.....	60
5.3.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS.....	60
5.3.2 Método do DPPH	61
5.3.3 Radical hidroxil.....	61
5.4. Avaliação da atividade fotoprotetora.....	62
4.5.1 Varredura UVB e UVA	62
4.5.2 Análise de FPS	63
5.5. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>.....	63
5.6 Desenvolvimento da formulação	64
5.6.1 Estudo de compatibilidade com agente de viscosidade	66
5.6.2 Estudo de pH da formulação.....	66
5.6.3 Análise físico-química	66
5.6.4 Análise organolépticas	66
5.7 Análise segurança da formulação	66
5.7.1 irritabilidade dérmica primária, acumulada e a sensibilização	66
5.8 Análise de estabilidade da formulação	67
5.8.1 Teste de centrifugação.....	67
5.8.2 Teste de estabilidade	67
6. DISCUSSAO.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
8. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS	98
ANEXO I – RELATÓRIO DO ENSAIO. AVALIAÇÃO DERMATOLÓGICA DA IRRITABILIDADE DÉRMICA PRIMÁRIA, ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO.....	98
ANEXO II – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE.....	109

<i>ANEXO III – ARTIGO PUBLICADO</i>	<i>109</i>
<i>ANEXO IV – ENTREVISTAS E DIVULGAÇÃO</i>	<i>109</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Myracrodruon urundeuva*

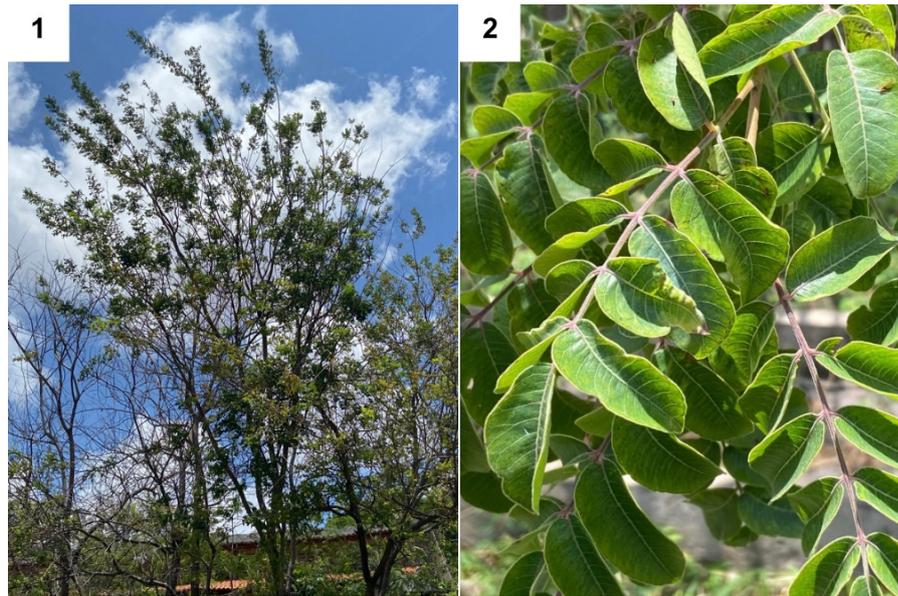
1.1.1 Aspectos agronômicos

Myracrodruon urundeuva Fr. Allem. (Sinonímia: *Astronium urundeuva*) é a designação científica para a aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-preta, aroeira-do-cerrado, urundeúva. É uma árvore de grande porte com altura de 8 a 20 metros, podendo chegar em 30 metros; possui tronco linheiro, às vezes com mais de 1 m de diâmetro, encimada por larga copa, formada por ramos flácidos (Figura 1) (Braga, 2001; Pareyn et al., 2018).

O nome aroeira é uma simplificação do vocábulo araroeira, que deriva de “arara”, com acréscimo da terminação “eira” (lugar), isto é, árvore da arara, por ser uma planta em que, de preferência, essa ave pousa e vive. Esta planta também recebe o nome de urundeuva, aroeira-preta, aroeira-do-campo, ou simplesmente aroeira (Braga, 2001).

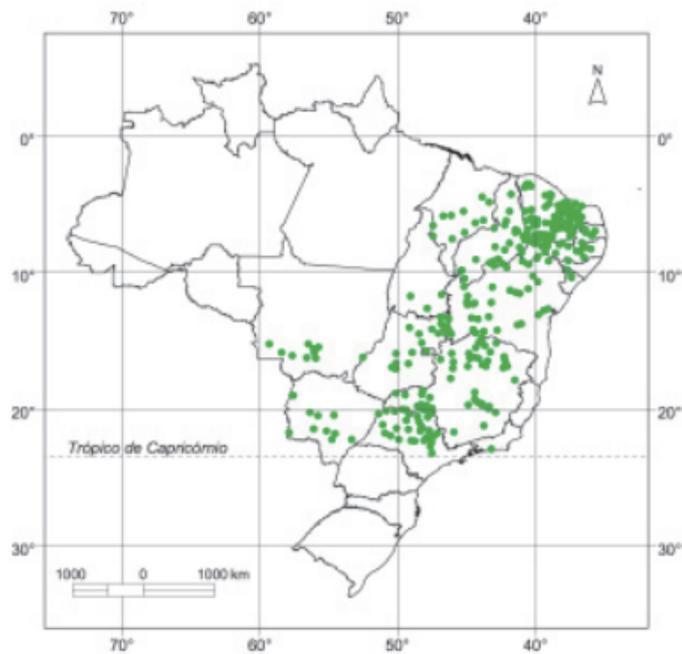
Esta espécie, pertencente à família Anacardiaceae, ocorre na caatinga e matas secas, desde o Ceará até os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, especialmente no lado oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, sendo mais frequente no Nordeste, como pode ser visto na Figura 2. No estado do Ceará é encontrada com muita frequência em vários municípios sertanejos. Está presente também em outros países da América do Sul: Argentina, Bolívia e Paraguai (Lorenzi e Matos, 2000; Leite, 2002)

Figura 1 - *Myracrodruon urundeuva* (1- árvore, 2 – folhas).



Fonte: autor.

Figura 2 – Locais no Brasil identificados de ocorrência natural de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*).



Fonte: Carvalho, 2003.

A aroeira-do-sertão não apresenta cadeia produtiva definida, sendo a sua exploração na região Nordeste totalmente extrativista (Pareyn et al., 2018). Contudo, a espécie possui características propícias ao cultivo em larga escala, como a

resistência ao déficit hídrico, suportando ambientes com até 400 mm de chuvas anuais, além disso, tem um rápido crescimento inicial (Carvalho, 2003; Marafon, et al., 2015).

Utilizada como matéria-prima para diversas finalidades, a aroeira-do-sertão sofreu exploração predatória, o que a fez ser incluída anteriormente na Lista Oficial do Ministério do Meio Ambiente das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Felizmente, nas duas últimas atualizações ocorridas em Portaria MMA nº 443 de 2014 e Portaria MMA nº 148 de 2022, a espécie não está mais presente (Brasil, 2014; Brasil, 2022).

Estudo de extrema relevância para a preservação da espécie foi realizado por Bandeira (2002), no qual demonstrou que a espécie cultivada e em desenvolvimento (brotos e renovos), mantém suas características genéticas quanto à atividade farmacológica, e que produz qualitativamente os mesmos constituintes farmacologicamente ativos da entrecasca, ou seja, as chalconas diméricas urundeuvinas A e B e os taninos.

Galvão et al. (2018) também constataram os extratos fluidos obtidos do caule e folhas dos brotos apresentam atividade farmacológica similar à entrecasca da planta adulta. Mostrando que é possível substituir o uso do extrato da entrecasca da planta adulta pela mistura dos extratos do caule e folhas dos brotos na proporção 1:1, no preparo de fitoterápicos.

1.1.2 Aspectos químicos das folhas

Aquino et al. (2019) caracterizaram vinte e quatro compostos, como pode ser visto na Tabela 1, pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários. Foram isolados e identificados a partir do decocto das folhas de *M. urundeuva*: um amino ácido não-protéico (1), um ácido carboxílico polihidroxilado (2), oito derivados de ácidos benzóicos hidroxilados (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), um flavonóide (11), sete heterosídeos flavonoidicos glicosilados (12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18), quatro galotaninos (19, 22, 23 e 24) e dois megastigmanos (20 e 21).

Tabela 1 - Estruturas dos compostos isolados do EAFMU.

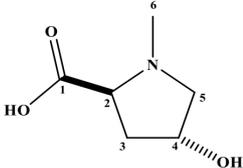
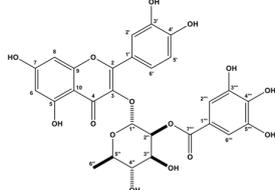
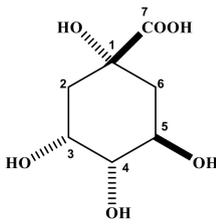
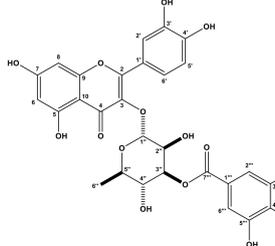
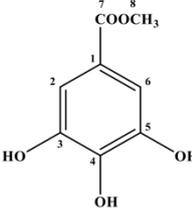
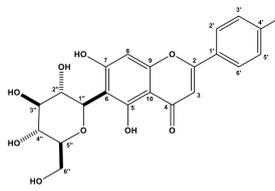
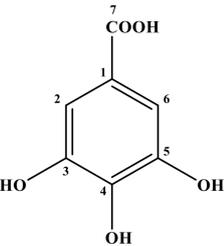
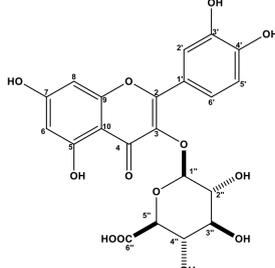
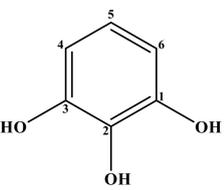
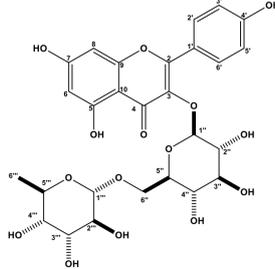
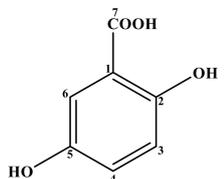
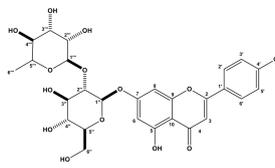
	COMPOSTO	ESTRUTURA		COMPOSTO	ESTRUTURA
1	N-metil-(2S,4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina		13	Quercetina 3-O-(2"-galoil)-α-L-rhamnopiranosídeo	
2	Ácido quínico		14	Quercetina 3-O-(3"-galoil)-α-L-rhamnopiranosídeo	
3	Galato de metila		15	Isovitexina	
4	Ácido gálico		16	Quercetina 3-O-β-D-glicuronídeo	
5	Pirogalolol		17	Kaempferol 3-O-rutinosídeo	
6	Ácido gentísico		18	Roifolina	

Tabela 2 - Estruturas dos compostos isolados do EAFMU.

	COMPOSTO	ESTRUTURA		COMPOSTO	ESTRUTURA
7	<i>meta</i> -digálico		19	1-O-galoil-6-O-luteoil- α -glicopiranosídeo	
8	Ácido <i>para</i> -digálico		20	Corchoionosídeo C	
9	<i>meta</i> -digalato de metila		21	9- <i>epi</i> -blumenol C	
10	<i>para</i> -digalato de metila		22	2,3,4,6-tetra-O-galoil- α -D-glicopiranosídeo	
11	Quercetina		23	1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicopiranosídeo	
12	Quercetina 3-O-(2"-galoil)- α -L-arabinofuranosídeo		24	1,2,4,6-tetra-O-galoil-3-O-digaloil- β -D-glicopiranosídeo	

Matos et al. (2019) realizaram análise fitoquímica do extrato hidroetanólico das folhas e identificaram como compostos majoritários: ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido protocatecúico, ácido clorogênico, ácido elágico, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose, quercetina-3-O-rhamnopiranosídeo, ácido 3-galoilgálico e ácido 4-galoilgálico.

1.1.3 Atividade biológica

O uso medicinal popular desta espécie é um dos mais difundidos na população rural e metropolitana da região Nordeste do Brasil, principalmente no Ceará (Viana, Bandeira, Matos, 2003). O decocto (cozimento) da entrecasca apresenta uso etnofarmacológico no tratamento de afecções cutâneas, problemas relacionados com doenças respiratórias e urinárias, além de excelente “banho-de-assento” no pós-parto e outros problemas ginecológicos (Lorenzi e Matos, 2000).

Ferreira et al. (2021) analisaram a ação antimicrobiana do extrato aquoso das folhas e foi verificada a ação para *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Outro estudo realizado por Aquino et al. (2019) mostrou atividade anti-inflamatória através da modulação da degranulação de neutrófilos humanos.

O uso da aroeira-do-sertão tem comprovado efeito anti-inflamatório e cicatrizante em casos de úlceras e alergias. Por ser rica em taninos, a aroeira tem propriedade adstringente, apresentando assim, efeito de contrair, fechar e cicatrizar (Carvalho, 2003).

Estudo realizado por Viera et al. (2015), através de metodologia *in vitro* de inibição da enzima tirosinase, comprovou que o extrato metanólico das folhas de aroeira-do-sertão inibiu 66% da enzima, enquanto o extrato metanólico da casca do caule inibiu 42%. Matos et al. (2019) mostram que o extrato hidroetanólico das folhas de *M. urundeuva* possui propriedades de inibição da expressão da MMP-2, que é uma metaloproteinase responsável pela degradação de colágeno. Como o ensaio foi realizado com osteoblasto, não é possível fazer uma correlação direta com o MMP-2 expresso pelos fibroblastos.

1.2 Morfologia e fisiologia da Pele

A pele é o maior órgão do corpo. Tem função de proteger o organismo, funcionando como barreira física, química e bioquímica, de modo a oferecer proteção contra radiação UV, agressões mecânicas, entrada de microrganismo do ambiente, além disso, evita perda excessiva de água. É composta pela epiderme, de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado; e pela derme, de tecido conjuntivo. Subjacente, unindo-a aos órgãos, há a hipoderme formada por tecido conjuntivo frouxo e adiposo (Baroni et al., 2012; Quan e Fisher, 2015; Montanari, 2016).

A epiderme constitui a camada mais externa da pele, está em constante renovação e é composta principalmente por células especializadas chamadas queratinócitos. Além dos queratinócitos, são encontradas células de Langerhans, células de Merkel e os melanócitos. As células de Langerhans têm papel na resposta imunológica, enquanto as células Merkel têm papel sensorial, sendo receptores táteis (mecanorreceptores), já os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina. A epiderme é dividida em subcamadas, sendo: estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo (Kapoor et al., 2020; Baroni et al., 2012, Montanari, 2016).

Na epiderme saudável existe um equilíbrio entre os processos de proliferação e descamação que resulta em renovação completa em aproximadamente 28 dias (Baroni et al., 2012).

A derme é subdividida em derme papilar (fina e constituída por tecido conjuntivo frouxo) e derme reticular (espessa e constituída por tecido conjuntivo denso). É composta em grande parte por matriz extracelular (MEC), que compreende uma rede de colágeno como constituinte majoritário, rede de fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e água. Esse tecido conjuntivo rico em colágeno é produzido, organizado e mantido por fibroblastos dérmicos. Nessa camada encontram-se os anexos cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações nervosas sensoriais (Montanari, 2016; Quan e Fisher, 2015; Haydont; Bernard e Fortunel, 2019).

O encontro entre epiderme e derme é chamado de junção dermoepidérmica e se caracteriza por uma rede complexa de papilas dérmicas que são invaginações da derme que se projetam na epiderme. Essas papilas têm como função aumentar a superfície de contato entre as camadas, favorecendo uma interface dinâmica de troca

de oxigênio e nutrientes e uma maior resistência à pele (Montanari, 2016; Baroni et al., 2012)

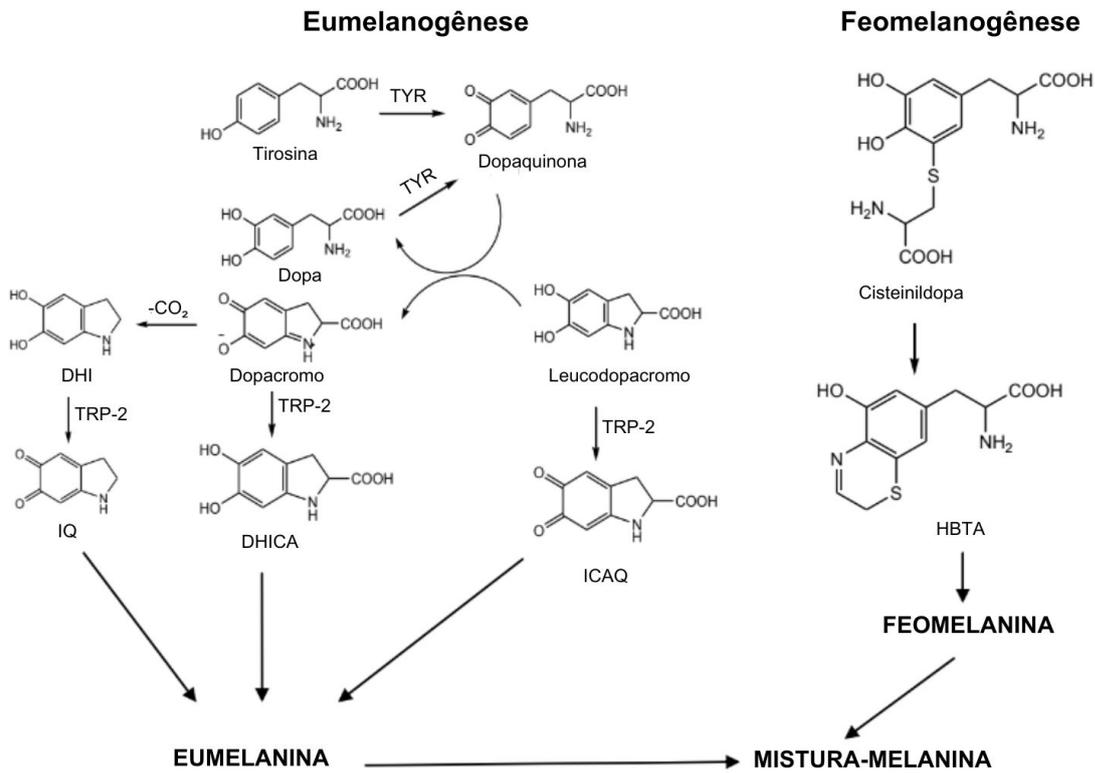
1.3 Melanogênese

A melanogênese é um processo fisiológico complexo de formação de melanina pelos melanócitos. Os melanócitos são células dendríticas, localizada na camada basal da epiderme e tem como precursoras os melanoblastos, que são células não pigmentadas que se originam de células embrionárias da crista neural. Após o fechamento do tubo neural, os melanoblastos migram para várias regiões do corpo e se desenvolvem em melanócitos. Os melanócitos contêm melanossomas, que são organelas intracitoplasmática, altamente especializadas, onde há a síntese e deposição da melanina. (D'Mello et al., 2016; Orhan e Deniz, 2021).

Os melanócitos produzem dois tipos de melanina: eumelanina e feomelanina. A eumelanina é um polímero insolúvel de cor marrom-escura e preta, enquanto a feomelanina é um polímero solúvel vermelho-amarelo claro, e sua combinação leva à cor da pele, olhos e cabelo. (Ito; Wakamatsu, 2003; Qian et al. 2020; Serre; Busutil; Botto, 2018).

A rota biossintética da melanina no interior dos melanossomas acontece em várias etapas, na primeira ocorre a oxidação da tirosina em dopaquinona catalisada pela tirosinase (TYR). Este primeiro passo é limitante na síntese de melanina porque o restante da sequência de reação pode ocorrer espontaneamente em um valor de pH fisiológico. A dopaquinona subsequente é convertida em dopa e dopacromo por auto-oxidação. A dopa também é o substrato da tirosinase e novamente é oxidada a dopaquinona. Finalmente, a eumelanina é formada por meio de uma série de reações de oxidação do diidroxiindol (DHI) e do ácido diidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), que são os produtos da reação do dopacromo. Na presença de cisteína ou glutathione, a dopaquinona é convertida em cisteinildopa ou glutathionildopa. Posteriormente, a feomelanina é formada (Figura 3) (Chang, 2009).

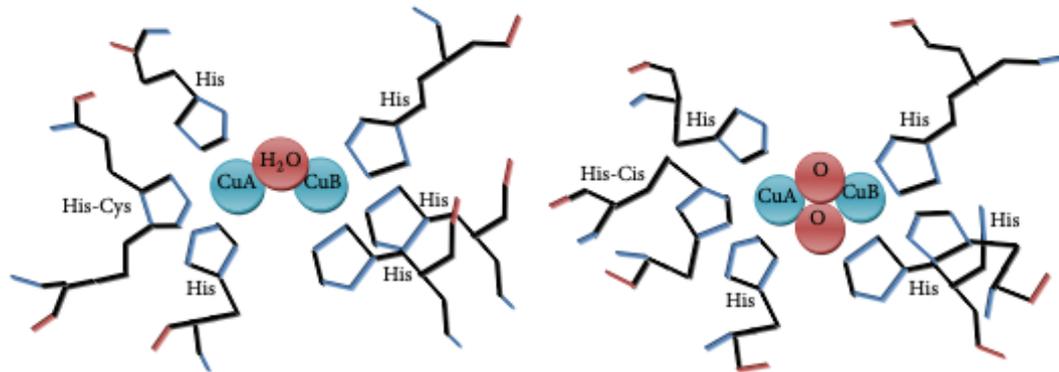
Figura 3 - Esquema de biossíntese dos pigmentos eumelanina e feumelanina.



Fonte: adaptado de Chang, 2009

Como pode ser visto na Figura 4, a tirosinase é uma enzima fundamental para a produção da melanina, trata-se de uma metaloenzima cobre dependente, possuindo dois íons desse metal no seu centro ativo (CuA e CuB). Além disso, cada íon metálico está coordenado a três histidinas. É amplamente encontrada em microrganismos, animais, plantas e no corpo humano (Chang et al. 2009, Gonchoroski; Côrrea, 2005; Kim et al., 2023).

Figura 4 - Estrutura da enzima tirosinase.



Fonte: Zaidi et al., 2014.

Após a produção, a melanina dentro dos melanossomas é transferida para os queratinócitos e deposita-se ao redor do núcleo para proteção do material genético (Van Den Bossche; Naeyaert e Lambert, 2006) e alguns mecanismos foram propostos para essa transferência: 1. Modelo de citofagocitose: queratinócitos têm a capacidade de fagocitar constituintes dos melanócitos, principalmente as extremidades dos dendritos, com o objetivo de captar grânulos de melanina 2. Modelo de fusão: fusão das membranas de melanócitos e queratinócitos, havendo a formação de um canal para passagem dos melanossomas; 3. Modelo de transferência de vesículas: empacotamento do melanossoma em vesículas, formadas devido à evaginação da membrana plasmática; 4. Modelo exocitose/fagocitose: transferência de melanina resulta da fusão da membrana melanossomal com a membrana plasmática do melanócito, provocando a exocitose dos grânulos de melanina que serão fagocitados por um queratinócito adjacente (Van Den Bossche; Naeyaert e Lambert, 2006; Singh et al, 2008; Sousa, 2020).

Em humanos, a pigmentação da pele e dos cabelos é dependente da atividade melanogênica dentro dos melanócitos, atividade da enzima tirosinase, da taxa de síntese de melanina, bem como do tamanho, número, composição e distribuição dos melanossomas, além da natureza química da melanina que elas contêm (eumelanina ou feomelanina). Há também envolvimento de fatores ambientais como a exposição solar (Miot et al., 2009; Gonchoroski; Côrrea, 2005).

Fitzpatrick é o sistema mais comumente usado para distinguir diferentes fenótipos de pigmentação da pele. São caracterizados seis fototipos (I-VI) graduando

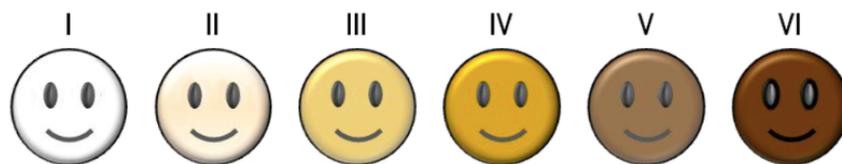
o eritema e pigmentação adquirida após exposição à UV (Tabela 2 e Figura 5) (Videira; Magina e Moura, 2013).

Tabela 3 - Classificação dos fototipos de pele segundo Fitzpatrick.

	Grupo	Eritema	Pigmentação	Sensibilidade
I	Pele branca	Sempre queima	Nunca bronzeia	Muito sensível ao sol
II	Pele branca	Sempre queima	Às vezes bronzeia	Sensível ao sol
III	Pele morena clara	Queima moderado	Bronzeia moderadamente	Sensibilidade normal ao sol
IV	Pele morena moderada	Queima pouco	Sempre bronzeia	Sensibilidade normal ao sol
V	Pele morena escura	Queima raramente	Sempre bronzeia	Pouco sensível ao sol
VI	Pele negra	Queima raramente	Totalmente pigmentada	Minimamente sensível ao sol

Fonte: adaptado de Suzuki et al. 2011.

Figura 5 - Representação do fototipo pigmentar da Escala de Fitzpatrick.



Fonte: D'Orazio et al., 2013.

Após uma única exposição à radiação UV, um aumento no tamanho dos melanócitos pode ser observado, acompanhado de um aumento da atividade da enzima tirosinase. Exposições repetidas à radiação UV levam a um aumento no número de melanossomas maduros transferidos aos queratinócitos, bem como a um aumento no número de melanócitos ativos. Além disso, a densidade dos melanócitos, em estudos comparativos, é maior nas áreas fotoexpostas (Miot et al., 2009).

Ademais, quando há exposição cutânea aos raios UV, os queratinócitos liberam mediadores pró-inflamatórios, como a endotelina-1 (ET-1), que, em grandes

proporções estimula a síntese da enzima tirosinase, bem como a proliferação, migração e formação dos dendritos dos melanócitos (Costa et al., 2010)

O processo de síntese e distribuição da melanina é regulado por uma variedade de agentes autócrinos e parácrinos, como resposta a estímulos endógenos e exógenos. Apresenta várias etapas sendo: transcrição de proteínas melanogênicas, biogênese de melanossomas, gestão de proteínas melanogênicas dentro dos melanossomas, transporte dos melanossomas até as extremidades dos dendritos dos melanócitos e, por fim, a transferência dos melanossomas para os queratinócitos (Sousa, 2020; Park et al. 2009)

As estreitas relações existentes entre queratinócitos, melanócitos e fibroblastos são muito importantes na regulação do processo de pigmentação da pele. Esses três tipos celulares são altamente interativos e se comunicam através de fatores secretados e seus receptores, assim, regulam a pigmentação da pele (Serre; Busuttill; Botto, 2018).

Múltiplas vias de sinalização estão envolvidas na melanogênese, especificamente na regulação do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). A principal via de sinalização na pigmentação envolve o receptor de melanocortina 1 (MC1-R), que é ativado pelo hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH) ou hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que são produtos da proopiomelanocortina (POMC). O MC1-R aumenta a síntese de monofosfato de adenosina 3',5'-cíclico (cAMP) ativando a adenilato ciclase. Proteína quinase A (PKA), ativado por cAMP, fosforila CREB, que então atua como um fator de transcrição do MITF. O MITF regula a expressão de enzimas melanogênicas (tirosinase, TYRP1 e TYRP2) e proteínas estruturais do melanossoma (Maddaleno et al., 2021).

Assim, a pigmentação normal da pele é mantida pela harmonia entre a melanina produzida e degradada. Essa homeostase é mantida por várias enzimas e fatores secretados por melanócitos, queratinócitos e fibroblastos (Kapoor et al., 2020).

A melanina, sob condições fisiológicas, protege a pele o DNA dos queratinócitos da radiação solar ultravioleta, das espécies reativas a oxigênio, funcionando com um “fotoprotetor” endógeno. No entanto, a geração excessiva de melanina, além da condição normal do indivíduo, pode resultar em extensos problemas estéticos, incluindo melasma, efélides e hiperpigmentação pós-inflamatória (Maddaleno et al., 2021; Gao et al., 2021; Qian et al. 2020; Zhou et al., 2021).

1.4 Melasma

A palavra melasma tem origem grega, na qual "melas", que significa preto. É uma hipermelanose comum e apresenta-se como máculas irregulares de coloração marrom clara a escura, distribuídas simetricamente nas áreas fotoexpostas do corpo, especialmente na face e região cervical. Essas máculas faciais são predominantes nas regiões: central, malar e/ ou regiões mandibulares (Hendel; Miot e Miot, 2014; Bianco, 2021; Hoque; McGrath; Shaude, 2022).

O melasma ocorre em todos os grupos étnicos, sendo mais predominante em fotótipos mais altos e em locais com maior incidência solar, incluindo nas populações latino-americanas, asiáticas, da Africana Mediterrânea, hispânica e do Oriente Médio (Hendel; Miot e Miot, 2014, Austin, Nguyen e Jagdeo, 2019).

Devido ao clima tropical e à grande miscigenação da população brasileira, há uma alta incidência de melasma no país. Levando em consideração as diferentes regiões e suas composições étnicas, estima-se que 15 a 35% das mulheres brasileiras em idade adulta são acometidas por essa desordem cutânea. Estudo multicêntrico realizado por Hexsel et al. (2013) em três regiões do Brasil (Sul, Sudeste e Norte) com 953 (novecentos e cinquenta e três) participantes constatou que 76% dos pacientes tinham fototipo III e IV. Estudo mais recente realizado por Ikino et al. (2015) chegou a um resultado bem próximo, encontrando que 82% dos participantes tinham os fototipos III e IV.

O melasma possui uma patogênese multifatorial que envolve: predisposição genéticas, exposição à RUV, gravidez, terapias hormonais, endocrinopatias, fatores emocionais e uso de contraceptivos, uso de alguns tipos de cosméticos e drogas, no entanto, nenhum deles pode ser responsabilizado isoladamente pelo seu desenvolvimento. Porém, parece que predisposição genética e exposição à radiação solar desempenham um papel importante, tendo em vista que o melasma fica mais evidente, durante ou logo após períodos de exposição solar, podendo surgir abruptamente em decorrência da exposição solar intensa ou de modo gradual, pela exposição constante (Miot et al., 2009; César et al., 2018; Mahajan et al. 2022; Costa, 2012). Além disso, a luz visível tem efeito na indução da pigmentação, estudos demonstraram que em indivíduos de pele mais pigmentada (fototipo maior que III), a luz visível pode induzir uma pigmentação mais intensa e duradoura da pele em comparação com UVA (Narla et al., 2019; Duteil et al. 2014).

Ikino, et al. (2015) também constataram que em 45,1% dos casos analisados, o surgimento do melasma está associado à gravidez. Além disso, em 9,80% das pacientes, o melasma foi associado ao uso de anticoncepcionais hormonais. Distúrbios da tireoide estiveram presentes em 7,84% dos pacientes. Outro dado importante obtido foi que 49,02% apresentam histórico familiar de melasma.

A fisiopatologia desse distúrbio é complexa e não completamente elucidada, porém algumas teorias sugerem que sua emergência estaria ligada ao aumento da expressão de fatores melanogênicos e receptores específicos, como estrogênio. O aumento do número e calibre dos vasos sanguíneos na região afetada, bem como o aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também estão envolvidos (César et al., 2018).

A pigmentação é geralmente confinada à epiderme, mas diversos estímulos dérmicos foram apontados na manutenção da melanogênese no melasma (Mahajan et al. 2022). As características histopatológicas das lesões do melasma coincidem com alguns acontecimentos fotoenvelhecimento cutâneo, tais como: elastose solar (acúmulo de tecidos elásticos na derme devido à exposição solar), dano à membrana basal, vascularização aumentada e um aumento do número de mastócitos (Kwon et al. 2019).

A radiação ultravioleta aumenta a liberação de histamina por esses mastócitos na pele humana. Mediada pelo receptor H2 e pela ativação da proteína quinase A, a histamina estimula a produção de melanina e induz a proliferação e migração de melanócitos para o local afetado pelo melasma. Outra alteração histológica presente no melasma é o aumento da vascularização da região acometida. O número de vasos sanguíneos, o tamanho dos vasos e a densidade dos vasos é maior na pele lesional do que na pele perilesional (Kim et al., 2007).

O melasma é classificado em quatro tipos: epidérmico, dérmico, misto e indeterminado. O primeiro é o mais comum e a melanina localiza-se nas camadas epidérmicas; já no segundo há pigmentação na epiderme estendendo-se até a derme média, principalmente no interior de melanófagos (macrófagos soltos na derme que fagocitam melanina), e em disposição perivascular na derme; no misto há presença de ambos os tipos; e o indeterminado atinge fototipos V e VI, sendo difícil determinar devido a alta pigmentação da pele (Berardesca et al., 2019; Nogueira e Ferreira, 2018).

Sabe-se também que o estresse oxidativo está relacionado ao melasma, o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e mecanismo de defesa antioxidante causa dano tecidual. Pacientes com essa desordem cutânea apresentam maior marcadores oxidativos, incluindo o malondialdeído (MDA), indicador de dano tecidual pela peroxidação lipídica (Seckin, et al., 2014; Babbush; Babbush; Khachemoune, 2021; Choubey; et al., 2014).

Dessa forma, o melasma continua sendo uma causa significativa de preocupações estéticas e constrangimento psicossocial que afeta a qualidade de vida. No entanto, o tratamento permanece desafiador e necessita ser a longo prazo com aconselhamento constante para correta adesão (Mahajan et al. 2022).

1.4.1 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico do melasma é eminentemente clínico, raramente é necessária biópsia (Babbush; Babbush; Khachemoune, 2021). Trata-se de dermatose caracterizada por máculas hipercrômicas acastanhadas em tons variados, assintomáticas, simétricas, com limites nítidos e irregulares, muitas vezes com configurações geográficas. Apresenta uma cronicidade característica, com recidivas frequentes (Sandin, et al., 2014; Miot et al., 2009).

A lâmpada de Wood também é usada para o diagnóstico, podendo diferenciar os quatro tipos de melasma. No melasma epidérmico a pigmentação se intensifica sob a luz de Wood enquanto no dérmico não se intensifica; no melasma misto a pigmentação fica mais evidente em algumas áreas, e em outras não há mudança. Já o tipo indeterminado, encontrado nos fototipos V e VI, não é bem visualizado à lâmpada de Wood (Nogueira e Ferreira, 2018; Berardesca et al., 2019).

A dermatoscopia do melasma mostra alterações muito características. É possível visualizar o componente vascular presente em grande número de pacientes. A intensidade da cor da melanina e a regularidade da rede dos pigmentos revelam a densidade e localização de melanina. Apresenta coloração marrom escura e rede bem definida quando localizada no estrato córneo; tons de marrom claro e irregularidade da rede quando localizados nas camadas inferiores da epiderme; e coloração azul ou cinza-azulada quando localizada na derme (Hendel; Miot e Miot, 2014).

Devido a sua patogênese multifatorial e não totalmente compreendida, o tratamento do melasma é um grande desafio (Babbush; Babbush; Khachemoune,

2021). Tendo como objetivo reduzir a síntese de melanina, inibir a formação de melanossomas e promover sua degradação, para então haver o clareamento das lesões e a redução da área afetada. Além disso, os resultados ao tratamento dependem da localização da deposição de pigmento: melasma epidérmico responde melhor ao tratamento, diferentemente do melasma dérmico (Moreira et al., 2010; Nogueira e Ferreira, 2018).

O tratamento do melasma deve incluir uma abordagem multimodal com terapêutica combinada que incorpore agentes clareadores, antioxidantes e fotoprotetores possibilitando, assim, uma ação sinérgica e redução de efeitos indesejáveis. Estudos sugerem que a terapia de primeira linha para melasma engloba fotoproteção intensa e clareadores de uso tópico, independentemente do despigmentante utilizado, a fotoproteção de amplo espectro é essencial para prevenir a formação de nova melanina e para diminuir a oxidação da melanina pré-formada (Sandin, et al., 2014; Kumari et al., 2018; Moreira et al., 2010).

Além da proteção UVA e UVB convencional, a luz visível deve ser evitada em pacientes com melasma, pois ondas mais curtas comprimentos de luz visível (luz azul) promovem hiperpigmentação. Protetores solares que contêm óxido de ferro bloqueiam esse comprimento de onda (Kwon et al. 2019)

O principal alvo desses agentes clareadores é a enzima tirosinase, uma vez que desempenha um papel fundamental na síntese de melanina, os inibidores de tirosinase também têm sido amplamente considerados pelos pesquisadores como uma das principais estratégias para tratamento de diversas hiperpigmentações (Zhao et al. 2022).

Através desse mecanismo, há mais de 50 anos a hidroquinona vem sendo utilizada como agente despigmentante. Essa substância pode ainda ser combinada à tretinoína e ao corticoide, o que é conhecido como tríplice combinação (Sandin, et al., 2014). No entanto, sabe-se dos efeitos adversos do uso da hidroquinona, dentre eles estão: dermatite de contato alérgica ou irritante, hipopigmentação “em confete”, hiperpigmentação pós-inflamatória, descoloração ungueal, telangiectasias, atrofia epidérmica e a ocronose. Inclusive, no Brasil e em vários outros países, não é uma substância autorizada para cosmético, estando restrita a medicamentos (Sandin, et al., 2014; Moreira et al., 2010; Brasil, 2021).

No mercado existem muitas outras opções de ativos tópicos, tais como: ácido azelaico – inibe a tirosinase, citotóxico sobre melanócitos e antioxidante; ácido

glicólico – aumenta renovação celular; ácido kójico – inibe a tirosinase e antioxidante, é usado como controle positivo para os ensaios experimentais de inibição da enzima; ácido retinóico – aumenta renovação celular e reduz a transferência do melanossoma; ácido tranexâmico – bloqueia a via da plasmina (interfere na interação dos melanócitos com queratinócitos, inibindo a síntese de melanina) e inibe VEGF; arbutin – composto derivado da hidroquinona, inibe a tirosinase; belides – inibe a ET-1, reduz a ligação do α -MSH aos seus receptores e reduz a transferência do melanossoma; cisteamina – inibe a tirosinase, aumenta a concentração intracelular de glutathione; licorice – inibe a tirosinase, dispersa melanina e possui ação anti-inflamatória; niacinamida – reduz a transferência do melanossoma e antioxidante; vitamina C – forte ação antioxidante e inibe a tirosinase. (Austin, Nguyen e Jagdeo, 2019; Maddaleno et al., 2021; Costa et al., 2010; Bianco, 2021; Mahajan et al. 2022; Kumari et al., 2018; Babbush; Babbush; Khachemoune, 2021).

A terapia oral tem ganhado bastante destaque. Este ano, o mqDerma do laboratório mqSi®, produto desenvolvido pela autora desta tese, ficou entre os três finalistas do Prêmio Açaí de Ouro, promovido pela *Nutri Ingredients Summit*. O mqDerma foi destaque nacional em inovação por ser um tratamento oral em cápsula vegetal para o melasma (NIS, 2023). A composição do mqDerma contém vitamina A, niacinamida, zinco e o extrato de *Olea europaea* rico compostos fenólicos, dentre eles, o hidroxitirosol e os verbacosídeos, o que garante ação clareadora, antioxidante, anti-inflamatória e fotoprotetora; além disso, a niacinamida também possui conhecida ação clareadora (mqSi, 2023). Ademais, outros ativos também têm sido usados para o tratamento oral do melasma, sendo: *Polipodium leucotomos*, picnogenol, , carotenoides e melatonina (Togni et al., 2015; Babbush; Babbush; Khachemoune, 2021; Maddaleno et al., 2021).

Procedimentos como *peelings* químicos, dermoabrasão, *lasers*, luz pulsada, microagulhamento, radiofrequência podem ser usados isoladamente ou em combinação com outras terapias. Apesar de possíveis riscos de efeitos adversos como a hiperpigmentação de rebote, muitos desses têm sido usados em casos de melasma resistentes e difíceis de tratar (Mahajan et al. 2022; Kumari et al., 2018).

Novas terapias com foco nas múltiplas causas de hiperpigmentação, como síntese de histamina, regulação de estrogênio, transferência de melanossoma e geração de ROS, estão sendo estudadas para o tratamento do melasma, uma vez que o direcionamento apenas para a síntese de melanina não é suficientemente

eficaz. Agentes naturais com mecanismo de ação multimodal estão sendo investigados devido ao seu melhor perfil de segurança em relação aos medicamentos convencionais (Maddaleno et al., 2021).

1.5 Formulações cosméticas

A indústria de cosméticos está emergindo como um dos segmentos de crescimento mais rápido da última década (Liu, 2022). No cenário global, o Brasil vem ocupando nos últimos anos a 4ª posição no mercado consumidor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão, mostrando a representatividade e peso que tem dentro do mercado mundial (ABIHPEC, 2022).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, cosméticos são preparações compostas por produtos naturais ou sintéticos que têm como função, entre outras, à higienização, odorização, proteção e alteração da aparência da pele. Eles são classificados em grau 1 e grau 2. Os produtos grau 1 possuem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não é inicialmente necessária e não requerem informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto. Já os produtos de grau 2 possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (Brasil, 2022).

Os cosméticos representam uma das mais importantes categorias de produtos de uso pessoal, segmento que tem um mercado consumidor em crescimento em função da demanda por produtos cada vez mais elaborados, inovadores e eficazes. Esses produtos apresentam-se em várias formas cosméticas (Campos e Mercúrio, 2012).

Quando um produto cosmético afeta de forma considerável a funcionalidade da pele é comum denominá-lo de cosmecêutico, termo criado por dermatologista Dr. Albert M. Kligman em 1984 e usado no Brasil e em outros países. Consiste na mistura das palavras cosmético e farmacêutico (*cosme* → *cêutico*), sendo produtos classificados como cosméticos que apresentam “benefícios” de um produto farmacêutico. O cosmecêutico tem mecanismo de ação conhecido e eficácia comprovada. Apesar de amplamente utilizados, não existe legalmente essa categoria

junto à Anvisa, sendo, então, categorizado como cosmético de grau 2 (Costa, 2012; BRASIL, 2022).

Dentre esses cosmecêuticos, estão os clareadores usados para uniformizar o tom da pele. Esses produtos estão entre os maiores do segmento e em constante crescimento no setor (Pereira, 2018).

Atualmente, há um grande interesse em cosméticos preparados a base de produtos naturais. Ativos extraídos de plantas, fungos e organismos marinhos já estão sendo usados efetivamente no mercado da beleza e, certamente, terão um papel ainda maior no futuro, com grandes perspectivas de desenvolvimento (Cherubim et al., 2019; Liu,2022).

Além da segurança, base de sobrevivência de qualquer produto no mercado, uma das características mais desejadas para um cosmético é a comprovada e notória eficácia, por isso tanto se tem investido na busca de produtos de alta performance (Costa, 2012).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O melasma é uma desordem cutânea com uma alta incidência mundial. No Brasil, por ser um país tropical com uma população miscigenada, chega a atingir 35% das mulheres em idade adulta, além de atingir em menor proporção o público masculino. Essa hiperpigmentação cutânea é mais que um problema estético, devido ao seu frequente acometimento facial, afeta muito a autoestima e qualidade de vida desses pacientes, é comum as pessoas desenvolverem transtornos psicológicos devido à dificuldade em realizar e/ou ter resultados satisfatórios com o tratamento.

Por ser de origem multifatorial, o tratamento é um grande desafio, apesar de não ter cura, é possível controlá-lo. Existem diversas opções no mercado, mas muitas tem ação tóxica ou efeitos adversos. No mercado de cosméticos há uma grande demanda por extratos vegetais, pois os compostos bioativos podem possuir propriedades inibidoras da tirosinase, antioxidante, fotoprotetora e anti-inflamatórias, favorecendo a ação no controle da melanogênese, como é o caso da aroeira-do-sertão.

O uso medicinal de *Myracrodruon urundeuva* é um dos mais difundidos na população rural e metropolitana da região Nordeste do Brasil, principalmente no Ceará. A população nordestina, sobretudo do sertão, tem muita estima por essa espécie, muitas vezes tendo-a como algo “milagroso” ou a sua única opção de tratamento para diversas doenças.

Devido à alta incidência solar e a maior presença de fototipos mais altos, as mulheres do Nordeste apresentam uma alta prevalência de melasma, até maior do que as demais regiões do Brasil. Por ser um produto desenvolvido com uma planta que está no dia a dia dessas pessoas, será muito valorosa a sua aplicação como agente clareador. Dessa forma, promove-se o aproveitamento da biodiversidade e da riqueza da caatinga.

Foi realizada uma busca de artigos científicos disponíveis nas bases de dados SciELO, Science Direct, Periódicos Capes e PubMed com os termos: “*Myracrodruon urundeuva* + clareador ou whitening”; “*Myracrodruon urundeuva* + antioxidante ou antioxidant”; “*Myracrodruon urundeuva* + tirosinase ou tyrosinase” e “*Myracrodruon urundeuva* + fotoprotetor ou photoprotective”. Não houve filtro por data. O baixo número de artigos científicos encontrados (Tabela 3) mostra o potencial inventivo e inovador da presente tese de doutorado.

Tabela 3 – Artigos encontrados em cada base de dados.

	<i>Myracrodruon urundeuva + clareador ou whitening</i>	<i>Myracrodruon urundeuva + antioxidante ou antioxidant</i>	<i>Myracrodruon urundeuva + tirosinase ou tyrosinase</i>	<i>Myracrodruon urundeuva + fotoprotetor ou photoprotective</i>
SciELO	0	4	1	0
Science Direct	0	5	0	0
Periódicos Capes	0	15	1	1
PubMed	0	8	0	1
Retirada de duplicações	0	18	1	1

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sérum facial utilizando extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (EAFMU) e avaliação da atividade clareadora, antioxidante e fotoprotetora.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil químico do EAFMU através de ressonância magnética nuclear (RMN), teor de fenóis totais, flavonoides, análise físico-química e organoléptica;
- Avaliar a atividade clareadora *in vitro* de EAFMU através dos ensaios de inibição da tirosinase e quelação do íon cobre;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* EAFMU através de três diferentes métodos;
- Avaliar a atividade fotoprotetora *in vitro* do EAFMU;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do EAFMU em células de fibroblastos murinos pelo método da sulforodamina B;
- Desenvolver um sérum facial com EAFMU (SFMU);
- Avaliar a irritabilidade dérmica primária, acumulada e a sensibilização do SFMU;
- Realizar caracterização físico-química do SFMU (pH, viscosidade e densidade) e organoléptica (aspecto, cor e odor);
- Avaliar a estabilidade acelerada da formulação, sendo analisados parâmetros físico-químico, organoléptico e químico (quantificação de ácido gálico).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo do EAFMU

O material foi coletado em janeiro de 2019 no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Agricultura Urbana da Universidade Federal do Ceará, trata-se de uma planta cultivada e com 7 (sete) anos de idade na data da coleta. A pesquisa está devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, nº de cadastro: A5C0D51.

As folhas frescas (600 g) foram submetidas à hidrodestilação, com 2,5 L de água destilada, por um período de 2 horas. Posteriormente, foi feita a liofilização do líquido de cozimento (decocto), obtendo 80,0 gramas do extrato seco.

Usou-se o nome “extrato das folhas de *Myracrodruon urundeuva*” (EAFMU) para identificação da parte utilizada, assim como da metodologia de extração. Mas por ter sido liofilizado, trata-se de um extrato seco.

4.2 Caracterização fitoquímica do extrato

4.2.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear – RMN

O espectro de RMN ^1H foi obtido em espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500 (500 MHz para ^1H), os deslocamentos químicos (δ) são expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados no espectro de RMN ^1H pelo pico do hidrogênio pertencente a fração não deuterada do solvente (Clorofórmio - δ_{H} 7,27). Para a dissolução da amostra e obtenção do espectro foi utilizado solvente deuterado (Clorofórmio - CDCl_3), aproximadamente 30 mg em 0,5 mL de CDCl_3 . A caracterização da molécula foi realizada com base nas multiplicidades das bandas observadas no espectro de RMN ^1H e nos deslocamentos químicos (δ) em comparação com os dados reportados na literatura.

4.2.2 Quantificação de fenóis totais

A dosagem de fenóis totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Composto por dois ácidos, o fosfotungstístico e o fosfomolibdídico, cujo tungstênio e molibdênio apresentam estado de oxidação 6+. Na presença de agentes

redutores, como os compostos fenólicos, a média do estado de oxidação desses íons encontra-se entre 5 e 6, formando os chamados tungstênio molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é medida por espectrofotometria. Foram transferidos 100 µL da solução de EAFMU na concentração de 400 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 4 mL de água deionizada. Após alcalinizar o meio (3 mL de Na₂CO₃ a 10%), o volume foi completado com água deionizada. A concentração final do EAFMU foi 4 µg/mL. Decorrido 15 min, à temperatura ambiente, realizou-se a leitura espectrofotométrica (785 nm) no UV-VIS. Os compostos fenólicos totais foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/g) (Singleton; Orthofer; Lamuela- Raventós, 1999).

4.2.2.1 Preparo da solução padrão ácido gálico

A solução padrão de ácido gálico (solução estoque) foi preparada dissolvendo-se o equivalente a 10 mg do padrão, pesado analiticamente, e dissolvido em água deionizada usando balão volumétrico de 25 mL.

4.2.2.2 Preparo da curva de calibração

A curva de calibração de ácido gálico foi construída com o emprego de 6 concentrações de ácido gálico, com faixa de trabalho entre 1 e 6 µg/mL, preparadas por meio de diluições de alíquotas de uma solução estoque (400 µg/mL). Para cada ponto da curva foram utilizadas três réplicas.

4.2.3 Teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi quantificado utilizando a metodologia de Ahn et al. (2007) modificada. Foram transferidos 1.000 µL de EAFMU (1.000 µg/mL) para um balão de 10 mL, onde foram adicionados 800µL de AlCl₃ 2% e completado o volume com metanol 50%. A concentração final do EAFMU foi 100 µg/mL. Após 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi realizada a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 415nm no UV-VIS. O conteúdo de flavonoides foi expresso em equivalente de rutina (mg RU/g de extrato).

4.2.3.1 Preparação da solução padrão de rutina

A solução padrão de rutina (solução estoque) foi preparado dissolvendo-se o equivalente a 10 mg do padrão, pesado analiticamente e dissolvido em metanol usando balão volumétrico de 25 mL.

4.2.3.2 Preparo da curva de calibração

A curva de calibração de rutina foi construída com o emprego de 6 concentrações de ácido gálico, com faixa de trabalho entre 1 e 6 µg/mL, preparadas por meio de diluições de alíquotas de uma solução estoque (400 µg/mL). Para cada ponto da curva foram utilizadas três réplicas.

4.2.4 Caracterização físico-química e organoléptica

A caracterização física do pó foi realizada através das análises de cor, odor, densidade aparente, solubilidade em água e pH.

A análise da cor foi realizada de forma visual e o odor através do olfato, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). A solubilidade foi testada em água.

A densidade aparente do EAFMU foi calculada através do método da proveta. Um valor de massa conhecido do EAFMU foi vertido cuidadosamente em uma proveta graduada. Anotou-se o volume ocupado pelo pó, volume aparente.

$$\text{Densidade aparente: } da = m/va$$

Sendo: da = densidade aparente; m = massa da amostra e va = volume aparente.

Para determinação do pH foi feita uma solução aquosa a 1% com o EAFMU. O pH foi determinado por meio de técnica potenciométrica, com o equipamento pHmetro previamente calibrado na faixa de pH de 4,0 e 7,0. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3 Atividade Clareadora

4.3.1 Inibição da enzima tirosinase

A atividade de inibição da tirosinase foi determinada por espectrofotometria conforme descrito por Khatib et al. (2005), com adaptações. Foram preparadas soluções aquosas do EAFMU nas concentrações 125; 250; 500; 1.000, 1.500 e 2.000 µg/mL.

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1.200 µL de tampão fosfato (pH 6,8); 600 µL da tirosinase de cogumelo (Sigma-Aldrich) na concentração de 200 U/mL e 200 µL da solução com EAFMU.

Após 5 minutos, foi adicionado 2.000 µL de solução de L-tirosina na concentração de 2 mM. Foram feitas duas leituras no comprimento de onda de 492 nm, sendo a primeira após 30 minutos e a segunda após 60 minutos de reação. Ensaio realizado em triplicata.

Para o branco foi usado 1.800 µL de tampão fosfato; 200 µL do solvente do EAFMU (água) e 2.000 µL de tirosina 2 mM. Para o controle da enzima 1200 µL de tampão fosfato; 600 µL de tirosinase 200 U/mL; 200 µL do solvente EAFMU (água) e 2.000 µL de tirosina 2 mM. A variação da densidade ótica foi comparada na presença e ausência da amostra teste (EAFMU ou ácido kójico) para verificar a inibição da tirosinase. Ensaio realizado em triplicata. (Khatib et al.,2005). O ácido kójico foi utilizado com o padrão. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B) / A] \times 100$$

Sendo:

A = absorbância do controle

B = absorbância da amostra

4.3.2 Quelação do íon cobre

A enzima tirosinase possui duas moléculas de cobre em seu centro ativo. A quelação do cobre é um dos mecanismos de inibição dessa enzima. Em um tubo de ensaio adicionou-se 1.000 µL do extrato na concentração de 1.000 µg/mL e 4 mL de tampão fosfato pH 6,8. Após 10 minutos realizou-se leitura espectrofotométrica nos

comprimentos de onde de 250 a 500 nm (com intervalos de 5 nm). Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução de sulfato de cobre 100 mM, após tempo de espera de 10 minutos realizou-se leitura nos mesmos comprimentos de onda. O ácido kójico foi usado como padrão. O deslocamento batocrômico indica quelação desse íon (Da Silva et al., 2017).

4.4 Avaliação da atividade antioxidante

4.4.1 Sustâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS

A atividade foi medida de acordo com um método modificado descrito por Costa et al., 2012. Foi avaliada a capacidade antioxidante do EAFMU em prevenir a peroxidação lipídica através da medição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Foram preparadas soluções de EAFMU nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL e do trolox (substância controle) a 200 µg/mL. O substrato lipídico utilizado foi a gema do ovo, em uma concentração de 1%, homogeneizado com o tampão fosfato de potássio pH 7,4. Posteriormente, 1.000 µL da solução lipídica foi adicionado a 100 µL de cada concentração do EAFMU, e a esta solução foi somada à 100 µL da solução de AAPH 0,12 M. Posteriormente, foi deixada em banho-maria a 37° C por 30 min.

Após esfriar, a 500 µL dessa mistura foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 15%. A solução foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 min.

Após a centrifugação, 500 µL do sobrenadante foi retirado e misturado a 500 µL ácido tiobarbitúrico. As amostras foram encubadas em banho-maria a 95°C por 30 min e lidas em espectrofotômetro (MOD. GÊNESYS 10S UV-Vis) a 532 nm. Ensaio realizado em triplicata. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B) / A] \times 100$$

Sendo:

A = absorvância do controle

B= absorvância da amostra

4.4.2 Método do DPPH

A atividade foi medida de acordo com um método modificado de Saint-Cricq de Gaulejac, Provost e Vivas (1999) modificado. O método é baseado na redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), usando como padrão a vitamina C.

Foram preparadas soluções de EAFMU nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL; o padrão vitamina C a 50 µg/mL e uma solução etanólica de DPPH a 50 µg/mL. Posteriormente, uma alíquota de 2,5 mL de cada concentração dos extratos foi adicionada em 1 mL da solução etanólica de DPPH 0,5 mg/mL .

Após 30 min de reação, foi feita leitura em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 518 nm. Como controle negativo foi utilizada água e a solução de DPPH. Ensaio realizado em triplicata.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a Equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B) / A] \times 100$$

Sendo:

A = absorvância do controle

B = absorvância da amostra

4.4.3 Radical hidroxil

A atividade foi medida de acordo com um método modificado descrito por Zhao et al. (2006). Primeiro, 20 µL do EAFMU (50, 100 µg / mL) foram adicionados a 20 µL de EDTA 1 mM, 20 µL de FeCl₃ 1 mM, 20 µL de desoxirribose 36 mM, 20 µL de H₂O₂ 10 mM e 20 µL de ascorbato 1 mM em placa de 96 poços. Após 1 hora, 200 µL de ácido tricloroacético (10%) e 200 µL de ácido tiobarbitúrico (1% em NaOH 50 mM) foram adicionados e incubados a 85 ° C por 15 minutos. A absorvância foi medida a 532 nm.

4.5. Avaliação da atividade fotoprotetora

4.5.1 Varredura UVB e UVA

O perfil de absorção do EAFMU na faixa de ultravioleta foi realizado como primeiro passo para demonstrar sua atividade fotoprotetora, a varredura foi feita na faixa de UVA (320-400 nm), na faixa de UVB (290-320 nm). A faixa de absorção está

relacionada com a capacidade de proteção a radiação solar. O espectro de absorção do filtro químico benzofenonas-3 foi usado como referência.

4.5.2 Análise de FPS

Para a determinação do FPS, utilizou-se a metodologia espectrofotométrica de Mansur et al. (1986). O EAFMU foi diluído em água deionizada até a concentração final de 0,2 mg/mL. As análises das amostras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro, e a absorbância das soluções foi medida em comprimentos de onda definidos (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm). A benzofenonas-3 foi usado como referência. Para obtenção do fator de proteção solar (FPS), a média das absorbâncias (n=3) foi inserida na equação 1, sendo que, os valores utilizados para $[EE(\lambda) \times i(\lambda)]$ em cada comprimento de onda foram os mesmos preconizados por Mansur et al. (1986).

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

Sendo: FC = Fator de Correção (igual a 10); $EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda λ ; $i(\lambda)$ = intensidade da luz solar no comprimento de onda; $Abs(\lambda)$ = leitura espectrofotométrica da absorbância da amostra em cada comprimento de onda.

4.6. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

4.6.1 Cultivo das linhagens de fibroblastos murinos

A linhagem de fibroblastos murinos L929 (ATCC® clone 929) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivada em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de antibiótico (100 UI/mL de Penicilina/estreptomicina 100 µg/mL) (Gibco) em estufa de a 37°C em incubadora (Panasonic modelo MCO 19AICUU-PA) com 95% de umidade e 5% de CO₂. O crescimento celular foi observado em um microscópio invertido de contraste de fase (LABOMED, modelo TCM 400). A manutenção das garrafas foi realizada duas vezes por semana, utilizando tripsina em EDTA 0,05% (Gibco®) para remover as células da garrafa quando atingida a confluência de 60 – 70% de ocupação.

4.6.2 Avaliação do efeito do EAFMU na viabilidade de fibroblastos murinos pelo método da Sulforodamina B (SRB)

A determinação da viabilidade celular induzida pelo EAFMU foi avaliada pelo método da sulforodamina B (SRB), que é um método colorimétrico de ponto final, no qual é possível determinar a quantidade de células viáveis através de uma estimativa da massa de proteína total (Papazisis et al., 1997). O corante SRB tem a capacidade de se ligar a aminoácidos básicos proteicos presentes nas células viáveis. Após 24 h de crescimento celular, foram adicionadas diferentes concentrações de EAFMU (0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,3; 12,5; 25 µg/mL) por 24, 48 e 72 h. Após o tempo de incubação, o meio de cultivo foi removido e as células foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v), por no mínimo 1h a 4°C, em seguida coradas com 100 µL de SRB 0,4% ((p/v) em ácido acético 1%) e mantidas em incubadora com 5% CO₂ a 37°C por 30 min. As placas foram lavadas com ácido acético 1% para a remoção do excesso de corante, e então adicionados 200 µL de solução de leitura tampão Tris-base (10 mM) e homogeneizado por 10 minutos (Houghton et al., 2007). A absorbâncias (Abs) da placa foram lidas em leitora de microplacas (Multiskan FC – Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados do SRB foram expressos como percentual de viabilidade celular, determinado através da fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \left(\frac{Abs \text{ da amostra}}{Abs \text{ da média do grupo controle DMEM}} \right) \times 100$$

4.7 Desenvolvimento da fórmula

4.7.1 Estudo de compatibilidade do agente de viscosidade

Foram feitos quatro testes usando os agentes de viscosidade: Aristoflex®AVL; Carbopol® 940, Natrosol e Goma xantana. Sendo:

Fórmula 1: Aristoflex®AVL 4% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp. 20 mL

Fórmula 2: Carbopol® 940 2% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp. 20 mL

Fórmula 3: Natrosol 4% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp. 20 mL

Fórmula 4: Goma xantana 4% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp. 20 mL

4.7.2. Preparação da formulação

Tendo como base o estudo de compatibilidade dos agentes de viscosidade, foi desenvolvida a fórmula de um sérum facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (SFMU), para fins comparativos, preparou-se também a formulação “Branco” que consiste na mesma fórmula substituindo o EAFMU por água deionizada (Tabela 4). A formulação abaixo, bem como o método de preparo, está protegida pelo Depósito de Patente junto ao Instituto de Propriedade Industrial - INPI. Número do Processo: BR 10 2022 011452 8.

Tabela 4 - Formulação quali e quantitativa do SFMU e função dos ingredientes.

Ingrediente	INCI	Função	Uso (%p/p)
Aristoflex AVL	Caprylic/capric triglyceride (and) ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer (and) trilaureth-4 phosphate (and) polyglyceryl-2-sesquiisostearat	Agente de viscosidade/emulsionante	1,00
EAFMU	-	Ativo	1,00
Óleo de rosa mosqueta	Rosa Canina Fruit Oil	Emoliente	1,00
Goma xantana	Xanthan Gum	Agente de viscosidade	0,50
Glicerina	Glycerin	Umectante	2,00
EDTA	Disodium EDTA	Quelante	0,10
Fenoxietanol + etilhexilglicerina	Phenoxyethanol (and) Ethylhexylglycerin	Conservante	0,50
BHT	BHT	Antioxidante	0,05
Trietanonamina	Triethanolamine	Alcalinizante	qs.
Água deionizada	Aqua	Veículo	qsp.

INCI: *Internacional Nomenclature of Cosmetic*; %p/p: % peso/peso.

Modo de preparo: a) Misturar o EDTA e fenoxietanol + etilhexilglicerina com água deionizada (FASE A); b) usar 67% do volume da FASE A para solubilizar o Aristoflex® AVL, realizar esse processo sob agitação (FASE B); c) solubilizar o EAFMU em 5% do volume da FASE A (FASE C); d) levigar a goma xantana na glicerina e após bem homogeneizado, adicionar o restante da mistura preparada na FASE A, realizar esse processo sob agitação (FASE D); e) solubilizar o BHT no óleo de rosa mosqueta (FASE E); f) misturar a FASE B e FASE D, sob agitação constante até completa homogeneização e em seguida adicionar a FASE E, mantendo a agitação em agitador mecânico a 1.000 rpm por 5 minutos. Ajustar o pH com trietanolamina até pH 7,5. Após 24 horas adicionar a FASE C mantendo a agitação em agitador mecânico a 1.000 rpm por 5 minutos. O pH após estabilização deverá estar na faixa de 4,50. Para o Branco não é necessário ajuste de pH, e a última etapa, ao invés de adicionar a solução com o EAFMU, adicionou-se somente 5% da FASE A.

4.7.3 Estudo do pH da formulação

As amostras foram submetidas à avaliação de pH através da utilização de um pHmetro digital. Primeiramente, o eletrodo foi calibrado com as soluções tampões de pH 7,0 e 4,0, respectivamente. Após a calibração, a determinação do pH foi realizada introduzindo o eletrodo diretamente nas amostras, visto que foi utilizado eletrodo específico para semi-sólidos.

A análise visual das amostras foi feita nos pH de 4,0 a 9,5, com intervalos de 0,5. Para realização deste ensaio, o ajuste do pH com trietanolamina foi feito após a incorporação do EAFMU.

4.7.4 Análise físico-química

De acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da Anvisa, “Creme, loção, gel ou óleo para o rosto/ corpo/ cabelos/mãos/pés”, grupo ao qual o SFMU se enquadra, devem realizar os seguintes ensaios: pH, viscosidade, densidade (Brasil, 2008). Todos os ensaios também foram realizados no “Branco”.

4.7.4.1 pH

A análise foi feita conforme descrito em 4.7.3

4.7.4.2 Viscosidade

Foi realizado através do método rotativo usando o viscosímetro rotacional (Série MVD-8 Marca Marte). Inicialmente foi escolhido o fuso (*spindle*) L3 e a velocidade de 60 rpm. A seguir, mergulhou-se o fuso diagonalmente na amostra com temperatura estabilizada, conforme especificado, isenta de bolhas, até a marca (sulco) da haste do fuso e nivelou-se o aparelho. Verificada a ausência de bolhas junto ao fuso, procedeu-se à leitura da viscosidade, de acordo com o procedimento operacional do aparelho.

4.7.4.3 Densidade

Foi realizado utilizando um picnômetro de metal. Pesou-se o picnômetro vazio e anotou-se o seu peso (M0). A seguir, foi enchido completamente com água purificada, evitando-se a introdução de bolhas. Após secá-lo cuidadosamente, pesou-se novamente (M1). O próximo passo foi encher completamente o picnômetro (limpo e seco) com a amostra, evitando a formação de bolhas. Depois de secá-lo cuidadosamente, foi pesado novamente (M2).

Cálculo:

$$densidade = \frac{M2 - M0}{M1 - M0}$$

Sendo: d = densidade M0 = massa do picnômetro vazio, em gramas M1 = massa do picnômetro com água purificada, em gramas M2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas.

4.7.5 Análise das características organolépticas

De acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da Anvisa, “Creme, loção, gel ou óleo para o rosto/ corpo/ cabelos/mãos/pés”, grupo ao qual o SFMU se enquadra, devem realizar os seguintes ensaios: cor, aspecto e odor (Brasil, 2008).

A análise de cor e aspecto deve ser visual e a de odor através do olfato.

4.8 Análise segurança da formulação

4.8.1 Irritabilidade dérmica primária, acumulada e a sensibilização

O ensaio foi realizado pela IPCLIN – Instituto de Pesquisa Clínica e Integrada, empresa habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas).

Foram selecionados 60 participantes de ambos os sexos, com idade entre 20 a 65 anos e fototipo de I a IV. Foi empregado o teste de contato (*patch test*). O produto e o controle foram aplicados sob apósito semi-oclusivo no dorso dos participantes, no lado direito ou esquerdo (de acordo com a randomização). A metodologia detalhada está devidamente descrita no Relatório do Ensaio (Anexo 1), documento emitido pela IPCLIN.

4.9 Análise de estabilidade da formulação

4.9.1 Teste de centrifugação

O SFMU foi submetido ao teste de centrifugação, que consiste em centrifugar uma amostra a 3.000 rpm durante 30 minutos. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade (Brasil, 2004).

4.9.2 Teste de estabilidade

Amostras de, aproximadamente, 100,0 g e 25,0 g foram acondicionadas em potes de vidro de boca larga com boa vedação, sendo o primeiro para realização dos ensaios e o segundo para análise de características organoléptica. Este estudo tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil estimada e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (Brasil, 2004).

As amostras foram submetidas às seguintes condições, durante 90 dias e analisadas nos tempos: 24 horas após o preparo (T0), 7° (T7), 15° (T15), 30° (T30), 60° (T60) e 90° dias (T90), sendo a análise química até o T60.

- Temperatura baixa (geladeira): $5,0 \pm 2,0$ °C;
- Temperatura ambiente: $25,0 \pm 2,0$ °C;
- Temperatura elevada (estufa): $40,0 \pm 2,0$ °C.

Os parâmetros avaliados foram as características:

- Físico-química (pH, viscosidade e densidade);
- Organolépticas (aspecto, cor e odor);
- Química (quantificação de ácido gálico).

Para os ensaios organolépticos adotou-se a classificação do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (Brasil, 2004).

As metodologias usadas para análise dos parâmetros acima foram descritas em 4.7.3 (pH); 4.7.4.2 (viscosidade); 4.7.4.3 (densidade) e 4.7.5 (organoléptico). Sendo a metodologia para quantificação do ácido gálico devidamente descrita abaixo.

4.9.2.1 Análise química

Foi realizada quantificação de ácido gálico no SFMU em todos os tempos predeterminados (T0, T7, T15, T30, T60) por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fase móvel foi o Metanol/H₂O (Ácido acético 2%), relação 20:80 em modo isocrático. e a coluna usada foi Phenomenex C₁₈ (250 x 10,0 mm) 5 µm. A amostra foi diluída em água deionizada. Temperatura do forno: 40°C. Fluxo: 0.5 mL/min. Volume de injeção: 10 µL. A detecção, através do detector DAD (Shimadzu UFLC-PDA SPD-M20A), foi realizada em uma faixa de comprimento de onda de 254 nm.

Preparação da curva de calibração do ácido gálico:

Utilizou-se como ponto de referência a concentração de 100 ppm. Foram pesados 10,0 mg de ácido gálico, e solvidos em 1.000 µL de água deionizada, a solução foi deixada por 10 minutos no ultrassom para homogeneização. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi tomada e levada ao volume final de 1.000 µL. Finalmente, uma alíquota de trabalho de 100 µL foi tomada e levada ao volume final de 1.000 µL com o diluente, filtrado para ser injetado no equipamento. Concentração final: 0,1 mg/mL.

Análise de SFMU

Foram pesados 100 mg de SFMU (equivalente a 1 mg de ácido gálico) e dissolvidos em 1.000 µL de água deionizada, em seguida, a solução foi levada ao ultrassom por 10 minutos para completa homogeneização. Logo após, foi colhida uma alíquota de trabalho de 100 µL, levada ao volume final de 1.000 µL, filtrada para ser injetada no equipamento. Concentração final (em equivalente de ácido gálico): 0,1 mg/mL.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6. A análise do comportamento dos parâmetros do teste de estabilidade em relação ao tempo (dias) foi analisada por regressão linear, considerando um $p < 0,05$. Para comparar as inclinações e interceptos dos três conjuntos de dados (geladeira, temperatura ambiente e estufa) foi aplicado a Análise de Covariância (ANCOVA) considerando um $p < 0,25$. No ensaio de citotoxicidade a distribuição normal foi avaliada pelo teste de ShapiroWilke. Os dados que seguiram a normalidade (paramétricos) foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, para a comparação dos grupos. Os resultados foram expressos como média e em todas as situações, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

Para os demais testes, a Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as médias das porcentagens, aplicando pós-teste de Tukey e considerando um $p < 0,05$.

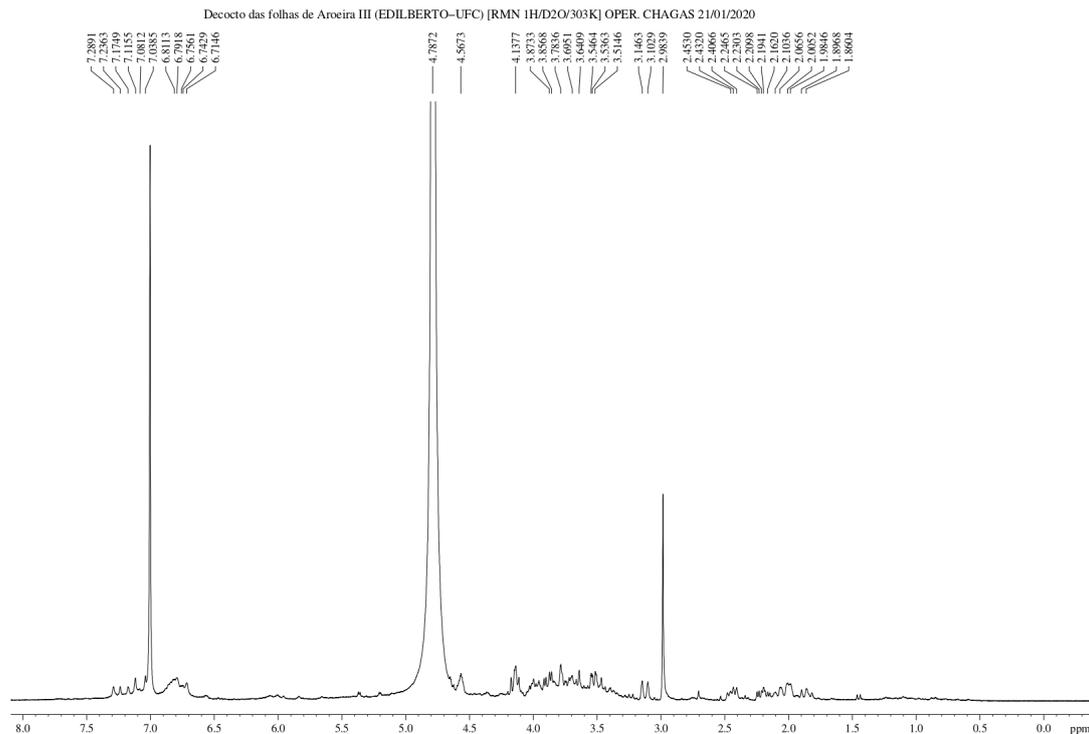
5. RESULTADOS

5.1 Caracterização química

5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear – RMN

De acordo com o espectro, Figura 6, pode-se ver que os compostos majoritários são: ácido gálico, seu precursor ácido quínico e N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina. O sinal em δ H 7,04 corresponde aos dois hidrogênios do anel benzênico. Observa-se também a presença da quercetina e seus derivados, mas pela intensidade do pico, encontram-se em baixa concentração. Aquino et al. (2019) através de equipamento de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), isolou 24 (vinte e quatro) compostos. Cada composto isolado foi identificado pela massa, fragmentação MS/MS, e a estrutura foi confirmada por análises de RMN, incluindo experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC, HMBC e NOESY. A estrutura química de todos os compostos está devidamente representada na Tabela 1.

Figura 6 - Espectro do EAFMU obtido por RMN ^1H .



Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*; RMN ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de Próton.

5.1.2 Quantificação de fenóis totais

A quantificação de substâncias fenólicas em EAFMU foi realizada utilizando EAFMU na concentração final de 4 µg/mL. A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração (Tabelas 5 e 6 e Figura 7). Os valores da média da absorbância da amostra de EAFMU ($0,268 \pm 0,008$) foram interpolados na curva de calibração, obtendo assim a concentração de 568,82 mg equivalentes de ácido gálico por grama (EAG/g) de extrato.

Tabela 5 - Concentração de fenóis totais do EAFMU obtidos por espectrofotometria UV/VIS a 785 nm.

ABSORBÂNCIA ± DP	CONCENTRAÇÃO mg EAG/g	%
0,268 ± 0,008	568,82	56,88

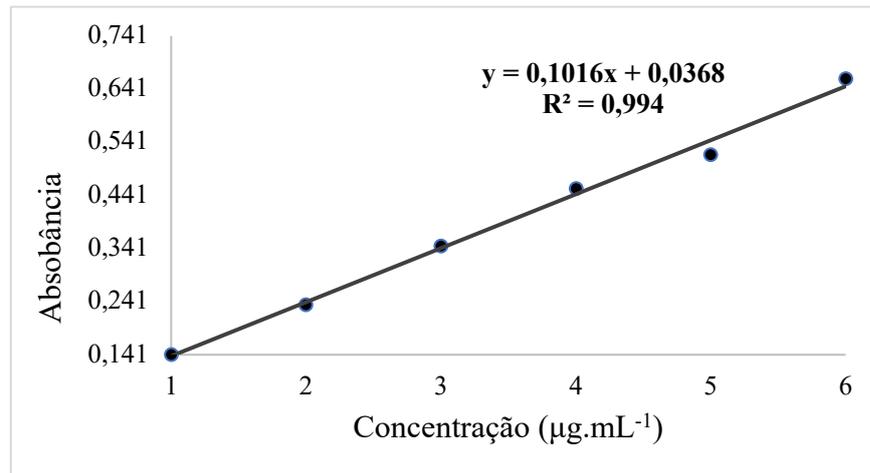
Legenda: EAG/g = equivalente ácido gálico por grama. Os resultados foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

Tabela 6 - Absorbância do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria UV/VIS a 785 nm.

CONCENTRAÇÃO	
(µg EAG/mL)	ABSORVÂNCIA ± DP
1	0,141± 0,002
2	0,235± 0,002
3	0,346± 0,004
4	0,454± 0,007
5	0,518± 0,005
6	0,661± 0,005

Legenda: EAG/g = equivalente ácido gálico por grama. Os resultados foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

Figura 7 - Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS a 785 nm.



5.1.3. Teor de flavonoides

A quantificação de flavonoides de EAFMU foi realizada utilizando extrato com concentração final de 100 µg/mL. A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração (Tabelas 7 e 8 e Figura 8.). Os valores da média da absorbância da amostra de extrato ($0,201 \pm 0,002$) foram interpolados na curva de calibração, obtendo assim a concentração de 25,44 mg equivalentes de rutina por grama (ERU/g) de extrato.

Tabela 7 - Concentração de flavonoides do EAFMU obtidos por espectrofotometria UV/VIS a 415 nm.

ABSORBÂNCIA ± DP	CONCENTRAÇÃO µg ERU/g	%
0,201 ± 0,002	25,44	2,54

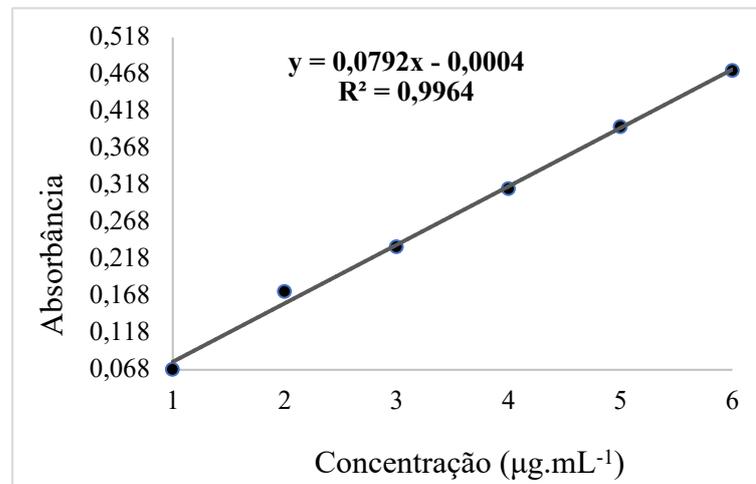
Legenda: EAG/g = equivalente rutina por grama. Os resultados foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

Tabela 8 - Valores de absorvância, concentração de flavonoides e percentual do ELFLF obtidos por espectrofotometria UV-VIS a 415nm.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g EAG/mL}$)	ABSORVÂNCIA \pm DP
1	0,068 \pm 0,004
2	0,174 \pm 0,003
3	0,232 \pm 0,003
4	0,315 \pm 0,003
5	0,395 \pm 0,006
6	0,471 \pm 0,003

Legenda: EAG/g = equivalente rutina por grama. Os resultados foram expressos em média \pm Desvio Padrão (n = 3).

Figura 8 - Curva de calibração da rutina obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS a 415 nm.



5.1.4 Caracterização físico-química e organoléptica

As propriedades físico-químicas e organolépticas do EAFMU estão apresentadas na Tabela 9 e a imagem do extrato na Figura 9.

Tabela 9 - Caracterização física-química do EAFMU.

Propriedades	EAFMU
Cor	Marrom amarelado
Odor	Característico
Aspecto	Pó homogêneo
Densidade aparente	0,476 ± 0,001 g/cm ³
Solubilidade em água	Facilmente solúvel
pH	3,80 ± 0,015

Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Os resultados foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

Figura 9 – EAFMU - Extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva* liofilizado (extrato seco)

5.2 Avaliação da atividade clareadora

5.2.1 Inibição da enzima tirosinase

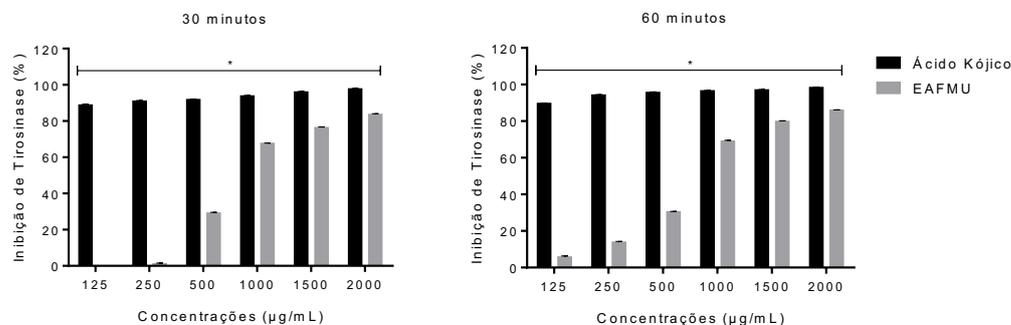
O EAFMU teve eficaz atividade inibidora da enzima tirosinase. Na concentração de 1.500 µg/mL o extrato inibiu, com 30 minutos de reação, 76,48% da enzima e o padrão ácido kójico na mesma concentração inibiu 96,17%. Observou-se também o padrão na concentração de 125 µg/mL já apresentou atividade bastante eficaz, já o EAFMU essa atividade foi revelada sobretudo a partir da concentração de 500 µg/mL. Nenhuma das amostras testadas teve decaimento de inibição no tempo de 60 minutos quando comparado ao tempo de 30 minutos (Tabela 10 e Figuras 10 e 11).

Tabela 10 - Avaliação da atividade inibidora da tirosinase do EAFMU e ácido kójico nos tempos de 30 e 60 minutos.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	30 minutos		60 minutos	
	EAFMU	Ac. Kójico	EAFMU	Ac. Kójico
125	0,00 \pm 0,00	88,90 \pm 0,42	5,890 \pm 0,44	89,71 \pm 0,17
250	1,21 \pm 0,29	91,10 \pm 0,25	13,98 \pm 0,23	94,34 \pm 0,09
500	29,28 \pm 0,23	91,92 \pm 0,25	30,52 \pm 0,10	95,75 \pm 0,16
1000	67,71 \pm 0,14	93,97 \pm 0,23	69,19 \pm 0,31	96,68 \pm 0,09
1500	76,48 \pm 0,30	96,17 \pm 0,23	79,97 \pm 0,17	97,17 \pm 0,09
2000	83,76 \pm 0,29	97,81 \pm 0,24	86,03 \pm 0,10	98,41 \pm 0,10

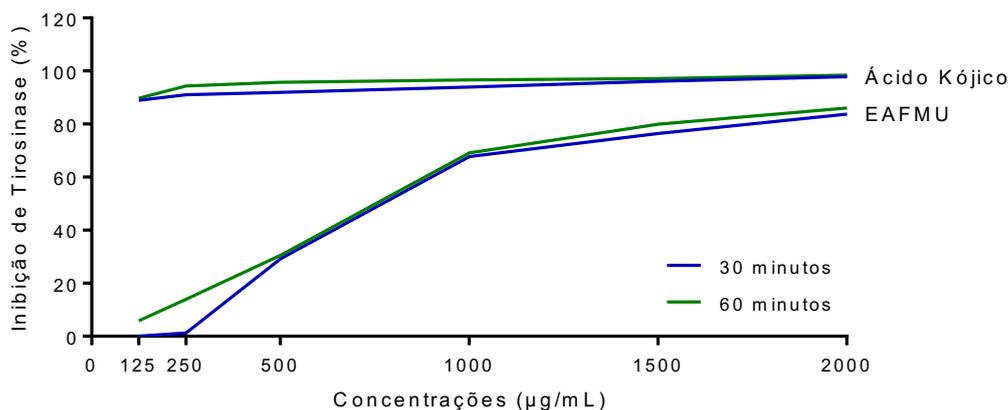
Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Os resultados foram expressos em média \pm Desvio Padrão (n = 3).

Figura 10 - Comparação da inibição de Tirosinase pelo ácido kójico e EAFMU nos tempos de 30 e 60 minutos.



Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Análise de Variância (ANOVA), pós Test Tukey. Significância se $p < 0,05$.

Figura 11 - Taxa de inibição de tirosinase de acordo com o tempo e as concentrações de ácido kójico e EAFMU.

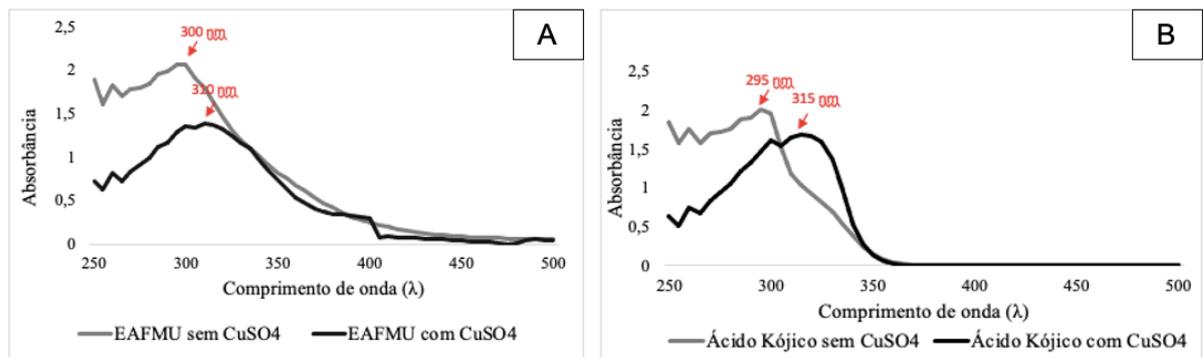


Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*.

5.2.2 Quelação do íon cobre

O deslocamento batocrômico indica atividade de quelação do íon cobre. O EAFMU causou deslocamento de 10 nm (300 → 310), Figura 12A. Já o padrão ácido kójico provocou deslocamento de 20 nm (295 → 315), Figura 12B.

Figura 12 - Espectros de absorção de UV/VIS do EAFMU (A) e ácido kójico (B) com e sem CuSO_4 para avaliação capacidade quelante de íons de cobre.



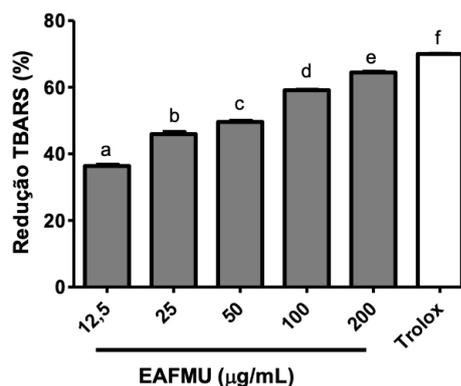
Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante

5.3.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS

O EAFMU apresentou um forte potencial antioxidante. Na contração de 200 $\mu\text{g/mL}$, o extrato alcançou inibição de 64,43%, enquanto o padrão trolox, na mesma concentração, obteve inibição de 70,01%. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ inibição chegou a quase 50%. Os resultados estão na Figura 13.

Figura 13 - Avaliação da atividade antioxidante do EAFMU e do trolox através da metodologia de TBARS.

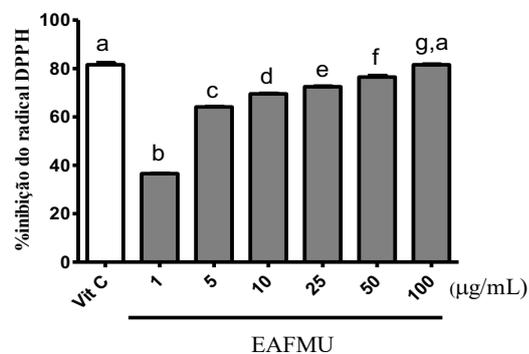


Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*; TROLOX = concentração 200 µg/mL. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. (n = 3). Letras iguais nas barras não significam diferença estatística (p < 0,05) após análise de variância (one-way ANOVA) seguida do teste de Tukey.

5.3.2 Método do DPPH

O EAFMU apresentou um forte potencial antioxidante. Na contração de 50 µg/mL, o extrato alcançou inibição de 76,46%, enquanto que o padrão vitamina C, na mesma concentração, obteve inibição de 81,53%. Já na concentração de 100 µg/mL, EAFMU não apresentou diferença significativa em relação ao padrão na concentração de 50 µg/mL. Os resultados estão na Figura 14.

Figura 14 - Avaliação da atividade antioxidante do EAFMU e da vitamina C através da metodologia de DPPH.

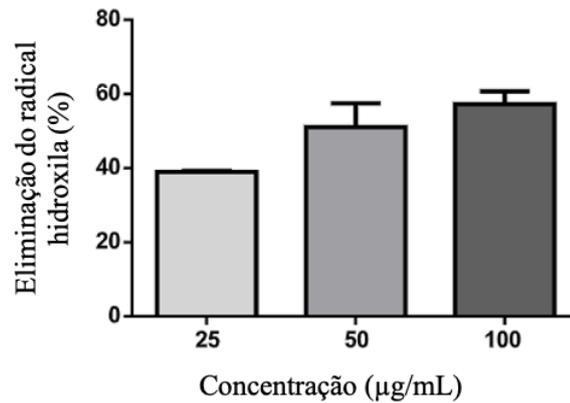


Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *M. urundeuva*; Vit C = Vitamina C (50 µg/mL). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. (n = 3). Letras iguais nas barras não significam diferença estatística (p < 0,05) após análise de variância (one-way ANOVA) seguida do teste de Tukey.

5.3.3 Radical hidroxil

O radical hidroxil (HO[•]) é um dos mais deletérios radicais livres, pois sua meia-vida é muito curta, o que faz com que o ataque às células seja muito rápido. O EAFMU na concentração de 50 µg/mL apresentou atividade inibidora do radical superior a 50%, demonstrando que *in vitro* tem atividade antioxidante satisfatória frente a esse radical. Os resultados estão na Figura 15.

Figura 15 - Avaliação da atividade antioxidante do EAFMU através da metodologia do radical hidroxil.



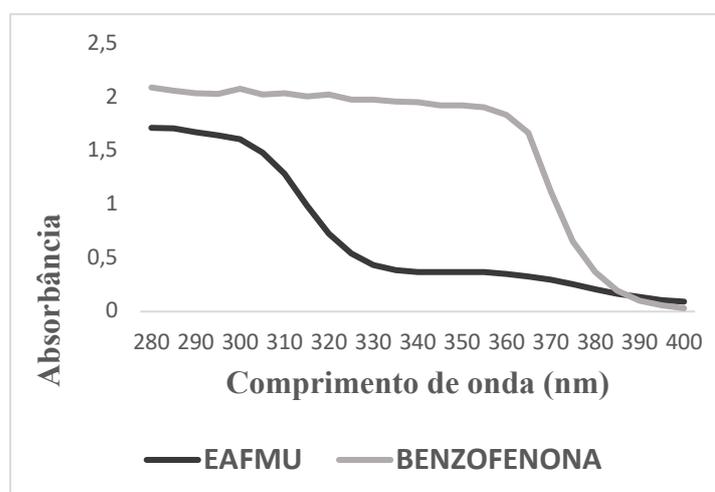
Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. O experimento foi realizado em triplicata. Utilizou-se análise de variância ANOVA, a qual não identificou diferença significativa entre as concentrações avaliadas ($p = 0,0520$).

5.4. Avaliação da atividade fotoprotetora

5.4.1 Varredura UVB e UVA

Como pode ser visto na Figura 16, o EAFMU absorveu a radiação ultravioleta nos comprimentos de onda relativos ao UVB, já o padrão benzofenona-3, como esperava-se, absorveu a radiação nos comprimentos de onda relativos ao UVB e em boa parte de UVA.

Figura 16 - Varredura do EAFMU e da benzofenona-3 nos comprimentos de onda de 280 a 400 nm.



Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*.

5.4.2 Análise de FPS

Os valores obtidos na varredura nos comprimentos de 290 a 320 nm foram inseridos na equação de Mansur e obtidos os resultados que podem ser vistos na tabela 11. O FPS do EAFMU demonstrou-se bastante satisfatório.

Tabela 11 - Valores de FPS de EAFMU e benzofenona-3.

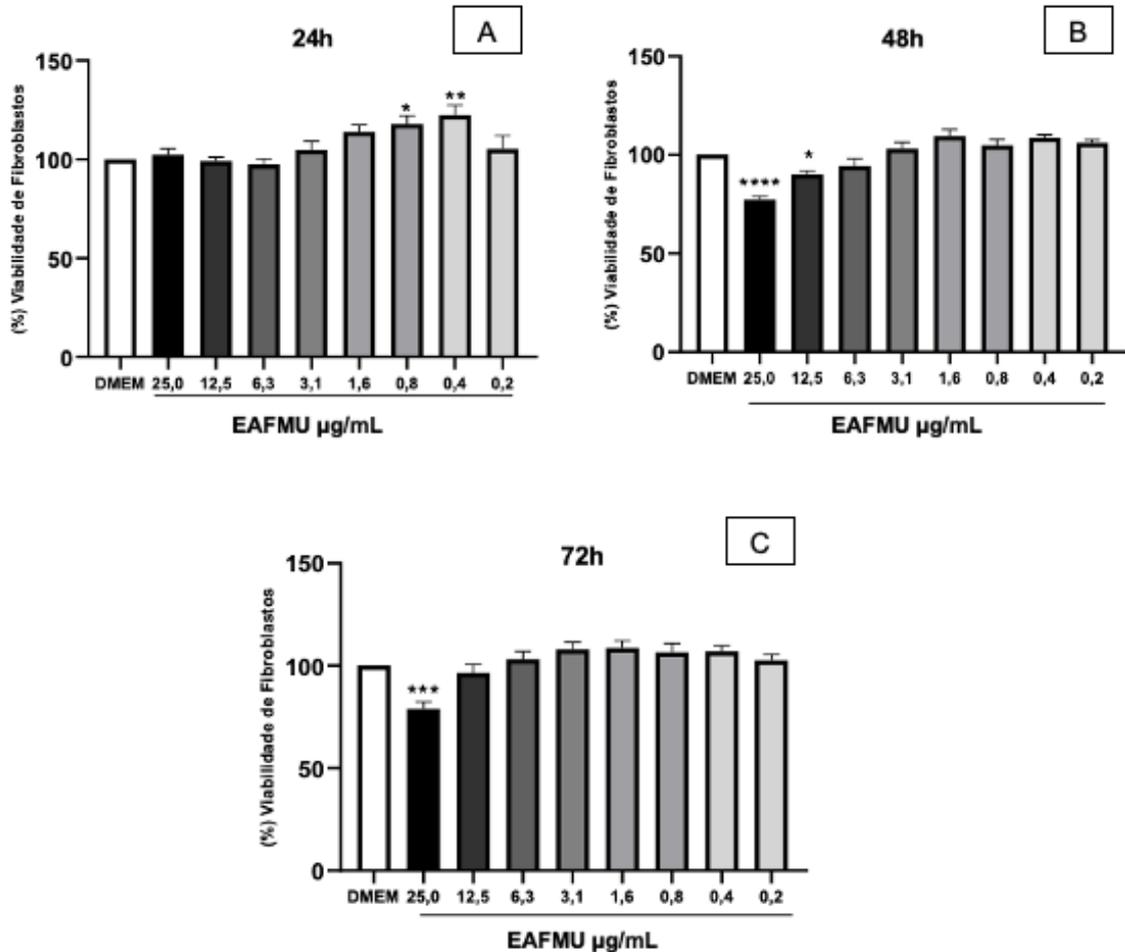
	FPS ± DP
EAFMU	14,43 ± 0,015
Benzofenona-3	20,39 ± 0,020

Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Os resultados foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

5.5. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Nas primeiras 24 horas, EAFMU não foi citotóxico em nenhuma das concentrações, sendo capaz de aumentar significativamente a proliferação celular nas concentrações de 0,8 e 0,4 µg/mL: (118,0 e 122,6% p<0,05) em relação ao grupo DMEM - Figura 17A). Após 48 horas, somente as concentrações de 25 e 12,5 µg/mL (77,28 e 90,17% p <0,05) reduziram a proliferação celular em relação ao grupo controle - Figura 17B). Em 72 h, apenas a maior concentração foi citotóxica quando comparada ao grupo DMEM (78,89% p <0,05- Figura 17C).

Figura 17 - Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com EAFMU pelo método de SRB, após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C).



Legenda: EAFMU = extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. A viabilidade celular de fibroblastos pelo SRB foi expressa após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de incubação com EAFMU (0,2 – 25 µg/mL). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo DMEM 2,5%.

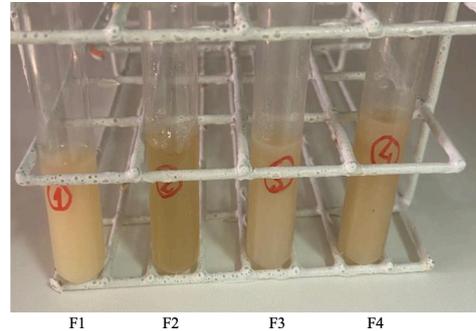
5.6 Desenvolvimento da formulação

5.6.1 Estudo de compatibilidade com agente de viscosidade

O EAFMU foi compatível com os quatro agentes de viscosidade testados, como pode ser visto na Figura 18. Em todos os testes houve aumento da viscosidade e homogeneidade, sem nenhum indício de possível incompatibilidade. Optou-se por prosseguir o estudo com o Aristoflex® AVL, por na sua composição também possuir

agente emulsificante, tornando importante para incorporação do óleo de rosa mosqueta; e também com a goma xantana.

Figura 18 - Avaliação da compatibilidade do EAFMU com os agentes de viscosidade.

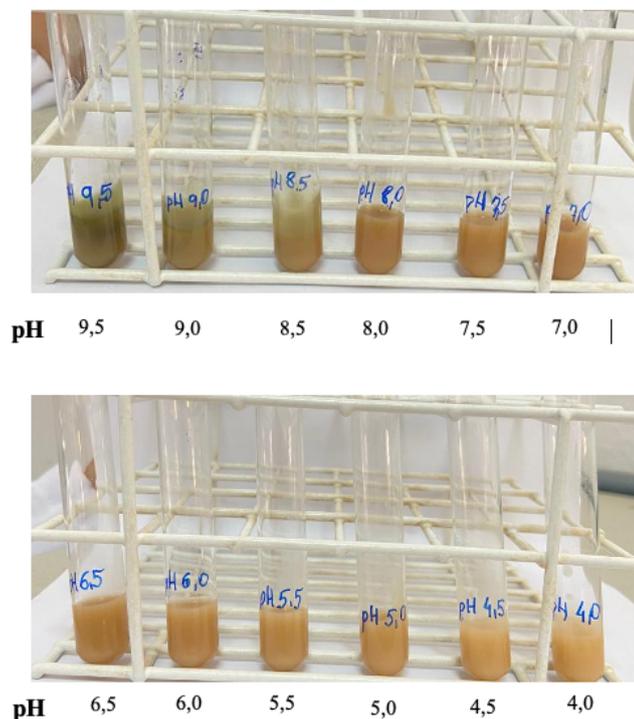


Legenda: F1 = Fórmula 1 (Aristoflex®AVL 4% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp.); F2 = Fórmula 2 (Carbopol 2% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp.); F3 = Fórmula 3 (Natrosol 4% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp.); F4 = Fórmula 4 (Goma xantana 4% + EAFMU 1% + Água deionizada qsp.).

5.6.2 Estudo de pH da formulação

De acordo com análise visual, Figura 19, optou-se por trabalhar com o SFMU na faixa de pH de 4,0 a 4,5, visto que a partir do pH 5,0 houve escurecimento, podendo ser indicativo de oxidação.

Figura 19 - Análise visual da mudança da cor do SFMU nos pH de 4,0 a 9,5.



5.6.3 Análise físico-química

Os parâmetros físico-químicos para prosseguimento dos estudos foram definidos conforme Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de pH, viscosidade e densidade do SFMU e Branco.

	pH ± DP	Viscosidade (mPa.S) ± DP	Densidade (g/cm³) ± DP
SFMU	4,50 ± 0,020	893 ± 4,04	1,0055 ± 0,0004
Branco	4,43 ± 0,020	1.380 ± 4,04	0,9983 ± 0,0004

Legenda: SFMU = Sérum Facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Os resultados foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

5.6.4 Análise organolépticas

Os parâmetros organolépticos para prosseguimento dos estudos foram definidos conforme Tabela 13.

Tabela 13 - Avaliação das características organolépticas de SFMU.

	Aspecto	Cor	Odor
SFMU	Líquido levemente viscoso com aspecto de sérum	Amarelado	Característico
Branco	Líquido levemente viscoso com aspecto de sérum	Branco leitoso	Característico

Legenda: SFMU = Sérum Facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*

5.7 Análise segurança da formulação

5.7.1 irritabilidade dérmica primária, acumulada e a sensibilização

A empresa IPCLIN, através do ensaio de *patch test*, não detectou reações adversas nas áreas de aplicação do produto e do controle durante o período de estudo. Nenhum participante referiu sensação de desconforto ao produto. Dessa forma, no laudo obtido, consta a seguinte conclusão: “O produto não induziu processo de irritação e sensibilização cutânea, durante o período de estudo e, portanto, suporta

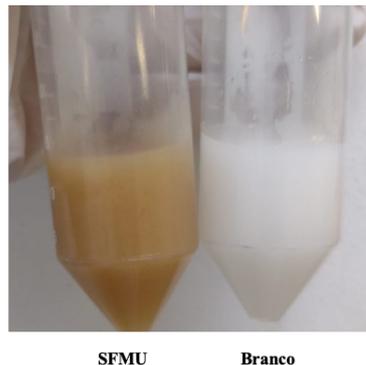
o apelo Dermatologicamente testado”. Os resultados estão devidamente apresentados no Relatório do Ensaio (Anexo 1), documento emitido pela IPCLIN.

5.8 Análise de estabilidade da formulação

5.8.1 Teste de centrifugação

O SFMU manteve-se estável após a centrifugação, sem nenhum indício de precipitação, como pode ser visto na Figura 20.

Figura 20 - Teste de centrifugação do SFMU e Branco



Legenda: SFMU = Sérum Facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*

5.8.2 Teste de estabilidade

O SFMU e Branco foram submetidas a temperatura baixa/geladeira – TG ($5,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$) e temperatura elevada/estufa ($40,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$), sendo avaliados os parâmetros: físico-químico (pH, viscosidade e densidade); organolépticas (aspecto, cor e odor) e químico (quantifica o de ácido gálico). As amostras foram analisadas em nos tempos de T0, T7, T15, T30, T60 e T90 (Tabelas 14 e 15), sendo a análise química até o T60. Para análise de pH, viscosidade, densidade foi usado o percentual (%) de varia o em rela o ao T0.

A Figura 21 mostra o acompanhamento da cor do SFMU e Branco. Também foi realizada análise de pH, viscosidade e densidade por regressão linear (Figura 22).

Tabela 14 - Valores de pH, viscosidade, densidade com suas respectivas % de variação em relação a T0, desvio padrão e aspectos organolépticos do SFMU em T0, T7, T15, T30, T60 e T90

		GELADEIRA					AMBIENTE					ESTUFA				
Tempo (dias)	T0	T7	T15	T30	T60	T90	T7	T15	T30	T60	T90	T7	T15	T30	T60	T90
pH	4,46± 0,005	4,43± 0,028	4,37± 0,025	4,31± 0,020	4,24± 0,030	4,50± 0,351	4,40± 0,020	4,35± 0,010	4,35± 0,011	4,22± 0,034	4,48± 0,010	4,39± 0,040	4,31± 0,036	4,37± 0,020	4,21± 0,030	4,48± 0,049
% variação		-0,67	-2,02	-3,36	-4,93	0,90	-1,34	-2,47	-2,46	-5,38	0,45	-1,57	-3,36	-2,01	-5,60	0,45
Viscosidade (mPa.S)	887± 3,05	891± 4,00	894± 4,04	896± 1,52	912± 2,08	943± 1,15	888± 1,15	907± 3,00	882± 3,06	873± 2,52	863± 4,04	853± 2,52	857± 5,51	838± 2,52	796± 3,60	735± 4,04
% variação		0,45	0,79	1,01	2,82	6,31	0,11	2,25	-0,56	-1,58	-2,70	-3,83	-3,38	-5,52	-10,25	-17,14
Densidade	1,0063 ± 0,0009	1,0036 ± 0,0007	1,0098 ± 0,0006	1,0141 ± 0,0006	1,0126 ± 0,0004	1,0086 ± 0,0006	1,0094 ± 0,0006	1,0099 ± 0,0006	1,0134 ± 0,0006	1,0062 ± 0,0008	1,0082 ± 0,0008	1,0103 ± 0,0006	1,0098 ± 0,0006	1,0154 ± 0,0008	1,0129 ± 0,0006	1,0130 ± 0,0004
% variação		-0,27	0,35	0,78	0,63	0,23	0,31	0,36	0,70	-0,01	0,19	0,40	0,35	0,9	0,66	0,66
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	M
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

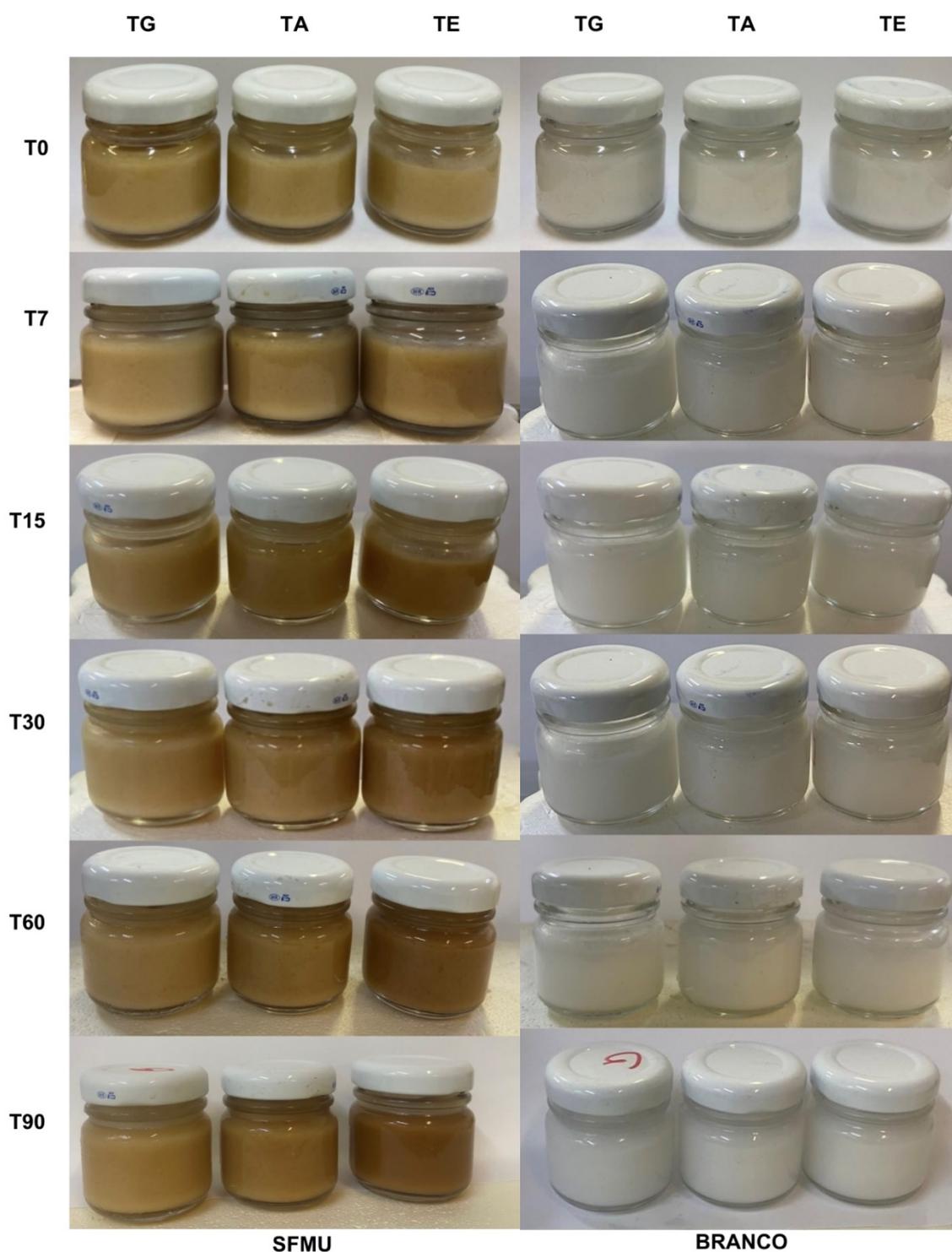
Legenda: N = normal, sem alteração; LM = levemente modificado; M = modificado. SFMU = Sérum Facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Os resultados (pH, densidade e viscosidade) foram expressos em média \pm Desvio Padrão (n = 3).

Tabela 15 - Valores de pH, viscosidade, densidade com suas respectivas % de variação em relação a T0, desvio padrão e aspectos organolépticos do Branco em T0, T7, T15, T30, T60 e T90.

		GELADEIRA					AMBIENTE					ESTUFA				
Tempo (dias)	T0	T7	T15	T30	T60	T90	T7	T15	T30	T60	T90	T7	T15	T30	T60	T90
pH	4,43± 0,016	4,51± 0,029	4,32± 0,046	4,43± 0,036	4,47± 0,042	4,50± 0,055	4,43± 0,030	4,30± 0,025	4,36± 0,052	4,24± 0,045	4,36± 0,020	4,41± 0,040	4,37± 0,030	4,35± 0,036	4,18± 0,053	4,34± 0,04
	% variação	1,80	-2,48	0,00	-0,90	1,58	0,00	-2,93	-1,58	-4,28	-1,58	-0,45	-1,35	-1,80	-5,64	-2,03
Viscosidade (mPa.S)	1371± 3,00	1396± 3,78	1445± 3,51	1366± 3,06	1373± 3,51	1397± 3,00	1358± 3,00	1339± 3,60	1302± 3,51	1234± 3,78	1148± 4,00	1333± 3,00	1250± 2,52	1192± 4,00	1118± 3,21	997± 3,00
	% variação	1,82	5,40	-0,36	0,14	1,89	0,52	-2,33	-5,03	-9,99	-16,26	-2,55	-8,82	-13,05	-18,45	-27,28
Densidade	0,998 3± 0,000 6	0,9932± 0,0006	1,0041± 0,0004	1,0045± 0,0005	1,0097± 0,0006	1,0080± 0,0006	0,9927 ± 0,0007	0,9960 ± 0,0007	1,0074 ± 0,0006	1,0069 ± 0,0008	1,0073 ± 0,0006	0,9967 ± 0,0006	0,9957 ± 0,0006	1,0042 ± 0,0007	1,0089 ± 0,0005	1,0043 ± 0,0004
	% variação	-0,51	0,58	0,62	1,14	0,97	-0,56	-0,23	0,91	0,86	0,90	-0,16	-0,26	0,59	1,06	0,6
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

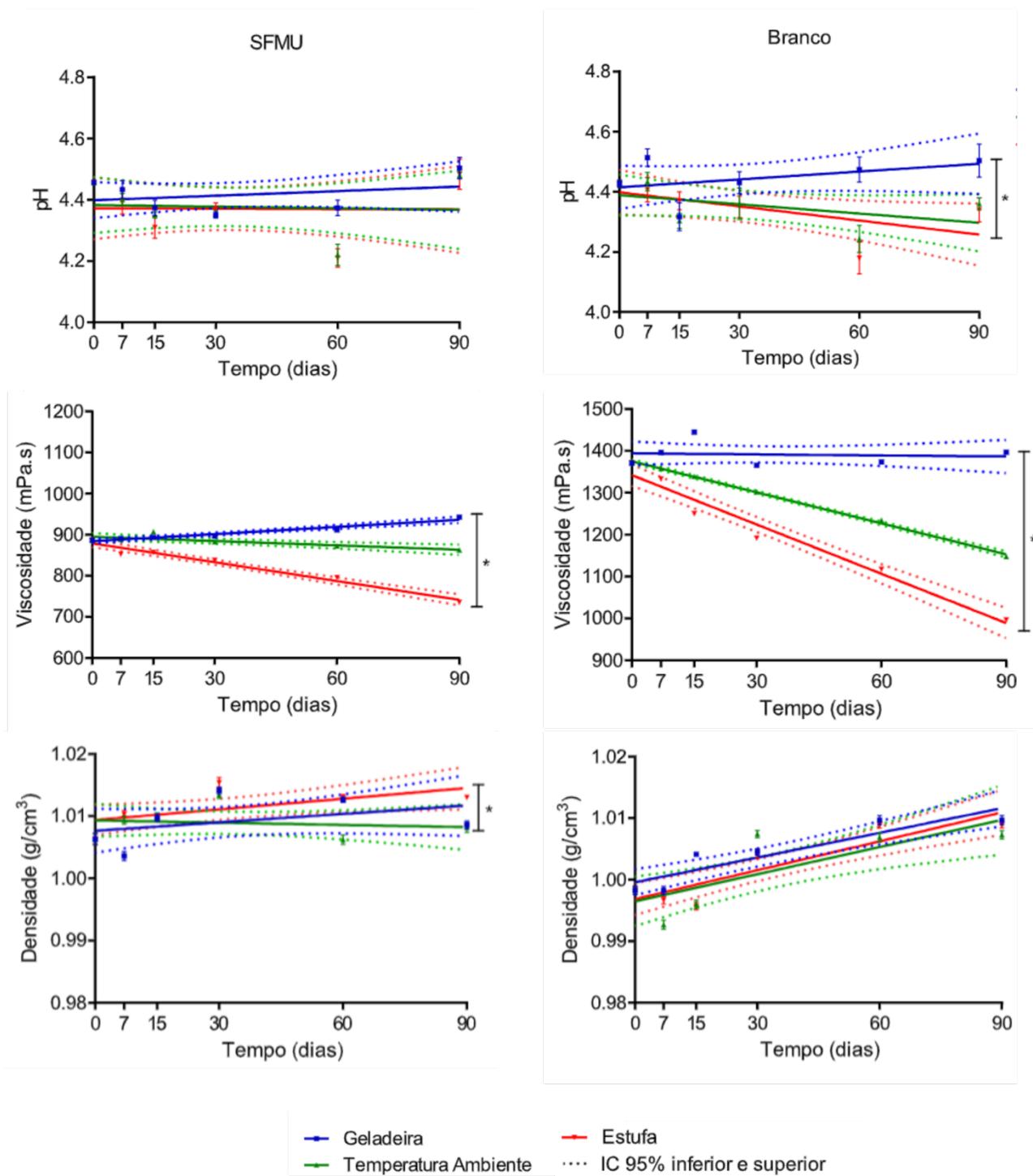
Legenda: N = normal, sem alteração; LM = levemente modificado; M = modificado. Os resultados (pH, densidade e viscosidade) foram expressos em média ± Desvio Padrão (n = 3).

Figura 21 - Cor do SFMU e Branco nos tempos T0, T7, T15, T30, T60 e T90.



Legenda: SFMU = Sérum Facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*; T0 = tempo após 24 horas de preparo; T7 = 7  dia; T15 = 15  dia; T30 = 30  dia; T60 = 60  dia; T90 = 90  dia; TG = temperatura de geladeira; TA = temperatura ambiente; TE = temperatura de estufa.

Figura 22 - Regressão linear do estudo de estabilidade do pH, viscosidade e densidade do SFMU e Branco.



Legenda: SFMU - Sérum Facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*

5.8.2.1 Análise química

Foi quantificado o ácido gálico no SFMU em todos os tempos (T0; T7; T15; T30 e T60) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os valores foram obtidos por interpolação da curva de calibração do ácido gálico (Figura 23). No T0 o teor de ácido gálico na amostra foi 13,20%, sendo os valores de geladeira (T7: 12,53%; T15: 12,02%; T30: 12,61%; T60: 11,40%), temperatura ambiente (T7: 13,20%; T15: 11,62%; T30: 11,83%; T60: 12,20%) e temperatura de estufa (T7: 12,34%; T15: 12,52%; T30: 13,96%; T60: 15,47%). A Figura 24 mostra resultados em regressão linear.

Figura 23 - Curva de calibração do ácido gálico obtida por CLAE.

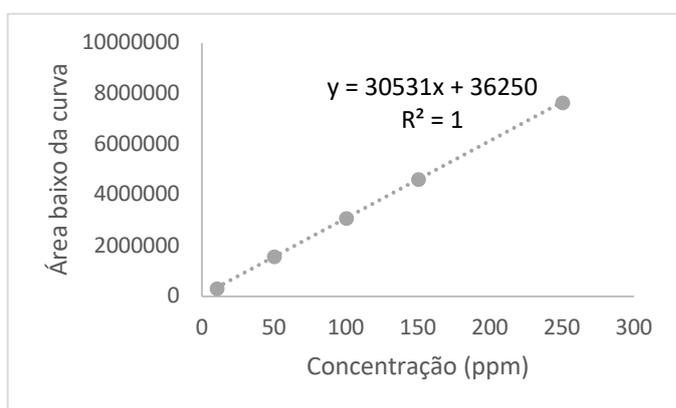
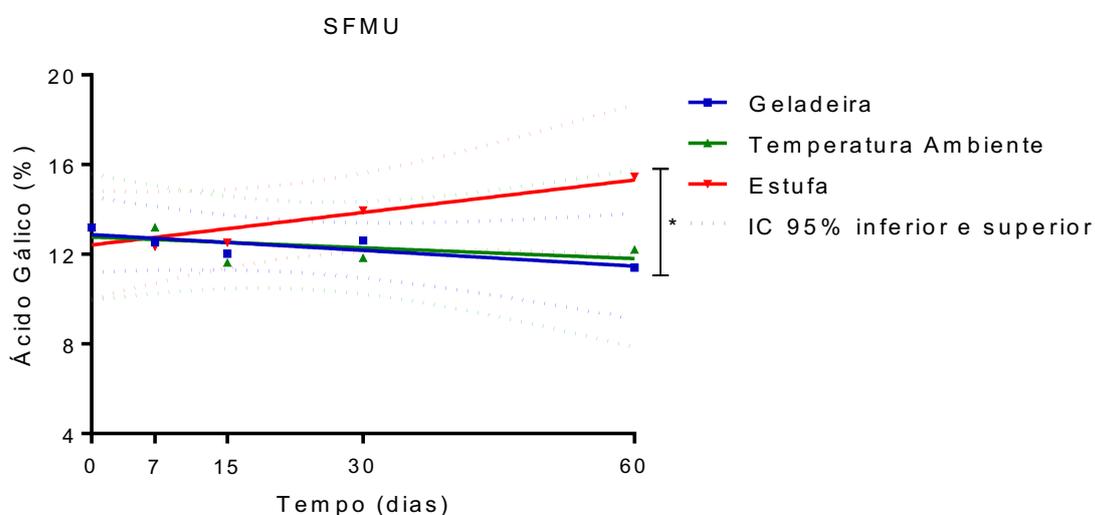


Figura 24- Regressão linear da concentração de ácido gálico.



6. DISCUSSÃO

A presente pesquisa avaliou a ação clareadora, antioxidante e fotoprotetora do extrato das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (EAFMU); foi feito também desenvolvimento e estudo de estabilidade acelerada do s erum facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (SFMU). Al em disso, determinou-se a segurança tanto do extrato como da formula a.

Uma das tendências do mercado e da Ciência Cosmética   o desenvolvimento de produtos com maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional a biodiversidade brasileira. Há um grande interesse mundial por ativos que apresentem estudos científicos comprovando eficácia, segura e comprometimento com o desenvolvimento sustentável (Violante et al., 2009).

Essa premissa de sustentabilidade foi cuidadosamente pensada durante o desenvolvimento deste estudo. Sabe-se que a aroeira-do-sertão esteve em risco de extin a, principalmente pelo seu uso de forma indevida e exploratória, uma vez que normalmente a entrecasca   a parte utilizada. No EAFMU   usado as folhas e, al em disso, utiliza água como solvente, então, pode-se dizer que a metodologia de produ a do extrato   ambientalmente correta.

Os compostos fenólicos ou polifenóis são produtos secundários do metabolismo vegetal que constituem um grupo grande e complexo. Caracterizam-se por possuir um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila. Essas moléculas são essenciais para o crescimento e reprodu a das plantas, e sua síntese   induzida sob condi es de estresse biótico e abiótico, como infec es, lesões, radia a UV, salinidade, estresse hídrico e calor (Denardin et al., 2015; Cherubim et al., 2019).

Os flavonoides são a classe mais importante e diversificada de polifenóis, mostram alta capacidade antioxidante e são bons inibidores da atividade da tirosinase e da produ a de melanina (Cherubim et al., 2019; Vieira et al. 2015). Dos vinte e quatro compostos isolados do EAFMU por Aquino et al. 2019 vinte são pertencentes   classe dos compostos fenólicos, e desses, oito são flavonoides. A concentra a desses compostos no EAFMU determinada neste estudo   25,44 ERU/g.

O EAFMU mostrou um alto teor de compostos fenólicos (568,82 mg EAG/g). Queiroz, Morais e Nascimento (2002) obtiveram teores de composto fenólicos em

extratos da casca de *M. urundeuva* de 19,1 % para extração com acetona-água e 20,2% para extração com metanol-água. Em outro estudo Silva et al. (2022) obtiveram e 387,49 mg EAG/g no extrato etanólico também da casca. Já Vieira et al. (2015) realizaram análise de compostos fenólicos do extrato das folhas e casca do caule de *Myracrodruon urundeuva*, encontrando no extrato hexânico 77 mg GAE/g e 45 mg GAE/g respectivamente, e no extrato metanólico 194 mg GAE/g e 193 mg GAE/g.

A eficiência de extração de polifenóis de materiais vegetais é influenciada por múltiplos parâmetros. A polaridade do solvente desempenha papel fundamental no aumento da solubilidade fenólica (Hasbal, Yilmaz-Ozde e Can, 2015). Comparando aos demais estudos apresentados, o presente trabalho demonstra que a água é um excelente solvente, assim como a decocção é um método muito eficiente para a extração de compostos fenólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, além disso, as folhas possuem alta concentração destes constituintes.

Quando comparado a outras espécies da família Anacardiaceae, o EAFMU apresenta uma concentração maior de compostos fenólicos. Neves et al. (2021) obtiveram concentrações de 452,53; 227,47; 297,46 e 493,44 mg GAE/g nos extratos etanólicos de *Anacardium occidentale*, *Schinopsis brasiliensis*, *Spondias mombin* e *Mangifera indica*, respectivamente.

A melanogênese é um processo complexo de produção de melanina nos melanócitos que envolve várias reações enzimáticas que convertem tirosina em melanina. Sendo a tirosinase chave na produção desse pigmento, catalisando duas reações distintas: primeiro, a hidroxilação de L-tirosina a L-dopa (atividade monofenolase), seguida por sua posterior oxidação a dopaquinona (difenolase). Dessa forma, os níveis de tirosinase estão intimamente associados ao grau de pigmentação da pele, assim, a inibição dessa enzima é uma forma eficaz de obter redução da melanogênese para tratamento de hiperpigmentações (Chiocchio et al. 2018; Gao et al. 2021; Gonchoroski; Côrrea, 2005).

A tirosina, substrato da reação de biossíntese da melanina, é um composto fenólico e muitos outros compostos fenólicos podem se comportar como um potencial inibidor da enzima tirosinase. Eles são capazes de mimetizar estruturalmente a tirosina, competindo pela ligação ao centro ativo da tirosinase, além disso, podem agir também

através de mecanismo de quelação dos íons cobre (Ramli e Ruangrunsi, 2021; Sahin, 2018; Panzella e Napolitano, 2019).

O EAFMU a partir da concentração 250 µg/mL apresentou atividade inibidora da enzima tirosinase, sendo que na concentração máxima testada, 2.000 µg/mL, essa inibição chegou a 83,76%, já o padrão ácido kójico na mesma concentração inibiu 97,81%. Na concentração de 1.000 µg/mL do EAFMU houve inibição de 67,71%. De acordo com a Tabela 10, pode-se notar que na segunda leitura, no tempo de 60 minutos, não houve decaimento da inibição, então, podendo inferir que não ocorreu perda da ação de inibição da tirosinase, o mesmo aconteceu em todas as concentrações do ácido kójico.

Estudo realizado por Viera et al. (2015), através de metodologia *in vitro* de inibição da enzima tirosinase, comprovou que o extrato metanólico das folhas de aroeira-do-sertão (1.000 µg/mL) inibiu 66% da enzima, resultado semelhante ao obtido neste estudo. Já o extrato metanólico da casca do caule na mesma concentração inibiu 42%. Neste mesmo estudo foi visto que não houve inibição da enzima com os extratos hexânicos, o que mostra que a polaridade do solvente é um fator determinante para extração dos compostos que possuem essa ação.

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), um dos componentes majoritários do EAFMU, é um composto fenólico natural, polar, encontrado em muitas frutas e plantas medicinais e apresenta conhecidas ações biológicas. Estudos anteriores mostram sua ação clareadora e seu potencial para uso em cosmético com essa finalidade, agindo através da inibição da tirosinase, e também, por outras vias, inclusive via MITF e MCR-1 (Peng et al. 2022; Kim, 2006; Kumar et al. 2013). Hawary et al. (2020) avaliaram a ação inibidora da tirosinase do extrato de *Macadamia integrifolia* e de seis compostos isolados desse extrato, dentre eles o ácido gálico. Na concentração de 1.000 µg/mL o ácido gálico inibiu 83,65% da atividade da enzima.

Chiocchio et al. (2018) avaliaram a inibição da tirosinase e da elastase de cem extratos vegetais e determinaram que houve uma correlação linear entre a concentração de compostos fenólicos e flavonoides com a atividade inibitórias das enzimas, inferindo então, que classes específicas de polifenóis podem agir através de mecanismo de competição.

Muitas substâncias têm sido relatadas como inibidores da tirosinase devido à sua função de quelação de íons metálicos, podendo agir como quelantes dos íons cobre presentes no centro ativo da enzima. No ensaio de quelação de cobre, o deslocamento batocrômico é indicativo de formação de complexo com o composto testado e do metal (Kim et al. 2023; Da Silva et al. 2017). A Figura 12 mostra o deslocamento de 10 nm (300 nm → 310 nm) provocado pelo EAFMU, já o padrão ácido kójico provocou um deslocamento de 20 nm (295 nm → 315 nm).

Kim et al (2006) avaliaram a atividade quelante de cobre de vários flavonoides através de espectroscopia de fluorescência. Foi observado que a atividade inibitória está correlacionada à posição da hidroxila, o grupo catecol parece se ligar ao cobre no centro catalítico. Além disso, a análise de *docking* molecular também revelou a hipótese que o sítio catalítico di-cobre da tirosinase ser o local de ligação preferencial para flavonoides. Aquino et al. (2019) isolaram oito flavonoides do extrato das folhas de *M. urundeuva*, desses compostos, cinco, incluindo a quercetina, apresentam grupo catecol, o que pode justificar total ou em parte a atividade quelante de cobre demonstrada por EAFMU.

Quercetina e pirogalol compostos também presentes em EAFMU já tiveram sua ação inibidora da tirosinase comprovada. Jakimiuk et al. (2022) avaliaram 44 flavonoides, e a quercetina foi a que apresentou maior atividade, inclusive maior que o padrão ácido kójico. Kubo et al. (2000) detectaram que o composto provoca um deslocamento batocrômico de 62 nm (368 → 430 nm). Outro estudo por *docking* molecular revelou que a quercetina se liga ao sítio ativo da tirosinase quelando os íons cobre através dos seus grupos 3', 4'-di-hidroxi (Chen e Kubo, 2002; Fan et al. 2017).

Os resultados mostram que o EAFMU também age através da quelação de cobre e, por ser rico em compostos fenólicos, que podem agir como análogos da tirosina, possivelmente o extrato age também através do mecanismo de competição.

A pele humana está constantemente exposta à radiação UV e a diversos poluentes ambientais que são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), oxigênio singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esses EROs na pele que podem ativar a tirosinase, induzindo a melanogênese. Além disso, os EROs causam danos ao DNA, com isso, podem induzir

proliferação de melanócitos e aumento da sua atividade (Arguelles e Sapin, 2020; Seckin et al. 2014),

O desequilíbrio entre a produção desses radicais livres e mecanismo de defesa antioxidante pode causar dano tecidual. Esses radicais livres podem ser suprimidos pelo uso de antioxidantes naturais por via tópica e, também, advindos da alimentação (Seckin et al. 2014; Cherubim et al., 2019)

O potencial do EAFMU para eliminar radicais livres foi avaliado através do TBARS, DPPH, e eliminação do radical hidroxil. Em todos os ensaios, o extrato apresentou alta atividade antioxidante. Na avaliação pelo método DPPH, na concentração de 100 µg/mL, apresentou atividade estatisticamente igual ao padrão vitamina C na concentração de 50 µg/mL.

Os resultados obtidos com o ensaio TBARS mostram que o EAFMU age diminuindo a peroxidação lipídica, como consequência, reduz os danos à membrana celular, diminuindo, assim, o estresse oxidativo. O EAFMU, em todas as concentrações testadas foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica, reduzindo a quantidade de TBARS formado. Resultado semelhante foi obtido com o padrão trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E), que assim como o extrato testado, inibiu, na concentração 200 µg/mL, mais de 60%. Semelhante aos nossos resultados, estudos anteriores revelaram o potencial antioxidante de espécies de Anacardiaceae (De Almeida et al., 2017; Santos et al., 2018; Neves et al., 2021).

O uso de antioxidantes por via tópica e oral apresenta-se promissor no tratamento de hiperpigmentação, uma vez que o aumento de radicais livres pode levar ao aumento da melanogênese (Seckin et al. 2014; Babbush; Babbush; Khachemoune, 2021;). Seckin et al. (2014) identificaram que pacientes com melasma têm maior estresse oxidativo em comparação com o grupo controle. Choubey et al. (2014) também constataram que nos pacientes com melasma têm aumento dos marcadores oxidativos, foi encontrada uma correlação proporcional entre o MDA, marcador de peroxidação lipídica, e a severidade do melasma avaliado pela escala MASI (*Melasma Area and Severity Index*). Ressalta-se, pelos dados já apresentados, que o EAFMU tem alta capacidade de inibir a peroxidação lipídica, resultado que também corrobora sua ação clareadora.

Geralmente, a atividade antioxidante correlaciona-se com o conteúdo de compostos fenólicos (Zulich et al. 2015), assim a atividade antioxidante demonstrada por EAFMU certamente deve-se a alta concentração de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides e o ácido gálico.

Outra função importante para os produtos de uso tópico é a fotoproteção. Sabe-se que a radiação UV é responsável por uma série de reações fotoquímicas e fotobiológicas importantes capazes de causar danos à pele de proporções variadas, dependendo de vários fatores como: duração da exposição, intensidade de incidência dos raios solares, características do indivíduo (idade, fototipo da pele), fatores imunológicos, dentre outros. O aumento da produção de EROs pode induzir lesões na pele, hiperpigmentação, envelhecimento e estresse oxidativo (Addor et al. 2021; Chatatikun et al. 2015).

Algumas substâncias têm a capacidade de absorver a radiação ultravioleta nas regiões UVA (320 nm a 400 nm) e/ou UVB (290 nm a 320 nm), com isso, podem ser incorporadas em produtos fotoprotetores. Extratos vegetais podem atuar sinergicamente com os filtros químicos e físicos para aumentar o FPS, agindo também como antioxidantes, anti-inflamatórios, inibidores da tirosinase e redutores da degradação de colágeno. Com isso, agem de forma multifuncional minimizando os efeitos da radiação solar (Catelan et al. 2021; Oliveira et al., 2021).

De acordo com a metodologia de Mansur et al. (1986), o FPS apresentado pelo EAFMU foi 14,43, mostrando que o extrato tem potencial atividade fotoprotetora na região UVB. Apesar de ser um teste *in vitro*, já foi demonstrado que esta metodologia apresenta uma boa correlação com os testes *in vivo*, isso porque relaciona a absorbância da amostra com o efeito eritematígeno da radiação e a intensidade da luz em comprimentos de ondas UVB.

Foi também realizada uma varredura para avaliar a absorbância nos comprimentos de onda 280 nm – 400 nm (Figura 16). Como já mostrado pelo resultado de FPS, o extrato absorveu bem no comprimento UVB, no entanto, não obteve o mesmo desempenho na faixa UVA. Já a benzofenona-3, substância usada no controle positivo, apresentou FPS 20,39, além disso, absorveu na faixa de 320 nm – 400 nm, mostrando bom desempenho na proteção à UVA. No entanto, ressalta-se que essa substância é

amplamente conhecida por seus possíveis danos nocivos ao ecossistema aquático e à saúde humana. Estudos mostram a presença dessa benzofenona-3 no leite humano, urina e plasma sanguíneo, indicando absorção sistêmica (Addor et al. 2021; Wnuk et al. 2022).

Os compostos fenólicos podem absorver a radiação ultravioleta devido à presença de cromóforos em sua estrutura. Assim, evitam que a radiação solar penetre na pele e protege o DNA dos queratinócitos contra danos induzidos por UV. Esse fato aumenta a proteção solar do produto e neutraliza os efeitos nocivos do estresse oxidativo após a exposição solar (Cherubim et al., 2019; Chatatikun et al. 2015).

Rodrigues et al. (2021) avaliaram o FPS pelo método de Mansur, também na concentração de 0,2 mg/mL, do extrato da casca do caule de *Spondias purpúrea*, espécie pertencente à família Anacardiaceae e obtiveram 14,37, resultado semelhante ao encontrado na presente pesquisa.

Para avaliar a segurança, a viabilidade celular induzida pela EAFMU foi avaliada pelo método da SRB usando células de fibroblastos murinos L929, método que também avalia a proliferação celular, através da quantificação de proteínas por se ligar aos aminoácidos de células viáveis. SRB é considerado mais sensível, reprodutível e linear do que o de MTT, que pode ter interferência de drogas antioxidantes que induzem o metabolismo mitocondrial, revelando um resultado falso positivo em relação à proliferação (Van Tonder; Joubert; Cromarty, 2015).

Nas primeiras 24 horas, EAFMU não foi citotóxico em nenhuma das concentrações, sendo capaz de aumentar significativamente a proliferação celular nas concentrações de 0,8 e 0,4 µg/mL em relação ao grupo DMEM. Após 48 horas, somente as concentrações de 25 e 12,5 µg/mL reduziram a proliferação celular. Já em 72 h, apenas a maior concentração foi citotóxica quando comparada ao grupo DMEM. Os resultados obtidos mostraram que EAFMU não foi citotóxico. Extratos de plantas com efeitos citotóxicos potentes são evidenciados após um curto tempo de incubação (Taylor et al. 2012), o que não aconteceu com EAFMU.

Diante o exposto, o EAFMU reduz a melatonênese via inibição da enzima tirosinase; reduz também a formação EROs uma vez que age como um fotoprotetor e pela sua potente ação antioxidante. Em estudo anterior, Aquino et al. (2019) demonstraram

também a atividade anti-inflamatória através da modulação da resposta pró-inflamatória de neutrófilos humano. Assim, mostra-se apto para ser testado em uma formulação tópica, visto que condiz com um produto multifuncional para tratamento do melasma.

O desenvolvimento de cosméticos é desafiador, esses produtos são compostos por vários ingredientes de diferentes propriedades físico-químicas e, se não houver compatibilidade entre eles, o resultado final será uma formulação instável e ineficaz (Costa, 2012; Campos e Mercúrio, 2014).

A escolha da forma cosmética é um ponto extremamente relevante no desenvolvimento da formulação, deve estar condizente com o objetivo, funcionalidade, percepção sensorial, estabilidade, segurança e eficácia desejados ao produto. A forma escolhida nesta pesquisa foi um sérum, que no geral, é um cosmético que pode apresentar consistência levemente viscosa ou líquida (solução), dependendo do uso ou não de um agente espessante. O sérum facial apresenta como vantagens: boa espalhabilidade e boa fluidez (Campos e Mercúrio, 2014; Ojha et al. ,2019; Gomes et al. 2023).

Inicialmente no desenvolvimento do sérum facial com extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (SFMU) foi avaliada a compatibilidade com agentes de viscosidade: Aristoflex® AVL; Carbopol® 940; Natrosol® e goma xantana. Visualmente, todos apresentaram compatibilidade, mas por aspectos sensoriais, optou-se pela goma xantana e pelo Aristoflex® AVL que é uma dispersão em óleo de um polímero pré-neutralizado, estabilizada com uma equilibrada mistura de emulsionantes, importante para incorporação do óleo de rosa mosqueta ao sistema (Pharmaspecial [s.d.]).

Um ponto crítico no desenvolvimento de uma formulação é o pH de estabilidade ideal para a eficácia do ativo, isso determinará o pH final da formulação e, como consequência, será determinante na escolha dos ingredientes do veículo (Costa, 2012). Para realizar uma análise preliminar do pH da formulação foi feita análise visual de cor do SFMU na faixa pH 4,0 a 9,5, com intervalos de 0,5, sendo observada mudança instantânea partir do pH 5,0. O pH do EAFMU é 3,80, logo, apresenta maior estabilidade em pH ácido, desta forma, optou-se trabalhar com pH 4,5, valor também compatível com o pH normal da epiderme que é em torno de 4,5 a 6,0 (Costa, 2012).

A formulação desenvolvida foi composta por: ativo (EAFMU); agentes de viscosidade (Aristoflex AVL e goma xantana); emoliente (óleo de rosa mosqueta); umectante (glicerina); quelante (EDTA); conservante (fenoxietanol e etilexilglicerina); antioxidante (BHT); alcalinizante (trietanolamina) e veículo (água deionizada).

Após o desenvolvimento da fórmula foram avaliadas as características físico-química e organoléptica. Os ensaios realizados foram os sugeridos pelo Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da Anvisa, seguindo a categoria de produtos “Creme, loção, gel ou u óleo para o rosto/ corpo/ cabelos/mãos/pés”, sendo preconizados os parâmetros: aspecto, cor, odor, pH, densidade e viscosidade. Nos quais foram devidamente abordados no estudo de estabilidade.

De acordo com o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da Anvisa, a maioria das informações necessárias na avaliação do risco potencial de um produto cosmético resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem sua fórmula. São eles que podem, diretamente, ser os responsáveis por qualquer efeito local e sistêmico. Contudo, a fórmula do produto acabado também pode interferir, à medida que facilita a absorção total ou parcial dos ingredientes. Além disso, as possíveis interações, resultantes da associação entre os ingredientes, podem influenciar no risco potencial de um produto (Brasil, 2012).

Todos os componentes do SFMU, como exceção de EAFMU, já são amplamente usados em produtos cosméticos, sendo considerados ingredientes seguros. Já o EAFMU teve sua segurança avaliada pelo ensaio de citotoxicidade, demonstrando-se também seguro. Diante o exposto, faz-se necessária a análise de segurança da formulação.

Foi realizada, pelo Instituto de Pesquisa Clínica Integrada Ltda, a avaliação dermatológica da irritabilidade dérmica primária, acumulada e sensibilização. O laboratório pertence à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas), sendo habilitado pela Anvisa a realizar ensaios de segurança.

A avaliação dermatológica da irritabilidade dérmica primária, acumulada e sensibilização foi por *patch test*. A irritabilidade dérmica é o processo inflamatório que ocorre na área de contato com o produto, podendo ocorrer após a primeira aplicação (irritação primária) ou com a continuidade do uso (irritação acumulada), é determinada por um dano tecidual agudo ou crônico de intensidade variada. Já a sensibilização

cutânea é uma reação inflamatória na pele induzida por uma resposta imunológica mediada por células T a alérgenos, como as substâncias químicas sensibilizantes da pele, que causa a dermatite alérgica de contato em indivíduos suscetíveis, pode decorrer tanto em função dos ingredientes isolados, quanto da interação entre eles, formando novo componente (Brasil, 2012; Gilmour et al., 2019)

No estudo realizado, não foram detectadas reações adversas nas áreas de aplicação do produto e do controle durante o período de estudo. Nenhum participante referiu sensação de desconforto ao produto ou ao controle durante o estudo. Portanto, de acordo com o ensaio realizado, o SFMU é considerado um produto seguro para uso tópico.

Por fim, foi analisado, de acordo com o Guia de Estabilidade de Cosméticos da Anvisa a estabilidade do SFMU. O limite de aceitação e os parâmetros a serem avaliados nos produtos submetidos a testes de estabilidade devem ser definidos pelo formulador e dependem das características do produto em estudo e dos componentes utilizados na formulação (Brasil, 2004).

Os estudos de estabilidade têm a finalidade de prever o comportamento do produto em todo o sistema logístico, incluindo manuseio, transporte. As condições, sobretudo de altas temperaturas a que os produtos podem ser submetidos durante o transporte podem afetar a estabilidade das formulações, ocorrendo em alguns casos separação de fases (emulsões), diminuição da viscosidade ou compactação de suspensões, entre outras (Brasil, 2004)

Inicialmente foi feito o teste de centrifugação, um método físico que avalia possíveis alterações que podem ocorrer com o produto, pois as condições criadas simulam um estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis mudanças na estabilidade. Essas mudanças podem ser observadas na forma de precipitados, ocorrência de separação de fases, formação de sedimentos compactos (*caking*) e coalescência (Daneluz et al. 2020; Brasil, 2004). Tanto o SFMU quanto o Branco mantiveram-se estáveis como mostrado na Figura 20.

Após aprovação pelo teste de centrifugação, o estudo seguiu, como preconizado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, para estabilidade acelerada. Foram

realizadas avaliações físico-químicas (pH, viscosidade e densidade); organoléptica (aspecto, cor e odor); e química (quantificação de ácido gálico) nos tempos: 24 horas após o preparo (T0), 7° (T7), 15° (T15), 30° (T30), 60° (T60) e 90° dias (T90), sendo a análise química até o T60. As amostras foram submetidas a temperatura baixa/geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C); temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura elevada/estufa ($5,0 \pm 2,0$ °C).

As análises organolépticas revelaram durante todo o estudo que, tanto o SFMU quanto o Branco, mantiveram aspecto e odor constantes. Em relação à cor, as amostras do Branco e do SFMU geladeira e temperatura ambiente mantiveram-se estáveis; já o SFMU estufa sofreu leves modificações (Tabela 14). O Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos estabelece que pequenas alterações de cor são aceitáveis em temperaturas elevadas.

Em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados, observou-se estabilidade da fórmula. O pH do SFMU iniciou em 4,46 e manteve-se estável, apresentando uma maior oscilação no T60 (estufa), chegando a uma redução de 5,60% em relação ao T0, entretanto, no tempo final (T90 - estufa) essa variação foi menor que 0,5%. Um comportamento semelhante foi observado no Branco. Alterações no pH podem ser indicativos de degradação de componentes da fórmula e isso pode alterar toda a formulação desde o aspecto até a eficácia do ativo utilizado (Isaac et al. 2008; Da Silva et al. 2019).

Em relação à densidade, no SFMU e no Branco não houve variação significativa em relação ao T0, sendo o máximo uma variação de 0,78% e 1,14%, respectivamente. Dentre os parâmetros físico-químicos, a viscosidade foi a que mais variou, a maior variação detectada na temperatura de geladeira foi no T60, havendo um aumento de 6,31%; na temperatura ambiente a máxima variação foi uma redução de 2,70% no T90; já na temperatura de estufa houve uma redução máxima de 17,14%. As variações sofridas no Branco foram mais intensas, chegando a haver uma redução de 27,28% na temperatura de estufa do T90. Com isso, pode-se perceber que a adição do EAFMU foi benéfica à manutenção da propriedade reológica do sistema.

Pôde ser observado também que na temperatura de geladeira, tanto no SFMU quanto no Branco (exceto T30), houve tendência positiva indicando o aumento da

viscosidade, já na temperatura de estufa houve uma tendência negativa indicando a diminuição da viscosidade, como pode ser visto no gráfico de regressão linear (Figura 22). A viscosidade é ligada à força de atração entre moléculas, ou seja, se a formulação se encontra em temperatura mais alta, as moléculas estão mais afastadas e isso conseqüentemente irá diminuir a viscosidade. Por outro lado, quando a temperatura é baixa, as moléculas tendem a ter mais atração, aumentando a viscosidade (Da Silva et al. 2019). Como forma de garantir a estabilidade, será recomendado o armazenamento do SFMU na geladeira após aberto.

O Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos não estabelece um limite de aceitação para o teor, já para medicamentos a RDC nº 318/2019 preconiza que não deve ter um decaimento maior que 10%. As amostras de geladeira e de temperatura ambiente tiveram no T60 um decaimento de 13,63% e 7,58%, respectivamente em relação ao T0, fato que pode ser aceito pois trata-se de um produto cosmético com menor rigorosidade em relação a teor. Já amostra de estufa teve um aumento do teor de ácido gálico, o que pode ser justificado pela evaporação de água e conseqüente concentração do EAFMU na amostra; também pode ter havido formação de ácido gálico como produto de degradação dos seus derivados. Dentre os compostos isolados por Aquino et al. (2019) estão derivados do ácido gálico: galato de metila, ácido meta-digálico, ácido para-digálico, meta digalato de metila e para digalato de metila.

Dentre os estudos de eficácia *in vitro*, a máxima concentração testada foi 2.000 µg/mL, equivalente a 0,2% (p/v). Já na formulação a concentração do extrato está cinco vezes maior do que essa máxima concentração testada, o que garante, mesmo com decaimento do teor, eficácia do produto.

Neste estudo, os dados obtidos em conjunto indicam eficácia do EAFMU como clareador, antioxidante, fotoprotetor e sendo também um ativo seguro. A sua aplicação em uma formulação cosmética foi promissora perante os ensaios realizados. Faz-se necessária avaliação através de ensaio clínico de eficácia para a fórmula ficar disponível para comercialização.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dessa pesquisa permitiram concluir que:

- EAFMU apresenta uma rica composição fitoquímica, tendo altas concentrações de compostos fenólicos e flavonoides;
- EAFMU apresenta alta atividade inibidora da tirosinase e pela sua alta concentração de compostos fenólicos provavelmente age através da competição com a tirosina;
- EAFMU age também através da quelação dos íons cobre presentes na enzima tirosinase;
- EAFMU apresentou excelente atividade antioxidante (nos três ensaios realizados), fotoprotetora e demonstrou ser seguro através de ensaio de citotoxicidade;
- Foi desenvolvido o SFMU atendendo aos parâmetros organolépticos e físico-químicos exigidos para uma formulação tópica;
- A análise feita por *patch test* demonstrou que SFMU não induziu irritabilidade nem sensibilização;
- O estudo de estabilidade realizado demonstrou que, para os parâmetros de cosmético, apresenta estabilidade satisfatória;
- Foi depositada patente junto ao Instituto de Propriedade Industrial - INPI. Número do Processo: BR 10 2022 011452 8. Título: “USO DO EXTRATO DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS OU FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE CLAREADORA” (Anexo 2).
- A formulação está apta para a realização do ensaio clínico de eficácia.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os ensaios realizados, o EAFMU possui excelente ação clareadora, antioxidante e fotoprotetora. Desta forma, esse extrato pode ser uma excelente opção para tratamento do melasma, visto que essa condição da pele é de origem multifatorial, sendo importante o tratamento ir além do mecanismo clareador principal, este deve também proteger a pele dos raios ultravioletas e combater os radicais livres.

O sérum cosmético desenvolvido com 1% do EAFMU apresentou-se seguro e estável dentro dos parâmetros físico-químicos e organolépticos durante todo o estudo de estabilidade acelerada.

Dessa forma, a aroeira-do-sertão, planta tão utilizada para diversas finalidades, sobretudo no sertão nordestino, mostrou ter o potencial clareador. Faz-se necessária avaliação através de ensaio clínico de eficácia para a fórmula ficar disponível para comercialização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Panorama do Setor Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. 2023. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/>. Acesso em 02 de agosto de 2023.
- ADDOR, F. A. S. et al. Sunscreen lotions in the dermatological prescription: review of concepts and controversies. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, p. 204–222, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.05.012>
- AHN, M et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p.1383-1392, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.045>
- AQUINO, N. C. Aspectos químicos, do estudo químico-farmacológico- agrônômico de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* fr. all), silvestres e cultivadas. 2017. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceara.
- AQUINO, N. C. et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Decoction from Leaves of a Cultivated Specimen of *Myracrodruon urundeuva*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, n. 8, p. 1616–1623. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190060>
- ARGUELLES, E. D. L. R e SAPIN, A. B. (2020). Bioprospecting of *Turbinaria ornata* (*Fucales, phaeophyceae*) for cosmetic application: Antioxidant, tyrosinase inhibition and antibacterial activities. **Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Science**, v. 26, n. 2, p. 30-41, 2020.
- AUSTIN, E.; NGUYEN, J. K.; JAGDEO, J. Topical Treatments for Melasma: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 18, p. 1157 – 1171, 2019.
- BABBUSH, K. M.; BABBUSH, R. A.; KHACHEMOUNE, A. Treatment of melasma: a review of less commonly used antioxidants. **International Journal of Dermatology**, v. 60, p. 166–173, 2021. <https://doi.org/10.1111/ijd.15133>
- BANDEIRA, M. A. M. Myraerodruon urundeuva Allemao (arocira-do-sertão): Constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta. 2002. 322f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,2002.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 257–262, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>

BERARDESCA, E. et al. Effectiveness of a new cosmetic treatment for melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 7, p. 1684–1690, .2019.
<https://doi.org/10.1111/jocd.13203>

BIANCO, T. C., Use of oral tranexamic acid in the treatment of melasma. **BWS Journal**, v. 4, p. 1-12, 2021.

BRAGA, R. Plantas do nordeste especialmente do Ceará. 5th ed. Ceará. 2001.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022. DOU nº 108, Seção 1, 08 de junho de 2022.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 443, de 17 de dezembro de 2014. DOU Nº 245 Seção 1, 18 de dezembro de 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 529, de 4 de agosto de 2021. Dispõe sobre a lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL nº 62/14, alterada pela Resolução GMC MERCOSUL nº 37/20. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br, Acesso em 120 de julho de 2023.

BRASIL. Resolução RDC nº 752, de 19 de setembro de 2022. Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.. Disponível em: www.anvisa.gov.br, Acesso em 120 de julho de 2023.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 6a ed. Brasília, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2. ed. 120 p. Brasília, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2. ed. Brasília, 2012.

CAMPOS, P. M. B. G. M. e MERCÚRIO, D. G. (2012). Formas cosméticas. **Cosméticos&Toiletries**, v. 25, 2014.

CARVALHO, P. E. R. Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa informação tecnológica. Colombo, PR. **Embrapa Florestas**, 2003.

CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the *in vitro* photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.197, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.04.009>

CÉSAR, F. C. S. et al. Pilot-study of photodamaged skin and melasma using reflectance confocal microscopy. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 10, n.2, p. 127–131, 2018. <https://doi.org/10.5935/scd1984-8773.20181021145>

CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 2440–2475, 2009. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>

CHATATIKUN, M., et al. Antioxidant and tyrosinase inhibitory properties of an aqueous extract of *Garcinia atroviridis* Griff. ex. T. Anderson fruit pericarps. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 1, p. 71–78, 2020. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.12>

CHEN, Q. e KUBO, I. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4108–4112, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf011378z>

CHERUBIM D. J. L. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 9:p. 33–37, 2019

CHIOCCHIO, I. et al. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 498–505, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.029>

CHOUBEY, V. et al. Role of oxidative stress in melasma: a prospective study on serum and blood markers of oxidative stress in melasma patients. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 9, p. 939–943, 2017. <https://doi.org/10.1111/ijd.13695>

COSTA, A. et al. Associação de emblica, licorice e belides como alternativa à hidroquinona no tratamento clínico do melasma. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 613-620, 2010.

COSTA, A. Tratado internacional de cosmecêuticos. 1. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2012.

COSTA, D. A. et al. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 567–575, 2012

DANELUZ, J. et al. The influence of different concentrations of a natural clay material as active principle in cosmetic formulations. **Materials Research**, v.23, n. 2, 2020. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2019-0572>

DA SILVA, A. P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175598>

DA SILVA, T. F. et al. Desenvolvimento e estudo de estabilidade físico-química de formulações cosméticas antienvhecimento. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 107–113, 2019. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2019.36.107-113>

DE ALMEIDA, C. L. F. et al. Spondias purpurea L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6593073>

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n.3, p.387–398, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.006>

D'MELLO, S. A. N. et al. Signaling pathways in melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>

D'ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12222–12248, 2013. . <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>

DUTEIL L. et al. Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with UVB exposure. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 5, p. 822-826, 2014. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12273>

EL HAWARY, S. S. et al. Phytochemical constituents and anti-tyrosinase activity of *Macadamia integrifolia* leaves extract. **Natural Product Research**, v. 36, n. 4, p. 1089–1094, 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1849203>

FERREIRA, M. J. G. et al. Antimicrobial activity of the aqueous extract and fractions from the leaf of the aroeira-do-sertão. **Scientia Plena**, v. 17, n. 5, 2021. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.057201>

GALVÃO, A. W. R. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - A conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.024>

GAO, D. et al. Evaluation of Anti-Melanogenesis Activity of Enriched Pueraria lobata Stem Extracts and Characterization of Its Phytochemical Components Using HPLC-PDA-ESI-MS/MS. **Molecular Sciences**, v.22, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms>

GILMOUR, N. et al. Skin sensitization: Uncertainties, challenges, and opportunities for improved risk assessment. **Contact dermatitis**, v. 80, n. 3, p. 195-200, 2019. <https://doi.org/10.1111/cod.1316>

GONCHOROSKI, D.D.; CÔRREA, G.M. Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Infarma**, v.17, n. 3/4, p. 84-88, 2005. 2005.

HASBAL, G.; YILMAZ-OZDEN, T e CAN, A. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz (wild service tree) fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n.1, p.57–62, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.06.006>

HAYDONT, V.; BERNARD, B. A.; FORTUNEL, N. O. (2019). Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 177, p. 150–156, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.03.006>

HANDEL, A. C., MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A. Melasma: A clinical and epidemiological review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 771–782, 2014. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20143063>

HEXSEL, D., et al.. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: A multicenter study. **International Journal of Dermatology**, v. 53, n. 4, p. 440–444, 2014. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05748.x>

HOQUE, F.; MCGRATH, J.; SHAUDE, S. E. Melasma (Chloasma): Pathogenesis and Treatment. **Journal of Biotechnology and Biomedicine**, v. 05, n.04, p. 236-243, 2022. <https://doi.org/10.26502/jbb.2642-91280064>

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377–387, 2007

IKINO, J. K. et al. Melasma and assessment of the quality of life in Brazilian women. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n.2, p 196–200, 2015. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20152771>

ISAAC, V. L. B. et al(2008). Estabilidade físico-química de fitocosméticos Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências. Farmacêuticas. Básica Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

ITO S.; WAKAMATSU K.: Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice and other animals: A comparative review. **Pigment Cell & Melanoma Research**, n. 16: 523-531, 2003. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00072.x>

JAKIMIUK, K. et al. Flavonoids as tyrosinase inhibitors in silico and *in vitro* models: basic framework of SAR using a statistical modelling approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 421–430, 2022. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2014832>

KAPOOR, R. et al. Emerging role of dermal compartment in skin pigmentation: comprehensive review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, p. 2757–2765, 2020. <https://doi.org/10.1111/jdv.16404>

KHATIB, S. et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 433 – 441, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.010>

KIM, E. H. et al. The vascular characteristics of melasma. **Journal of Dermatological Science**, v. 46, n. 2, p. 111-116, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.01.009>

KIM, H. et al. Naturally-Occurring Tyrosinase Inhibitors Classified by Enzyme Kinetics and Copper Chelation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24098226>

KIM, D. et al. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: A fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n.3, p. 935–941, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf0521855>

KUBO, I. et al. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1749 – 1755, 2000.

KUMAR, K. J. S. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Studies Disclosed the Depigmenting Effects of Gallic Acid: A Novel Skin Lightening Agent for Hyperpigmentary Skin Diseases. *BioFactors*, v.39, n. 3, p. 259–270, 2013. <https://doi.org/10.1002/biof.1064>

KUMARI, S. et al. Melanogenesis inhibitors. *Acta Dermato-Venereologica* (Vol. 98, Issue 10, pp. 924–931). **Acta Dermato-Venereologia**, v. 98, p. 924 – 931, 2018. <https://doi.org/10.2340/00015555-3002>

KWON, S. H. et al. Melasma: Updates and perspectives. *Experimental Dermatology*, v. 28, p. 704–708, 2019. <https://doi.org/10.1111/exd.13844>

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, p. 193–206, 2002. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00034>

LIU, J. K. Natural products in cosmetics. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 12, n. 40, 2022.. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00363-y>

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. 1a ed. Nova Odessa, Brasil, 2000.

MADDALENO, A. S. et al. Melanogenesis and Melasma Treatment. **Cosmetics**, v. 8, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.3390/cosmetics>

MAHAJAN, V. K. et al. Medical therapies for melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, p. 3707–3728, 2022. <https://doi.org/10.1111/jocd.15242>

MANSUR, J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.d'A.; AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 61, n.3, p. 121-124, 1986.

MARAFON, G. et al. Crescimento inicial da aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) sob efeito de doses de fósforo e potássio. In: **XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2015.

MATOS, A. A. et al. An extract from *Myracrodruon urundeuva* inhibits matrix mineralization in human osteoblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 192–201, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.052>

MIOT, L. D. B. et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 84, p. 623-635, 2009.

MONTANARI, T.. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3ed. ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016. 229p

MOREIRA, A, M. et al. Double-blind comparative study of hydroquinone and ursine grape extract in the treatment of melasma. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 2, p. 99–104, 2010. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265521080005>

NARLA, S., et al. (2020). Visible light in photodermatology. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 19, n.1, p. 99–104, 2020. <https://doi.org/10.1039/c9pp00425d>

NEVES, A. M. et al. Phenolic profile, antioxidant and antifungal activity of extracts from four medicinal plants of the Anacardiaceae family. **Research, Society and Development**, v. 10, n.8, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17421>

NOGUEIRA, M. N.; FERREIRA, L. A. A eficácia do ácido tranexâmico tópico no tratamento do melasma: evidências clínicas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 17, n. 2, 236 – 241, 2018. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v17i2.23920>

OJHA, S. et al. Formulation and evaluation of face serum containing bee venom and aloe vera gel, **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 1100 – 1105, 2019. <https://doi.org/10.20959/wjpr20192-14104>

OLIVEIRA, M. B. S. et al. Photoprotective and antiglycation activities of non-toxic *Cocos nucifera* Linn. (Arecaceae) husk fiber ethanol extract and its phenol chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v.162, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113246>

ORHAN, I. E.; DENIZ, F. S. S. Inhibition of Melanogenesis by Some Well-Known Polyphenolics: A Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1412–1423, 2020. <https://doi.org/10.2174/1386207323666201211102233>

PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A. Natural and bioinspired phenolic compounds as tyrosinase inhibitors for the treatment of skin hyperpigmentation: Recent advances. **Cosmetics**, v. 6, 2019. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040057>

PAPAZISIS, K. T. et al. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods** , v. 208, n. 2, p. 151–158, 1997.

PAREYN, F. G. C. et al. *Myracrodruon urundeuva*: Aroeira. In CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília, DF: MMA, 2018. Cap. 5, p. 766-772 il. color. (Série Biodiversidade, 51).

PARK, H. Y. et al. CELLULAR MECHANISMS REGULATING HUMAN MELANOGENESIS. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p. 1493–1506), 2009. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8703-8>

PENG, Z. et al. Anti-tyrosinase, antioxidant and antibacterial activities of gallic acid-benzylidenehydrazine hybrids and their application in preservation of fresh-cut apples and shrimps. **Food Chemistry**, v. 378, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132127>

PEREIRA, L. Seaweeds as source of bioactive substances and skin care therapy- Cosmeceuticals, algotherapy, and thalassotherapy. **Cosmetics**, v. 5, 2018. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>

PHARMASPECIAL. Literatura ARISTOFLEX AVL®. Disponível em: https://www.pharmaspecial.com.br/media/produtos/5_lit_aristoflex_avl.pdf, Acesso em 10 de julho de 2023.

QIAN, W. et al. Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 1, p.173–185, 2020. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8687>

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. **Gerontology**, v. 61, p. 427–434, 2015. <https://doi.org/10.1159/000371708>

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n.4, p.485-492, 2002

RAMLI, S.; RUANGRUNGSI, N. Tyrosinase inhibition, antioxidant activity and total phenolic content of selected Mimosaceae pericarps ethanolic extracts. **International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science**, v. 4, p. 47 – 57, 2021.

RODRIGUES, F. A. M. et al. Spondias purpurea L. Stem Bark Extract: Antioxidant and in vitro Photoprotective Activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 10, p. 1918-1930, 2021.

SAHIN, S. C. The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 236–243, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.004>

SANDIN, J. et al. Application of lactic acid peeling in patients with melasma: a comparative study. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v.6, n. 3, p. 255–260, 2014. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265532575006>

SANTOS, C. C. S. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant properties of *Schinopsis brasiliensis* bark. **Journal Of Ethnopharmacology**, v.213, p176-182, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.012>.

SEÇKIN, H. Y. et al. Oxidative stress status in patients with melasma. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 212–217, 2014. <https://doi.org/10.3109/15569527.2013.834496>

SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; BOTTO, J. M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, p. 328–347, 2018. <https://doi.org/10.1111/ics.12466>

SILVA, D. P. D. Caracterização por Espectrometria de Massas dos Constituintes Químicos de *Myracrodruon Urundeuva* (Aroeira-do-Sertão) e Potencial Antioxidante. In: Jean César Farias de Queiroz. (Org.). **Avanços em Biotecnologia e Bioprocessos**. 1ed.Campina Grande: EDUFPG, v. 1, p. 213-241, 2022.

SINGH, S. K et al. The silver locus product as a new tool for the analysis of melanosome transfer in human melanocyte-keratinocyte co-culture. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 418–426, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00702.x>

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Oxidants And Antioxidants**, p. 152-178, 1999.

SOUSA, C. A. A. Melanossomas e tráfego de vesículas na pigmentação da pele e cabelo. Estratégias no controlo da pigmentação. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa.

SUZUKI, S. et al. Comparação do fototipo entre caucasianos e orientais. **Surgical & Cosmetic Dermatology**. v. 3, n. 3, p. 193–196, 2011.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265522087005>

TAYLOR, P. et al. Screening of venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 4), p. 530–539, 2013. <https://doi.org/10.1002/ptr.4752>

TOGNI, S. et. al. Photoprotective and antioxidant effects of a standardised olive (*Olea europaea*) extract in healthy volunteers. **Dermatological Experiences**, v. 17, n 4, p. 143 – 148, 2015.

VAN DEN BOSSCHE, K.; NAEYAERT, J. M.; LAMBERT, J. The quest for the mechanism of melanin transfer. **Traffic**, v. 7, p. 769–778), 2006
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00425.x>

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemão. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189 – 195, 2003.

VIDEIRA, I. F. S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 88, p. 76-83, 2013.

VIEIRA, L. M., et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v..17, n.4, p. 521-527, 2015.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 452 – 457, 2009.

WNUK, W. et al. Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 39, p. 26–33, 2022. <https://doi.org/10.5114/ADA.2022.113617>

ZAIDI, K. U. et al. Microbial tyrosinases: Promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. **Biochemistry Research International**, v. 2014, 2014. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/854687>

ZHAO, W. et al. Potential application of natural bioactive compounds as skin-whitening agents: A review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, p. 6669–6687), 2022. <https://doi.org/10.1111/jocd.15437>

ZHAO, H. et al. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, P. 7277–7286, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf061087w>.

Zhou, S. et al. Epigenetic regulation of melanogenesis. **Ageing Research Reviews**, v. 69, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101349> ZILLICH, O. V. et al. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 455–464), 2015. <https://doi.org/10.1111/ics.12218>

ANEXOS

ANEXO I – RELATÓRIO DO ENSAIO. AVALIAÇÃO DERMATOLÓGICA DA IRRITABILIDADE DÉRMICA PRIMÁRIA, ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO

RELATÓRIO DE ENSAIO

AVALIAÇÃO DERMATOLÓGICA DA IRRITABILIDADE DÉRMICA PRIMÁRIA, ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO

Patrocinador:	EDILBERTO ROCHA SILVEIRA
Endereço:	RUA SENADOR ÁLVARO ALDOFO, 939, PADRE ANDRADE, FORTALEZA/CE, CEP: 60.356-362
Local de realização da pesquisa:	IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada Ltda. Rua Leonardo Cavalcanti, 314, Centro Jundiaí-SP, Brasil, CEP 13201-013
Código do Produto:	IPC.2021.4096
Nome do Produto:	SÉRUM FACIAL DAS FOLHAS DE AROEIRA-DO-SERTÃO (MYRACRODRUON URUNDEUVA)
Lote / Fabricação / Validade:	NÃO INFORMADO / 24/11/21 / NÃO INFORMADO
Emissão do Relatório:	11/02/2022

HRIPT

IPC.2021.4096

IPC-017.04
de 15

Versão 04

Página 1

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	OBJETIVO	4
3.	METODOLOGIA.....	4
3.1.	Seleção dos Participantes	4
3.2.	Informações do produto fornecidas pelo Patrocinador	5
3.3.	Consentimento dos Participantes de Pesquisa	7
3.4.	Aplicação do Produto-Teste	7
3.5.	Avaliação Médica de Sinais Clínicos e Sensações de Desconforto	7
3.6.	Procedimento da Pesquisa.....	8
4.	RESULTADOS	8
5.	CONCLUSÃO	9
6.	REFERÊNCIAS.....	10
7.	APROVAÇÕES	10
ANEXO 1 – CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA		11
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO		11

1. INTRODUÇÃO

Segundo a resolução RDC nº 07/2015, “Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.”

Na sociedade atual, o aspecto estético vem ganhando cada vez mais importância e dessa forma a busca pela melhora da aparência levou a um grande crescimento na indústria de cosméticos. Com esse crescimento, surgiu também a preocupação em garantir a segurança e a eficácia de seus produtos. A criação do Código de Defesa do Consumidor, as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde e a concorrência induziram a indústria a ter maior cautela em relação à ação e benefícios dos seus produtos.

Para comprovar a eficácia e a segurança de seus produtos, as indústrias realizam testes clínicos em humanos, com acompanhamento de médicos dermatologistas.

Uma preocupação crescente da indústria de cosméticos é evitar possíveis reações adversas nos usuários de seus produtos. Afinal, o consumidor é muito mais crítico quanto à irritação cutânea provocada por um produto cosmético do que por um medicamento tópico.

Considera-se reação adversa qualquer sinal ou sintoma desencadeado por um produto tópico utilizado de maneira correta (FISHER, 1995). Entre as reações adversas cutâneas provocadas por estes produtos destaca-se a dermatite eczematosa de contato, urticária, acne e manchas (SAMPAIO & RIVITTI, 2000).

O potencial de irritação de um produto depende de uma série de variáveis: componentes usados, concentração dos ingredientes, absorção, quantidade aplicada, estado da pele, modo e frequência de aplicação e efeito cumulativo (DOOMS-GOOSSENS, 1993).

A permeabilidade da pele varia conforme a região do corpo, sendo que as pregas e a face são áreas de maior absorção. Quando aplicado sobre a pele, um produto terá maior ou menor absorção percutânea em função da sua concentração, tipo de veículo utilizado, área da superfície cutânea e tempo de contato com a pele (ZATZ, 1995).

Os testes realizados com seres humanos são regulamentados segundo leis bastante rígidas, como objetivo de proteger e resguardar os indivíduos. Estas leis variam de acordo com o país. No Brasil, estas pesquisas são permitidas, desde que tenham protocolos aprovados por uma Comissão de Ética Médica e sigam os preceitos da Declaração de Helsinque e da Resolução 466/12 (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 2012)

O teste de contato (*patch test*) é a principal ferramenta utilizada no diagnóstico de reação provocada por cosmético e na pesquisa de alergenidade. Como os principais riscos potenciais do uso de um novo produto são a irritação, a alergia por sensibilização, a fototoxicidade e a fotossensibilização, na pesquisa de alergenidade estão envolvidos os seguintes testes clínicos: irritabilidade dérmica primária e acumulada, sensibilização cutânea, fototoxicidade e fotossensibilização. Estes consistem em aplicações repetidas do produto na pele, e têm o objetivo de detectar possíveis irritações ou indução de sensibilização (KLIGMAN & WOODING, 1967, FISHER, 1995).

2. OBJETIVO

Avaliar a irritabilidade dérmica primária, acumulada e a sensibilização promovidas pelo produto-teste comparado a um controle (*patch test*).

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção dos Participantes

CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES SELECIONADOS			
Nº de participantes incluídos no estudo	60	Fototipos (Fitzpatrick)	I a IV
Sexo	M e F	Idade	20 a 65

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO
<ul style="list-style-type: none"> Idade: 18 a 65 anos Fototipos: I a IV

CRITÉRIOS DE NÃO-INCLUSÃO / EXCLUSÃO
<ul style="list-style-type: none"> Marcas cutâneas na área experimental que interfiram na avaliação de possíveis reações cutâneas (distúrbios da pigmentação, malformações vasculares, cicatrizes, aumento de pilosidade, efélides e nevus em grande quantidade, queimaduras solares); Dermatoses ativas (local e disseminada) que possam interferir nos resultados do estudo; Gestantes ou lactantes; Antecedentes de reações alérgicas, irritação ou sensações de desconforto intensas a produtos de uso tópico: cosméticos e medicamentos; Participantes com histórico de alergia ao material utilizado no estudo; Antecedentes de atopia; Antecedentes de patologias agravadas ou desencadeadas pela radiação ultravioleta; Portadores de imunodeficiências; Transplantados renais, cardíacos ou hepáticos; Exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento até 15 dias antes da avaliação inicial; Previsão de exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento, durante o período de condução do estudo; Previsão de tomar banho de mar, piscina ou sauna durante o estudo; Participantes que praticam esportes aquáticos; Uso dos seguintes medicamentos de uso tópico sistêmico: imunossupressores, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais, e corticoides até duas semanas antes da seleção; Tratamento com vitamina A ácida e/ou seus derivados via oral ou tópica até 1 mês antes do início do estudo;

HRIPT

IPC.2021.4096

- Previsão de vacinação durante a realização do estudo ou até 3 semanas antes do estudo;
- Estar participando de outro estudo;
- Qualquer condição não mencionada acima que, na opinião do investigador, possa comprometer a avaliação do estudo;
- Histórico de ausência de aderência ou de indisposição em aderir ao protocolo de estudo;
- Profissionais diretamente envolvidos na realização do presente protocolo e seus familiares.

RESTRIÇÕES IMPOSTAS AOS PARTICIPANTES

Não realizar tratamentos estéticos ou dermatológicos durante o estudo.

Medicações proibidas durante o estudo:

- Anti-inflamatórios
- Anti-histamínicos
- Imunossupressores
- Vitamina A ácida e derivados

3.2. Informações do produto fornecidas pelo Patrocinador

NOME DO PRODUTO

SÉRUM FACIAL DAS FOLHAS DE AROEIRA-DO-SERTÃO (MYRACRODRUON URUNDEUVA)

FÓRMULA INCI			
Excipientes	%	INCI	Função
ARISTOFLEX AVL	1,00%	Caprylic/Capric Triglyceride (and) Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (and) Trilaureth-4 Phosphate (and) Polyglyceryl-2-Sesquiosostearate	Agente de viscosidade/emulsionante
GOMA XANTANA	0,50%	Xanthan Gum	Agente de viscosidade
OLEO DE ROSA MOSQUETA	1,00%	Rosa Canina Fruit Oil	Ativo
EDTA	0,10%	DISODIUM EDTA	Agente quelante
BHT	0,05%	BHT	Antioxidante
FENOXIETANOL + ETILHEXILGLICERINA	0,50%	Ethyl Hexyl Glycerin, Phenoxyethanol	Conservante
TRIETANOLAMINA	qs.	Triethanolamine	Alcalinizante
GLICERINA	2,00%	Glycerin	Umectante
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA AROEIRA-DO-SERTÃO (<i>Myracrodruon urundeuva</i>)	1,00%		Ativo
ÁGUA	Q.S.P	Aqua	Veículo

HRIPT

IPC.2021.4096

Uma amostra do produto foi armazenada e será mantida no IPclin® por um período de 1 mês apartir da finalização da pesquisa.

3.3. Consentimento dos Participantes de Pesquisa

O objetivo e a metodologia da pesquisa foram esclarecidos para os participantes e estes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

3.4. Aplicação do Produto-Teste

O produto foi aplicado tal e qual sobre apósitos semi-oclusivos. Foi utilizada água destilada como controle. Os apósitos foram colocados no dorso direito ou esquerdo dos participantes (segundo aleatorização). As posições dos produtos e controle nos apósitos de cada participante foram mantidas aolongo de todo o teste.

3.5. Avaliação Médica de Sinais Clínicos e Sensações de Desconforto

Foi realizada avaliação médica inicial no momento da inclusão dos participantes para verificaçãoda ausência de sinais clínicos iniciais incompatíveis com a inclusão dos participantes.

Os dados da avaliação médica foram registrados no caderno de investigação. O médico ficou disponível durante todo o estudo para avaliação de possíveis eventos adversos.

Os resultados foram avaliados como segue:

- Sensações de desconforto: os participantes foram questionados sobre as sensações de desconforto sentidas, paralelamente ao exame clínico. As sensações de desconforto relatadas foram descritas em relação à natureza (exemplo: ardência, pinicamento, prurido, repuxamento, resfriamento, aquecimento, etc.); foram classificadas quanto à intensidade como: leve, moderada ou intensa; quanto à localização; e quanto à duração; e foi verificada a imputabilidade ao produto teste.

- Sinais clínicos: foram classificados de acordo com a tabela abaixo.

SINAIS CLÍNICOS									
/	Nada a relatar	Ed	Edema	Pu	Pústulas	No	Nódulos	Cr	Crosta
E	Eritema	Pa	Pápulas	Bo	Bolhas	Re	Ressecamento / Descamação	V	Vesícula
S	Efeito sabão	C	Coloração (hipercromia)						
CLASSIFICAÇÕES DOS SINAIS CLÍNICOS									
Vesículas ou pápulas	1 n° = 1 ou 2	Edema e eritema	1 Leve 2 Moderado 3 Severo/intenso	Aparência do eritema e edema	d Difuso p Pontual peri Periférico				
	2 n° > 2								

O nexu causal das reações ao produto foi investigado.

HR IPT

IPC.2021.4096

3.6. Procedimento da Pesquisa

Foi empregado o teste de contato (*patch test*). O produto e o controle foram aplicados sob apósito semi-oclusivo no dorso dos participantes, no lado direito ou esquerdo (de acordo com a randomização).

O teste de contato permaneceu na pele durante 48 horas, sendo retirado após esse tempo para leitura de sinais clínicos e questionamento das sensações de desconforto pelo médico dermatologista. Após a leitura, novo apósito foi colocado, mantendo-se os produtos na mesma posição.

Todas as leituras foram registradas no caderno de investigação. As aplicações foram realizadas de acordo com a tabela a seguir:

Dia da Semana	Semana	Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira
Fase de Indução	1 ^a	A		A+L		A+L
	2 ^a	A+L		A+L		A+L
	3 ^a	A+L		A+L		L
Fase de Descanso	4 ^a	Não há aplicação de apósito				
	5 ^a					
Fase de Desafio	6 ^a	A+L		L		

Legenda: A = aplicação; L = leitura.

4. RESULTADOS

Nº de part. incluídos	60	Nº de part. que finalizaram o estudo	53
-----------------------	----	--------------------------------------	----

Nº de part. desistentes	07	Referência e motivo dos part. desistentes	v.12,v.19,v.22,v.30,v.45,v.52,v.57 - os participantes não retornaram por motivos pessoais.
Nº de part. excluídos	0	Referência e motivo dos part. excluídos	Não aplicável

Não foram detectadas reações adversas nas áreas de aplicação do produto e do controle durante o período de estudo. Nenhum participante referiu sensação de desconforto ao produto ou ao controle durante o estudo.

5. CONCLUSÃO

No estudo intitulado “**AVALIAÇÃO DERMATOLÓGICA DA IRRITABILIDADE DÉRMICA PRIMÁRIA, ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO**”, referente ao produto **SÉRUM FACIAL DAS FOLHAS DE AROEIRA-DO-SERTÃO (MYRACRODRUON URUNDEUVA)**, código **IPC.2021.4096**, enviado pelo Patrocinador **EDILBERTO ROCHA SILVEIRA**, pode-se concluir que:

O produto não induziu processo de irritação e sensibilização cutânea, durante o período de estudo e, portanto, suporta o apelo “Dermatologicamente testado”.

Este relatório se destina exclusivamente à **Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde** e ao uso interno da empresa **EDILBERTO ROCHA SILVEIRA**. Nenhuma informação deste relatório pode ser divulgada em quaisquer veículos de comunicação sem autorização por escrito do autor.

NOTA 1: O resultado refere-se à amostra recebida.

NOTA 2: A amostragem foi realizada pelo Patrocinador do estudo.

NOTA 3: A condição de realização do ensaio garante a rastreabilidade dos dados gerados.

NOTA 4: É proibida a reprodução parcial deste Relatório de Ensaio.

6. REFERÊNCIAS

- [1] BARAN, R. & MAIBACH, H.I., (ed.). Cosmetic Dermatology, Baltimore, Williams & Wilkins, 1994.
- [2] CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução 466/12 do Ministério da Saúde. Diário Oficial, 12/12/2012.
- [3] DOOMS - GOOSSENS, A. Cosmetics as causes of allergic contact dermatitis. Cutis. 52: 316-320, 1993.
- [4] FISHER, A.A. Contact Dermatitis, 2ª edition, Philadelphia, Lea & Febiger, 1995.
- [5] KAIDBEY, K.H. & KLIGMAN, A.M. Photomaximization test for identifying photoallergic contact sensitizers. Contact Dermatitis. 6: 161-169, 1980.
- [6] KLIGMAN, A.M. & WOODING, W.M. A method for the measurement and evaluation of irritants of human skin. J. Invest. Derm. 49: 78-94, 1967.
- [7] MARZULLI, F.N. & MAIBACH, H. I. Model for evaluating skin irritants: A comparison of results obtained on animals and man using repeated skin exposures. Fd. Cosmet. Toxicol. 13: 533-540, 1975.
- [8] PATHAK, M.A. Photobiology of melanin pigmentations. J. Am. Acad. Derm. 9: 724-733, 1983.
- [9] SAMPAIO, S.A.P. & RIVITTI, E.A. Dermatologia Básica, 2ª edição, São Paulo, Artes Médicas, 2000.
- [10] STORK, H. Photoallergy and photosensitivity. Arch. Derm. 91: 469-482, 1965.
- [11] STOTT, C.W. & COL. Evaluation of the phototoxic potential of topically applied agents using long-wave ultraviolet. J. Invest. Derm. 55: 335-338, 1970.
- [12] WILKINSON, D.S. & COL. Terminology of contact dermatitis. Acta Dermatovener (Stockolm)50: 287-292, 1970.
- [13] ZATZ, J.L. Aumento da penetração cutânea. Cosmetics & Toiletries, 7: 52-58, 1995.
- [14] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Diário Oficial da União, 11/02/2015

7. APROVAÇÕES


Cassiano Carlos Escudeiro
(Diretor - CRQ: 04153268 IV Região)


Dra. Leila Bloch
(Médica dermatologista – CRM: 108.287)

HR IPT

IPC.2021.4096

IPC-017.04

Versão 04

Página 10 de 15

ANEXO 1 – CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Ref. Participante	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Iniciais do nome	LDSM	EFFD	MJLS	JMR	MGC	AFMS	PAO	MCMD	PD	PJCR
Sexo (M ou F)	F	F	F	F	F	F	F	F	F	M
Idade (18 a 65 anos)	25	50	56	22	20	42	32	63	37	33
Fototipo (I a IV)	III	I	II	III	III	III	III	III	III	II
Ref. Participante	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Iniciais do nome	AVP	MF	CRMV	MTJB	JSF	MTJB	MCRSS	PAB	AP	MCT
Sexo (M ou F)	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Idade (18 a 65 anos)	54	42	49	42	25	42	42	45	27	50
Fototipo (I a IV)	III	I	III	III	III	III	III	III	III	II
Ref. Participante	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Iniciais do nome	SBL	JOL	MRSB	AFG	ACMS	NBAA	CVBL	EALG	AAA	ACBO
Sexo (M ou F)	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Idade (18 a 65 anos)	42	29	42	32	51	65	49	51	42	38
Fototipo (I a IV)	III	III	II	II	II	III	II	III	III	III
Ref. Participante	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Iniciais do nome	MAAF	ALBA	AGBB	SC	LCP	MJSN	MLD	LS	ILS	BLSS
Sexo (M ou F)	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Idade (18 a 65 anos)	56	50	41	53	35	44	60	28	50	20
Fototipo (I a IV)	III	II	III	III	II	IV	III	IV	III	IV
Ref. Participante	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Iniciais do nome	EDM	MIS	TOD	TCCS	CFSS	SFR	APSR	PFSL	DFCA	LPL
Sexo (M ou F)	F	F	F	F	F	F	F	M	F	F
Idade (18 a 65 anos)	43	62	45	40	27	41	33	28	33	25
Fototipo (I a IV)	I	IV	I	III	III	III	III	III	III	II
Ref. Participante	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Iniciais do nome	LHAS	RDP	SSL	DSO	APMGM	BMAA	CFJ	NSS	CGT	DMA
Sexo (M ou F)	M	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Idade (18 a 65 anos)	33	25	31	37	48	22	29	20	36	34
Fototipo (I a IV)	III	III	III	II	II	III	III	III	II	IV

HRIPT

IPC.2021.4096

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DERMATOLÓGICA DA IRRITABILIDADE DÉRMICA PRIMÁRIA, ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO – “DERMATOLOGICAMENTE TESTADO”

- ✓ Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Pedimos que entenda detalhadamente todas as etapas e, se concordar, assine este termo de consentimento livre e esclarecido.
- ✓ Todas as dúvidas surgidas durante e após a pesquisa clínica serão prontamente esclarecidas.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

- ✓ Justifica-se a realização do ensaio pela necessidade de verificar a segurança dos produtos em questão em seus usuários finais, seres humanos.

OBJETIVO DA PESQUISA

- ✓ Esta pesquisa tem por objetivo observar os efeitos da aplicação de um produto na pele e verificar o não aparecimento de irritação e alergia.

PROCEDIMENTO DO TESTE

- ✓ No primeiro dia você virá ao Instituto para avaliação médica da sua pele. Caso você atenda aos critérios, será colado o adesivo com o produto-teste nas suas costas.
- ✓ Você deverá voltar depois de 48 horas para que o médico avalie a sua pele das costas e cole um novo adesivo com produto no mesmo local.
- ✓ Durante as três primeiras semanas, você deverá comparecer ao Instituto toda segunda, quarta e sexta-feira. Depois, você terá duas semanas de descanso (não precisa comparecer ao Instituto, mas precisa cumprir com as exigências do estudo). Na sexta semana, você deverá retornar ao Instituto para colar o adesivo com produto na segunda-feira, e deverá retornar na quarta-feira para a última avaliação médica.

EXIGÊNCIAS DURANTE O PERÍODO DA PESQUISA

- ✓ Você deverá seguir algumas exigências durante o período da pesquisa e somente se concordar deverá assinar este termo de consentimento livre e esclarecido:
 - Não estar grávida, amamentando ou com intenção de engravidar durante a pesquisa;
 - Não participar de nenhuma outra pesquisa clínica ao mesmo tempo, independente da instituição proponente.
 - Não molhar ou retirar o adesivo.
 - Evitar roupas justas no local de teste para evitar retirar o adesivo e causar irritação;
 - Se houver qualquer modificação nos seus hábitos, solicitamos que nos comunique para melhor interpretação dos resultados.
 - Evitar exposição solar intensa durante o estudo (MESMO DURANTE A FASE DE DESCANSO);
 - Evitar banhos de piscina, mar e banheira durante o estudo;
 - Não usar qualquer tipo de produto (desodorante ou antiperspirante, talco, óleo para banho, cremes, loções, perfumes, colônias e medicações tópicas) nas áreas próximas à do teste. Caso utilize algum destes produtos ou faça uso de medicação sistêmica, avise;
 - Não alterar hábitos cosméticos, de higiene, de dieta e de exercícios;
 - Não alterar o tratamento hormonal, nem o método contraceptivo medicamentoso;
 - Não utilizar medicações de uso tópico ou sistêmico: qualquer anti-inflamatório; antialérgicos; imunossupressores (medicamentos que bloqueiam a resposta do sistema de defesa); vitamina A ácida e seus derivados;
 - Não realizar tratamento estético, com esteticista ou médico dermatologista;

HR IPT

IPC.2021.4096

- Em caso de tratamento médico durante a pesquisa, qualquer que seja, informar imediatamente ao responsável pela pesquisa.

✓ **CADA VISITA TEM DURAÇÃO DE 30 MINUTOS. OS HORÁRIOS E DIAS AGENDADOS DEVEM SER RESPEITADOS.**

- ✓ Os resultados dos questionários de avaliação dos produtos, poderão ser divulgados, mas de forma anônima para não expor o participante.
- ✓ Todos os itens acima foram lidos e esclarecidos, em voz alta, para os participantes da pesquisa.
- ✓ Observação: Devido a COVID-19, o centro de pesquisa adotou todas as medidas de segurança para realização dos testes, visando a saúde de seus colaboradores e voluntários.
- ✓ Há disponibilização de álcool em gel e máscaras no instituto, ocorrerá espaçamento entre horários de visitas para evitar aglomerações e respeitando o distanciamento; além do uso obrigatório de máscaras, haverá descontaminação prévia à entrada com álcool 70° e aferição de temperatura;

DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PREVISÍVEIS

- ✓ O grau dos riscos associados a pesquisa pode variar de pessoa para pessoa, levando em consideração as diferentes características fisiológicas e pessoais dos participantes. Todas as matérias primas utilizadas no produto são aprovadas para uso tópico. Existem desconfortos e riscos mínimos para o participante da pesquisa, entretanto, como qualquer produto, poderá causar reações inesperadas como “vermelhidão”, “inchaço”, “coceira” e “ardor” nos locais de aplicação deste.

BENEFÍCIOS ESPERADOS

- ✓ Sua participação nesta pesquisa permitirá verificar a ausência, ou não, do surgimento de reações alérgicas e irritação pelos produtos investigacionais, garantindo à comunidade, a verificação da segurança dos produtos.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

- ✓ Garantimos que qualquer reação adversa provocada pelo produto em teste será acompanhada pelo médico dermatologista e/ou especialista responsável pelo projeto e que, se necessário, será fornecida a medicação adequada, atendimento médico, locomoção até o hospital onde será realizado o atendimento e serão pagas pela Instituição a internação e todas as demais despesas que se fizerem necessárias para a garantia da saúde e do bem-estar pleno da sua participação. Em complementação, poderá ser possível a realização de um teste complementar de acordo com as modalidades planejadas pelo responsável da pesquisa, para que seja entendida a reação adversa provocada pelo produto teste.
- ✓ Garantimos que caso você apresente uma gravidez não planejada ao longo da pesquisa será acompanhada ao longo da gestação e por um período após o nascimento do bebê. O tempo de acompanhamento do bebê será determinado pelo médico especialista (pediatra e/ou ginecologista) com base nos possíveis riscos gerados pela participação na pesquisa ao bebê.
- ✓ Garantimos o seu direito à solicitação de indenização conforme o Código Civil Brasileiro.

CONTATO COM O PESQUISADOR E COM O CEP (COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA)

- ✓ Em caso de dúvida ou intercorrência, você deve procurar imediatamente o centro de pesquisa ou, então, entrar em contato, diretamente, com o pesquisador responsável ou qualquer membro da equipe através dos telefones abaixo.
Pesquisador responsável: Dr. Cassiano Carlos Escudeiro
- ✓ Endereço: Av João Antonio Meccatti, 1221 – BLOCO B, ANDAR SUPERIOR SALA 1 A 11 21 E 2 Jardim Planalto - Jundiaí/SP - 13.211-223. Telefone: 11 97030-2777

HRIPT

IPC.2021.4096

- ✓ Horário de Funcionamento: Segunda a Sexta-feira – 08h às 18h
- ✓ Este protocolo de pesquisa foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, protegendo os participantes em seus direito e dignidade. Caso tenha alguma dúvida em relação à ética ou aos procedimentos realizados neste estudo, você pode entrar em contato com o CEP Invitare, Comitê responsável pela análise ética deste estudo.
- ✓ Comitê de Ética em Pesquisa Invitare
Rua Itaipu, 475 – São Paulo – 04052-010 - SP, Telefone: (11) 5581-2429,
- ✓ Horário de funcionamento das 10h às 17h, de segunda-feira a sexta-feira. E-mail para contato: cep@invitare.com.br

GARANTIA DE RECUSA A PARTICIPAÇÃO OU SAÍDA DA PESQUISA

- ✓ O participante é livre para interromper a qualquer momento sua participação na pesquisa se assim desejar ou a critério do pesquisador, o que não causará nenhum prejuízo.
- ✓ O participante é livre para não aceitar a participação nesta pesquisa.

GARANTIA DE SIGILO

- ✓ Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo, os dados relevantes à pesquisa como idade e fototipo são identificados pelas iniciais do nome do participante. Os resultados gerais obtidos na pesquisa serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluída sua publicação na literatura científica especializada
- ✓ A presença de um representante do patrocinador, é permitida durante algumas etapas da pesquisa, exceto na coleta de dados, mantendo assim, a confidencialidade dos participantes. A presença do mesmo se faz necessária, quando solicitada, para eventuais auditorias, acompanhamento de reações ao produto, observação de boas práticas de laboratório, entre outros.

GARANTIA DE ENTREGA DE VIA

- ✓ Este Termo de Consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma via permanecerá com você (participante da pesquisa) ou seu representante legal e a outra via com o pesquisador responsável, ou pela pessoa por ele delegada.

RESSARCIMENTO E DESPESA

- ✓ Você receberá compensação material, exclusivamente de despesas do participante e seus acompanhantes, tais como gastos de transporte, alimentação, entre outros, quando necessário. Da mesma forma você não terá nenhuma despesa pessoal em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Durante o período de sua participação, se houver qualquer despesa adicional de sua parte em relação à despesas, você será reembolsado.
- ✓ Os valores não são limitados. Sempre que necessário, haverá reembolso.

Assinatura do participante: _____ Data: ____ / ____ / ____

- ✓ Concordo em participar da pesquisa clínica **AVALIAÇÃO DERMATOLÓGICA DA IRRITABILIDADE DÉRMICA PRIMÁRIA, ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO – “DERMATOLOGICAMENTE TESTADO”** e declaro ter sido esclarecido sobre todos os itens acima.

HRIPT

IPC.2021.4096

Concordo que um representante do Patrocinador possa estar presente durante algumas etapas da pesquisa.

TESTEMUNHA

(Preencher apenas quando o participante não for alfabetizado)

Eu, _____
(Nome completo, sem abreviação)

Assinatura da testemunha: _____ Data: ____ / ____ / ____

Ass. do Resp. por aplicar o TCLE: _____ Data: ____ / ____ / ____

ANEXO II – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DA PATENTE

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2022 011452 8**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 07272636000131**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Av da universidade, 2853 - Benfica**Cidade:** Fortaleza**Estado:** CE**CEP:** 60710-780**País:** Brasil**Telefone:** (85) 3366-9434**Fax:** (85) 3366-9941**Email:** patentes@ufc.br

 BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais
Instituto Nacional da Propriedade Industrial Ministério da Economia					

Consulta à Base de Dados do INPI

[Início | Ajuda?]

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

1/1

Depósito de pedido nacional de Patente(21) Nº do Pedido: **BR 10 2022 011452 8**

(22) Data do Depósito: 10/06/2022

(43) Data da Publicação: -

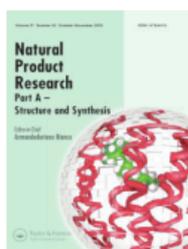
(47) Data da Concessão: -

(71) Nome do Depositante: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (BR/CE)

Anuidades ?									
Petições ?									
Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery	Data		
Serviços									
200	✓	870220051186	10/06/2022	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ				
Anuidade									
Outros									
Publicações ?									
RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho					
2688	12/07/2022	2.1							
2685	21/06/2022	2.10	-	- Número de Protocolo '870220051186' em 10/06/2022 14:25 (WB)					

Dados atualizados até **08/08/2023** - Nº da Revista: **2744**[Documentos Publicados](#)

ANEXO III – ARTIGO PUBLICADO



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Evaluation of the skin whitening and antioxidant activity of *Myracrodum urundeuva* extract (aroeira-do-sertão)

Érika Sabóia Guerra Diógenes, Antônia Lais Coelho da Silva, Francisco Cirineu das Chagas Neto, Edilberto Rocha Silveira, Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, Roberto Nicolete & Tamara Gonçalves de Araújo

To cite this article: Érika Sabóia Guerra Diógenes, Antônia Lais Coelho da Silva, Francisco Cirineu das Chagas Neto, Edilberto Rocha Silveira, Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, Roberto Nicolete & Tamara Gonçalves de Araújo (2023): Evaluation of the skin whitening and antioxidant activity of *Myracrodum urundeuva* extract (aroeira-do-sertão), Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2023.2254457](https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2254457)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2254457>

ANEXO IV – ENTREVISTAS E DIVULGAÇÃO

☰ YouTube^{BR}



Érika Diógenes ao desenvolver um sérum facial com ação

Pesquisadora da UFC desenvolve gel facial clareador

 **CAPES_Oficial**
30,2 mil inscritos

[Inscrever-se](#)

 [Gostei](#)  [Compartilhar](#) 

Vídeo completo →





Estudo da UFC desenvolve produto clareador de manchas na pele a partir da aroeira

 **UFCTV**
41 mil inscritos

Inscrever-se

 80   **Compartilhar** 

Vídeo completo →

