UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e
segurança de formulações cosméticas contendo extratos de
chá verde e *Ginkgo biloba***

Susi Elaine Dal’Belo

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e
segurança de formulações cosméticas contendo extratos de
chá verde e *Ginkgo biloba***

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas**

**Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos**

**Orientada: Susi Elaine Dal'Belo
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria
Berardo Gonçalves Maia Campos**

Ribeirão Preto

2008

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dal'Belo, Susi Elaine

Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*.
Ribeirão Preto, 2008.

176 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1. cosméticos 2. chá verde 3. *Ginkgo biloba* 4. fotoproteção
5. eficácia 6. penetração cutânea 7. segurança

FOLHA DE APROVAÇÃO

Susi Elaine Dal’Belo

Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas

Área de concentração: Medicamentos
e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria
Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Ofereço toda a minha vida e este trabalho a Deus, que me deu sabedoria e força para concluir com sucesso mais uma etapa da minha caminhada.

Ao meu pai, Demétrio, que sempre será modelo de dedicação à profissão e de honestidade. Por todo amor à nossa família e pelo apoio constante para a realização dos meus sonhos.

À minha mãe, Maria Umbelina, exemplo de amor, alegria, fé em Deus e otimismo em todos os momentos. Por estar sempre presente quando preciso de conselhos e incentivo.

Agradecimento especial

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia M. B. G. Maia Campos, pela amizade e ensinamentos durante esses anos de convivência que contribuíram para a minha formação como pesquisadora e pelo apoio à realização de parte deste trabalho na França.

Agradecimentos

“A nossa vida se molda por meio das pessoas que conosco partilham amizade, sonhos e alegrias, que ajudam a compor a nossa história e fazem os nossos dias serem mais especiais, ocupando um lugar eterno em nossos corações”

A todos os meus familiares, principalmente à minha irmã **Denise Cristina** e meu cunhado **Marco Aurélio**, à minha querida avó **Olga** e à minha tia **Lu**, pelas orações e estímulo durante os anos de estudo na USP e estadia na França.

Ao **Rodrigo**, pelo amor, carinho e afetuosa presença nos momentos difíceis.

À minha querida amiga **Lorena**, exemplo de competência e profissionalismo, pela amizade sincera e incansável solicitude desde os primeiros trabalhos de Iniciação Científica.

Às amigas **Gracielli, Kassandra, Julie, Priscila, Sabrina, Mirela, Marli, Mariana, Maria Helena e Marina** pelo apoio e companheirismo durante todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos **Gislaine, Lena, Gisele, Eidy, Dudu, Viviane, Thais, Priscila, Mateus, Flávio, Maria Laura, Mirela, Sabrina, Glasiela, Nélio, Marina, Juliana, Luciana, Emeline, Sabrininha, Amanda, Allan, Ananda e Marielle** pelo agradável convívio e colaboração.

Ao **Manuel Eduardo Bortolin**, funcionário do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, pela colaboração prestada no início da minha formação.

Ao amigo **Alexandre Kanashiro**, pelo auxílio com os experimentos de quimiloluminescência.

Aos Professores Dra. **Maria José Vieira Fonseca** e Dr. **Osvaldo de Freitas**, pela concessão do uso do espectrofotômetro e do microscópio para a confecção das imagens histológicas. Aos funcionários do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e, principalmente, ao **Sr. Antônio de Campos**, pela confecção dos cortes histológicos.

Às Professoras Dra. **Maria Vitória L.B. Bentley** e Dra. **Yara Maria Lucisano Valim**, pelas sugestões feitas a este trabalho durante o Exame de Qualificação.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, do Biotério, aos vigilantes e aos auxiliares de limpeza, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela imprescindível assistência durante esses anos.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro concedido na forma de Bolsa do Programa Doutorado Direto (PDD) para a parte desenvolvida no país e na forma de Bolsa de Doutorado Sandwich no Exterior (SWE) para a parte desenvolvida na França.

Ao Professor **Philippe Masson**, meu “padrinho profissional”, por acreditar em meu potencial e pelo seu grande empenho em tornar realidade meu sonho de completar este trabalho na França. Gostaria de agradecer-lo também por sua gentileza ao permitir a realização do teste de compatibilidade cutânea em parceria com a EVIC/IDEC (Bordeaux).

À **Marie-Hélène Podesta-Marty**, “minha mamãe francesa”, todo o meu afeto e gratidão por sua acolhida e confiança, permitindo a realização dos estudos de penetração cutânea com a cooperação da Podesta-Marty International Consultants (PMIC).

A toda equipe de PMIC, especialmente à **Claire Marie Vincent** e **Angeline Gaudin** pela disponibilidade em partilhar seus conhecimentos e experiências sobre estudos de penetração cutânea e validação de procedimentos analíticos.

Ao pessoal do Laboratório de Dermofarmacologia e Cosmetologia da Faculté de Pharmacie da Université de Paris-Sud (XI): A **Christine Lafforgue**, pelos seus conselhos esclarecedores e sua disponibilidade em dermatomizar as biópsias de pele humana. A **Rym Benmustapha**, **Camille Tronche** e **Perrine Koster**, pela amizade e ajuda durante a realização dos experimentos. A **Nicole Perichou** e **Gérard Loubatier** pela acolhida e colaboração durante meu estágio no Laboratório.

À diretoria e toda equipe da **Maison des Etudiants Canadiens** da Cidade Universitária de Paris, pela acolhida durante o estágio sanduíche na França.

*“Um sonho não pode ser acalentado
como algo belo, porém distante. É
preciso buscá-lo, com determinação,
talento e humildade, pois o sucesso
de qualquer empreendimento
depende de coragem e espírito
decidido em aceitar o desafio.”*

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil e no Laboratório de Dermofarmacologia e Cosmetologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Paris-Sud (XI), França.

RESUMO

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba***. 2008. 176f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Extratos vegetais ricos em compostos antioxidantes têm sido amplamente utilizados em produtos cosméticos uma vez que esses compostos poderiam proteger a pele contra os danos da radiação ultravioleta (UV). Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver formulações cosméticas contendo extratos de chá verde (CV) e *Ginkgo biloba* (GB) a fim de avaliar a eficácia pré-clínica, na proteção contra danos causados pela radiação UV, a penetração cutânea e a segurança de tais formulações. Para tal, foram desenvolvidas 13 formulações e após os testes de estabilidade e sensorial, foi selecionada uma formulação a base de fosfato de trilaureth-4 e goma polissacarídica para a realização dos estudos propostos. A eficácia pré-clínica foi realizada por testes *in vitro* (atividade antioxidante) e *in vivo* em animais de laboratório, os quais foram submetidos à radiação UV para a avaliação dos efeitos fotoprotetores das formulações objeto de estudo. O estudo de penetração cutânea foi feito em células de difusão de Franz utilizando pele humana e o de segurança por meio da avaliação da compatibilidade cutânea (estudo clínico). Ambos os extratos, CV e GB, apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, no entanto, CV apresentou maior efeito que GB. Na avaliação da eficácia *in vivo*, foi observado que somente as formulações acrescidas dos extratos vegetais protegeram a pele dos animais contra os danos induzidos pela radiação UV, quando comparadas ao controle irradiado. A formulação que continha GB apresentou efeitos mais pronunciados na proteção da função barreira da pele e contra o eritema, enquanto que a formulação acrescida de CV atuou de maneira mais pronunciada na proteção contra a formação de células de queimadura solar. Os resultados referentes ao estudo de penetração cutânea mostraram que a epigallocatequina-3-galato (EGCG), proveniente da formulação que continha CV, e, a quercetina proveniente da formulação acrescida de GB, penetraram na pele, mas não permearam até o líquido receptor, ou seja, ficaram retidas no estrato córneo e na epiderme viável, sendo que no caso de EGCG, pequenas concentrações também foram encontradas na derme. O estudo de segurança mostrou que as diferentes formulações objeto de estudo apresentaram uma ótima compatibilidade cutânea. Considerando que as formulações contendo os extratos vegetais de CV e de GB apresentaram efeitos fotoprotetores *in vivo*, penetração e retenção de seus flavonóides majoritários na pele e ótima compatibilidade cutânea, pode-se considerar que tais formulações apresentam eficácia e segurança para uso cosmético. Além disso, os resultados obtidos neste estudo contribuíram para mostrar a importância da associação dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* em formulações cosméticas com finalidades fotoprotetoras uma vez que estes extratos apresentam efeitos que se complementam na proteção da pele contra o conjunto de danos induzidos pela radiação UV.

Palavras-chave: cosméticos, chá verde, *Ginkgo biloba*, fotoproteção, eficácia, penetração cutânea e segurança

ABSTRACT

DAL'BELO, S.E. **Evaluation of photoprotective efficacy, skin penetration and safety of cosmetic formulations containing green tea and *Ginkgo biloba* extracts.** 2008. 176f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Botanical extracts rich in antioxidant compounds have been widely used in cosmetic products since they could protect the skin against UV-induced damages. Thus, the objective of this study was to develop cosmetic formulations containing green tea (GT) and *Ginkgo biloba* (GB) extracts in order to evaluate the preclinical efficacy on the skin protection against UV-induced damages, skin penetration and safety of these formulations. For this, 13 formulations were developed and the formulation number 11, containing trilaureth-4 phosphate and a polysaccharide gum, was chosen for the next studies, after stability and sensorial analysis. The pre-clinical efficacy was done by *in vitro* (antioxidant activity) and *in vivo* tests in animal skin submitted to UV radiation in order to evaluate the photoprotective effects of the formulations. The skin penetration study was carried out by using human skin biopsies and Franz diffusion cells. The safety study was performed by a skin compatibility test (clinical study). Both extracts presented antioxidant activity, however GT showed higher antioxidant effect than GB. The *in vivo* efficacy evaluation showed that only the extracts supplemented formulations protected the skin against UV damages, when compared to the irradiated control. The formulation containing GB was more effective in protecting against skin barrier damages and erythema formation, while the formulation containing GT had more pronounced effects against sunburn cell formation. The results of the skin penetration study showed that epigallocatechin-3-galate (EGCG) from GT containing formulation, and quercetin from GB containing formulation penetrated the skin but they were not able to permeate further through the skin to the receptor fluid, that is, these flavonoids were retained into the stratum corneum and viable epidermis. In addition, small quantities of EGCG were found in dermis. The safety study showed that the formulations under study presented very good skin compatibility. Considering that the formulations containing GT and GB provided *in vivo* photoprotective effects, penetration and retention of their mainly flavonoids into the skin and good skin compatibility as well, we can consider that these formulations present efficacy and safety for cosmetic use. In addition, the results contributed to demonstrate the importance of the combination of these two extracts in cosmetic formulations with photoprotective purpose since both extracts had complementary effects on the constellation of UV-induced skin damages.

Keywords: cosmetics, green tea, *Ginkgo biloba*, photoprotection, efficacy, skin penetration, safety

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHT	Butil hidroxi tolueno
C	Concentração da substância
CI	Controle irradiado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNI	Controle não-irradiado
COLIPA	<i>The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i>
CPDs	Dímeros de ciclobutano pirimidinas
CQS	Células de queimadura solar
CV	Extrato de chá verde
CV+GB	Associação dos extratos de chá verde e <i>Ginkgo biloba</i>
D	Derme
DEM	Dose eritematógena mínima
Dm	Coeficiente de difusão da substância no estrato córneo
e	Espessura do estrato córneo
E	Epicatequina
EC	Estrato córneo
ECG	Epicatequina galato
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EROS	Espécies reativas do oxigênio
EV	Epiderme viável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

GB	Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>
HO•	Radical hidroxil
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRP	Horseradish peroxidase
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>
J	Fluxo de absorção
Km	Coeficiente de partilha da substância estrato córneo / veículo
LDL	Lipoproteína de alta-densidade
MMPs	Metaloproteinases
NO•	Radical óxido nítrico
O ₂ ^{-•}	Radical superóxido
p/p	Peso/peso
PA	Para análise
RO•	Radical alcoxil
ROO•	Radiacal peroxil
RPM	Rotações por minuto
S	Superfície de absorção
SCCP	<i>Scientific Committee on Consumer Products</i>
SOD	Superóxido dismutase
TEWL	Perda transepidérmica de água (<i>transepidermal water loss</i>)
UV	Ultravioleta
UVA/B	Ultravioleta A e B
V	Veículo
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
1 Introdução	1
2 Revisão da Literatura	5
2.1 Pele – aspectos gerais.....	6
2.2 Crono e fotoenvelhecimento cutâneo.....	8
2.3 Danos causados pela radiação ultravioleta na pele.....	9
2.4 Uso de antioxidantes em formulações fotoprotetoras.....	13
2.5 Extratos vegetais em produtos cosméticos.....	17
2.5.1 Chá verde.....	18
2.5.2 <i>Ginkgo biloba</i>	23
2.6 Avaliação dos efeitos fotoprotetores de formulações cosméticas.....	26
2.7 A pele e estudos de liberação e penetração cutânea.....	29
2.8 Compatibilidade cutânea.....	34
3 Objetivo	36
4 Material e Métodos	38
4.1 Material.....	39
4.1.1 Matérias-primas.....	39
4.1.2 Equipamentos e acessórios.....	40
4.1.3 Pele.....	42
4.2 Métodos.....	42
4.2.1 Caracterização dos extratos vegetais.....	42
4.2.1.1 Determinação do espectro de absorção.....	42
4.2.1.2 Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i>	43
4.2.2 Desenvolvimento das formulações.....	43
4.2.2.1 Testes de estabilidade das formulações.....	46
4.2.2.1.1 Determinação do pH.....	46
4.2.2.1.2 Centrifugação.....	46
4.2.2.1.3 Estresse térmico.....	46
4.2.2.2 Análise sensorial das formulações.....	46
4.2.2.2.1 Casuística.....	46
4.2.3 Avaliação pré-clínica da eficácia fotoprotetora.....	47
4.2.3.1 Animais de laboratório e aplicação das formulações.....	47
4.2.3.2 Irradiação.....	48
4.2.3.3 Medida do eritema.....	48
4.2.3.4 Medida da perda transepidérmica de água (TEWL).....	49
4.2.3.5 Análises histopatológica e histométrica.....	49
4.2.3.5.1 Obtenção dos cortes histológicos.....	49
4.2.3.5.2 Análise histopatológica.....	50
4.2.3.5.3 Contagem de células de queimadura solar (CQS).....	50
4.2.3.5.4 Quantificação da hiperplasia da epiderme.....	50
4.2.4 Análise estatística.....	50
4.2.5 Estudos de liberação e penetração cutânea <i>in vitro</i>	51
4.2.5.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) para a dosagem dos flavonóides nos extratos vegetais.....	51
4.2.5.1.1 Separação dos flavonóides dos extratos vegetais.....	51
4.2.5.1.2 Escolha dos líquidos receptores e da solução de lavagem.....	52
4.2.5.1.3 Pesquisa de interferentes: especificidade/seletividade.....	53
4.2.5.1.4 Linearidade e curvas de calibração.....	53
4.2.5.1.5 Exatidão.....	55
4.2.5.1.6 Limite de quantificação e intervalo de dosagem.....	57
4.2.5.1.7 Precisão.....	57
4.2.5.1.8 Dosagem de flavonóides nos extratos vegetais de chá verde e <i>Ginkgo biloba</i>	58
4.2.5.2 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i>	58
4.2.5.3 Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i>	60
4.2.5.3.1 Preparação da pele humana.....	60

4.2.5.3.2. Aplicação das formulações e coleta do líquido receptor	60
4.2.5.3.3. Lavagem da superfície das células e retenção cutânea	61
4.2.6 Avaliação da segurança por meio da avaliação da compatibilidade cutânea	62
5 Resultados	64
5.1 Caracterização dos extratos vegetais.....	65
5.1.1 Determinação do espectro de absorção	65
5.1.2 Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i>	65
5.2 Testes de estabilidade das formulações	68
5.2.1 Determinação do pH	68
5.2.2 Centrifugação	69
5.2.3 Estresse térmico	69
5.3 Análise sensorial das formulações	70
5.4 Avaliação pré-clínica da eficácia fotoprotetora	77
5.4.1 Medida do eritema.....	78
5.4.2 Medida da perda transepidérmica de água (TEWL)	81
5.4.3 Contagem de células de queimadura solar (CQS)	84
5.4.4 Quantificação da hiperplasia da epiderme.....	87
5.4.5 Análise histopatológica.....	92
5.4.5.1 Descrição da pele do animal de experimentação (controle não-irradiado)	92
5.4.5.2 Descrição da pele do animal de experimentação submetido à irradiação (controle irradiado).....	92
5.4.5.3 Grupo que recebeu a aplicação da formulação veículo e irradiação	92
5.4.5.4 Grupo que recebeu a aplicação da formulação contendo extrato de chá verde e irradiação	93
5.4.5.5 Grupo que recebeu a aplicação da formulação contendo extrato de <i>Ginkgo</i> <i>biloba</i> e irradiação.....	93
5.4.5.6 Grupo que recebeu a aplicação da formulação contendo associação dos extratos de chá verde e de <i>Ginkgo biloba</i> e irradiação	93
5.5 Estudos de liberação e penetração cutânea <i>in vitro</i>	97
5.5.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de CLAE para a dosagem dos flavonóides nos extratos vegetais	97
5.5.1.1 Separação dos flavonóides dos extratos vegetais	97
5.5.1.2 Pesquisa de interferentes: seletividade	99
5.5.1.3 Curvas de calibração	107
5.5.1.4 Exatidão	110
5.5.1.5 Limite de quantificação e intervalo de dosagem.....	116
5.5.1.6 Precisão	117
5.5.1.7 Dosagem dos flavonóides nos extratos vegetais de chá verde e <i>Ginkgo biloba</i> ...	118
5.5.2 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i>	119
5.5.3 Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i>	124
5.6 Avaliação da segurança por meio da avaliação da compatibilidade cutânea	127
6 Discussão.....	128
7 Conclusões	144
8 Referências Bibliográficas	147
Anexos.....	172
Anexo 1	173
Anexo 2	174
Anexo 3	175
Anexo 4	176

1 Introdução

Estudos clínicos têm demonstrado que a exposição da pele à radiação ultravioleta (UV) é responsável por alterações cutâneas relacionadas com o envelhecimento precoce, sendo que a maioria destas é resultante da ação das espécies reativas de oxigênio (EROs). Embora muitas formulações cosméticas contenham filtros UV, estes não proporcionam uma proteção total da pele, principalmente quando são considerados efeitos crônicos como o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (DAMIANI et al., 2006). Desta maneira, os antioxidantes, tais como as vitaminas e os extratos vegetais ricos em compostos fenólicos, tem sido amplamente empregados em formulações fotoprotetoras e em produtos cosméticos de uso diário para proteger a pele contra danos causados pelas EROs.

Dentre os extratos vegetais tidos como antioxidantes, os extratos de chá verde (*Camellia sinensis*) e de *Ginkgo biloba* têm sido amplamente utilizados em suplementos alimentares e em medicamentos fitoterápicos. Mais recentemente, estes extratos têm sido também propostos em produtos cosméticos, para as mais diferentes finalidades, principalmente em formulações para os cuidados da pele e produtos fotoprotetores. No entanto, até o momento, os estudos que avaliam os efeitos destes extratos na pele vêm sendo realizados após a ingestão oral (HSU, 2005; OZKUR et al., 2002), após a aplicação tópica usando solventes orgânicos como veículo (ELMETS et al., 2001) ou mesmo utilizando seus flavonóides isolados (VAYALIL; ELMETS; KATIYAR, 2003). Consequentemente, é de fundamental importância a realização de estudos que possam demonstrar os efeitos destes extratos, quando presentes em formulações tópicas, bem como a penetração cutânea e a segurança de uso destas formulações.

O chá verde é obtido das folhas da *Camellia sinensis* e tem sido utilizado visando a redução do estresse oxidativo causado pela radiação UV, uma vez que é rico em compostos altamente antioxidantes como os flavonóides: epicatequina, epigallocatequina, epicatequina galato e epigallocatequina-3-galato (EGCG). Estudos têm demonstrado que as catequinas do chá verde, possivelmente por um mecanismo de inibição de radicais livres, podem prevenir efeitos agudos e crônicos causados pela exposição solar, incluindo inflamação, imunossupressão e câncer de pele (HSU, 2005; ELMETS et al, 2001). Consequentemente, um grande número de produtos para os cuidados da pele tem incluído este extrato em sua composição (ALEXIS; JONES; STILLER, 1999).

Recentemente o extrato de *Ginkgo biloba* tem sido proposto em produtos cosméticos com finalidade anti-envelhecimento (CHIU; KIMBALL, 2003; DRAELOS, 2001) devido a sua rica composição em flavonóides (rutina, quercetina, canferol), biflavonas (bilobetina, ginkgetina, isoginkgetina) e lactonas terpênicas (ginkgolideos, bilobalideo), relacionada com suas propriedades antioxidante e antiinflamatória. Entretanto, os efeitos fotoprotetores deste extrato têm sido demonstrados somente após a administração oral prévia à exposição solar (PIETSCHMANN; KUKLINSKI; OTTERSTEIN, 1992; OZKUR et al., 2002) ou por meio de estudos *in vitro* (KIM, 2001; PINCEMAIL et al., 1989).

Desta maneira, observa-se que os extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* possuem potencial para serem empregados em formulações com finalidades fotoprotetoras. Assim, para a comprovação científica dos efeitos propostos, é necessário avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos puros, bem como os efeitos fotoprotetores *in vivo* (eritema, função barreira da pele, células de queimadura solar e hiperplasia da epiderme), de formulações de uso tópico contendo estes extratos.

Considerando que nos últimos anos houve um aumento no número de produtos contendo misturas de vários extratos vegetais com um apelo de que tal combinação poderia promover efeitos sinérgicos de proteção à pele, obtendo-se resultados mais pronunciados (HANGAY; KELEN, 2002; GILLIS; NORTON; BISHOP, 2002), torna-se de fundamental importância a realização de estudos que também avaliem a associação dos dois extratos em estudo.

Durante a etapa de desenvolvimento de um produto cosmético, contendo extratos vegetais, além da avaliação da eficácia, estudos que verifiquem a penetração cutânea devem também ser efetuados com o objetivo de analisar se os princípios ativos permanecem na pele para exercer efeitos locais ou se estes atravessam a pele com a possibilidade de chegar à circulação sistêmica, o que não é desejável para os cosméticos (THIERS; TASSEAU, 2005).

Além disso, a realização de estudos de compatibilidade cutânea é primordial para avaliar a segurança de uso de formulações cosméticas contendo extratos vegetais, principalmente porque em geral, as reações de irritação da pele, resultantes da utilização de produtos tópicos, são ligadas à penetração cutânea dos constituintes, o que é dependente da concentração destes ingredientes e da formulação cosmética utilizada como veículo.

Finalmente, os resultados desta pesquisa poderão contribuir para um melhor entendimento dos efeitos fotoprotetores dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba*, quando estes são adicionados, associados ou não, em formulações cosméticas.

2 Revisão da Literatura

2.1 Pele – aspectos gerais

A pele é o maior órgão do corpo humano com uma área de superfície de aproximadamente $1,7 \text{ m}^2$ no indivíduo adulto, o que corresponde a aproximadamente 5,5% da massa corporal (GOLDSMITH, 1990). A pele exerce diversas funções, sendo uma delas a proteção do organismo contra a radiação ultravioleta e contra as agressões mecânicas, químicas e térmicas. Além disso, sua superfície, relativamente impermeável, impede a desidratação em excesso e age como um obstáculo à invasão microbiana. A pele pode ainda ser considerada o maior órgão sensorial do corpo, uma vez que possui diversos receptores para tato, pressão, dor e temperatura. Nos humanos, a pele é o principal órgão termorregulador, exercendo tal função por meio do tecido adiposo e dos pêlos que juntos impedem a perda excessiva de temperatura, e também por meio da secreção das glândulas sudoríparas, que ao ser lançada na superfície cutânea e evaporar-se, garante a diminuição da temperatura corporal quando isso se faz necessário. A pele exerce ainda diversas funções metabólicas, pois os triglicerídeos encontrados no tecido adiposo (hipoderme) representam importante reserva de energia, enquanto que a síntese de vitamina D, que ocorre na epiderme, é indispensável para complementar a quantidade desta vitamina obtida na dieta alimentar (BECHELLI; CURBAN, 1975; HALLER, 1989).

A pele é constituída por três camadas de tecido: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1). A epiderme está estruturada por um grupo de células vivas denominado epiderme viável e por um conjunto de células mortas que formam o estrato córneo. A epiderme viável é constituída de células metabolicamente ativas que formam outras três camadas distintas: granulosa, espinhosa e basal. Em locais do organismo onde a pele é mais espessa, por exemplo, nas regiões palmar e plantar existe mais uma camada epidérmica chamada lúcida, que se localiza entre as camadas granulosa e córnea.

Figura 1. Representação das camadas da pele.

A camada basal é a mais interna e consiste de uma fileira única de células cúbicas que possuem uma alta atividade reprodutiva, tendo por função garantir a renovação da epiderme, uma vez que as células recém-produzidas migram em direção às camadas superiores, num processo em que ocorrem modificações graduais na sua forma e composição química. A camada espinhosa é formada por células volumosas e poliédricas que se encontram em fase de crescimento e no início da síntese de queratina. A camada granulosa, por sua vez, é constituída por células em seu último estágio de diferenciação, que ao serem totalmente queratinizadas, tornam-se anucleadas e perdem sua capacidade metabólica, passando a formar o estrato córneo, onde sofrem um processo de esfoliação. O estrato córneo é, então, formado por camadas extremamente coesas de corpos de células epidérmicas, os corneócitos, que desempenham o papel fundamental de proteger os tecidos vivos da perda de água, mantendo-os adequadamente hidratados. Dessa forma, a principal função desempenhada pelo estrato córneo é de funcionar como uma barreira que garante a homeostase cutânea.

Existe, portanto, um processo denominado de renovação epidérmica que consiste no deslocamento permanente e repetido de células que da camada basal atingem a superfície da epiderme, de onde se desprendem já mortas. Esse processo se completa aproximadamente em duas semanas em pessoas jovens e em torno de 37 dias em pessoas com idade superior a 50 anos, resultando em uma eliminação diária de cerca de seis a quatorze gramas de células mortas (EDWARDS; MARKS, 1995).

A derme é uma camada vascularizada de tecido conjuntivo denso fibroelástico, possuindo arteríolas e vênulas, por onde circula o sangue. Há presença de vasos linfáticos, que são responsáveis pelo transporte de substâncias formadas durante os processos metabólicos realizados na pele. Esta camada é composta por fibroblastos, glicosaminoglicanas e macromoléculas tais como o colágeno e a elastina. O colágeno presente na derme papilar aparece como uma rede de fibras finas aleatoriamente orientadas, enquanto que, na derme reticular, consiste de fibras maiores e onduladas. Já a elastina é o componente essencial das fibras que formam os tecidos elásticos, sendo extremamente insolúvel e estável quimicamente (HOLBROOK; WOLFF, 1993).

2.2 Crono e fotoenvelhecimento cutâneo

O envelhecimento tem sido definido por alguns autores como um acúmulo de modificações moleculares no organismo que resultam em manifestações clínicas macroscópicas (GIACOMONI, 1995). O envelhecimento cutâneo resulta da combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos. A ação dos fatores intrínsecos, que podem ser traduzidos como envelhecimento cronológico, resulta em afinamento da epiderme e aumento da sua fragilidade, diminuição da espessura dérmica, redução do número de fibroblastos e da sua capacidade metabólica, além de uma resposta menor a fatores de crescimento. Em geral, os tratamentos tópicos não podem evitar o envelhecimento intrínseco. Por outro lado, os fatores extrínsecos que consistem na exposição da pele a diversas agressões como radiação ultravioleta (fotoenvelhecimento), poluição atmosférica, traumatismos, fumo e metabólitos de substâncias ingeridas ou inaladas, são causadores de modificações moleculares e induzem alterações das propriedades morfológicas e biofísicas da pele causando elastose e atrofia da derme com perda de colágeno. As manifestações clínicas incluem hiperpigmentação, rugas, mudanças na textura da pele e formação de comedões (BEITNER, 2003). O envelhecimento extrínseco é um intensificador do envelhecimento cronológico, sendo esse o motivo pelo qual, áreas expostas e não expostas à radiação UV costumam apresentar aspectos muito diferentes (ENJELKE et al., 1997; STEINER, 1995).

As alterações histológicas da pele cronoenvelhecida incluem um afinamento geral da pele (LOCK-ANDERSEN et al., 1997) devido a uma atrofia da camada espinhosa e ao achatamento da junção dermo-epidérmica, resultando numa

diminuição da superfície de contato em aproximadamente 35%, o que explica a fragilidade da pele envelhecida a traumas (SAMS; MORAGAS, 1993).

Além disso, as células da camada basal apresentam-se heterogêneas em tamanho e volume (BRÉGÈRE et al., 2003), além de terem uma atividade mitótica reduzida, o que aumenta o tempo renovação epidérmica em 50% (ENGELKE et al., 1997). Esta alteração, chamada de discrasia epidérmica, é acentuada na pele fotodanificada (WEST, 1994). O processo de envelhecimento também altera o número, a morfologia e a função dos melanócitos, sendo estes melanócitos inativos mais abundantes nos folículos pilosos.

As células de Langerhans, macrófagos presentes na epiderme, também são reduzidas no envelhecimento cutâneo (BUSHAN et al., 2002) e sofrem alterações morfológicas e funcionais, diminuindo sua capacidade de capturar antígenos, o que pode explicar alterações na função imune da pele envelhecida (GREWE, 2001). Outras mudanças incluem a presença de infiltrados inflamatórios (KLIGMAN; KLIGMAN, 1986) e diminuição da circulação na derme, devido ao estreitamento dos vasos sanguíneos e linfáticos, prejudicando o fornecimento de substâncias importantes para a sobrevivência das células bem como a drenagem linfática do tecido.

A alteração microscópica mais proeminente da pele fotoenvelhecida é a substituição de fibras elásticas normais por fibras espessas, degradadas e não-funcionais, formando uma massa amorfa (KLIGMAN; KLIGMAN, 1986). Outra característica é a perda de colágeno, o que é compensado pela formação de um material elastótico compacto e uniforme. Além disso, percebe-se um enrijecimento da pele decorrente da formação de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno (WULF et al., 2004).

2.3 Danos causados pela radiação ultravioleta na pele

A radiação ultravioleta corresponde à região do espectro eletromagnético emitido pelo sol, compreendida entre os comprimentos de onda de 100 a 400nm e pode ser dividida em três regiões, levando-se em conta suas características de propagação e efeitos fisiológicos: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm). As radiações UVA e UVB têm recebido maior atenção, pois ao contrário da UVC, não são filtradas pela camada de ozônio e são suficientemente energéticas para causar danos à pele.

Os raios UVA podem atingir a derme, sendo, portanto os principais responsáveis pelo fotoenvelhecimento enquanto que os raios UVB possuem pequena penetração na pele, mas devido a sua alta energia, são os maiores responsáveis pelos danos imediatos da radiação solar e por boa parte dos danos tardios.

Quando a radiação UV incide sobre a pele, esta pode ser absorvida, refletida ou espalhada. Somente a parte absorvida produz alterações nas moléculas que a absorve, as quais são chamadas de cromóforos. As alterações sofridas pelos cromóforos da pele são denominadas reações fotoquímicas, as quais desencadeiam todas as demais reações bioquímicas que resultam em danos como: queimadura, elastose solar, fotoenvelhecimento e até mesmo, câncer de pele (PINNELL, 2003). Alguns exemplos de cromóforos incluem a melanina, os ácidos nucleicos (que formam o DNA), aminoácidos (que formam as proteínas) e o ácido urocânico.

Os danos cutâneos causados pela exposição à radiação UV podem ser classificados em agudos e crônicos. A resposta aguda consiste basicamente em inflamação (eritema, sensibilidade ao toque, edema) e bronzeamento (aumento da melanogênese) (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; TREVITHICK et al., 1992). Já a exposição crônica pode levar ao fotoenvelhecimento (WULF et al., 2004) e ao câncer de pele (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

O eritema é a alteração fisiológica mais comum provocada pela exposição ao sol, sendo resultado da inflamação ocorrida na pele. A intensidade do eritema é proporcional à quantidade de radiação absorvida pela pele, sendo que existe uma quantidade mínima de radiação abaixo da qual o eritema não é percebido, chamada de dose eritematogênica mínima (DEM), a qual depende do tipo de pele do indivíduo, do comprimento e da intensidade da onda incidente.

A radiação UVB é a maior responsável pelo aparecimento de eritema e queimaduras. A faixa UVA também ocasiona eritema, mas é necessária uma intensidade de radiação mil vezes maior que a faixa do UVB para causar o mesmo efeito. O eritema causado por UVB ocorre em duas fases distintas, sendo que a primeira inicia-se imediatamente após o início da exposição e possui duração de alguns minutos, enquanto que a fase tardia inicia-se após 3 a 4 horas, atinge o máximo em 12 a 24 horas e diminui após 72 horas da exposição (KAIDBEY; KLIGMAN, 1978).

Existem dois tipos de bronzeamento que ocorrem em resposta à radiação UV. O bronzeamento imediato é induzido pela radiação UVA que é absorvida pela melanina já formada na pele, sendo, portanto, um fenômeno que não envolve a formação de melanina ou a transferência de melanossomas para os queratinócitos (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). O bronzeamento imediato inicia-se durante a exposição à radiação e alcança o máximo no final do período de exposição, sendo que este tipo de bronzeamento será tanto mais pronunciado quanto maior for a quantidade de melanina já formada e mais intensa for a radiação UVA absorvida pela pele. Já o bronzeamento tardio inicia-se de 28 a 72 horas após a exposição e atinge o máximo em 7 dias, sendo resultado da produção de melanossomas pelos melanócitos e aumento da transferência de melanossomas para os queratinócitos.

A geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) após a radiação UVA e UVB resulta da absorção de fótons pelos cromóforos da pele, os quais passam por uma transição eletrônica a um estado excitado e sofrem reações que geram diversas EROs, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o oxigênio singlete ($^1O_2$), sendo que estes também são produzidos por neutrófilos, cujo número é aumentado na pele fotodanificada e contribuem para o estado pro-oxidante global. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é capaz de atravessar membranas celulares e, reagindo com Fe (II) leva à geração de radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) que é altamente tóxico (WLASCHEK et al, 2001). Ambos, oxigênio singlete e radical hidroxil podem iniciar a peroxidação lipídica em membranas celulares, o que leva a alterações de sua fluidez e permeabilidade (GABORIAU et al., 1993). Além disso, a radiação UV causa anormalidades em estruturas relacionadas à adesão dos corneócitos resultando em danos na função barreira da pele, o que provoca ressecamento e acelera o processo de descamação (MEGURO et al., 1999).

As EROs também estão envolvidas no processo de inflamação cutânea, em danos ao DNA (PATHAK; FITZPATRICK, 1993), em alterações nas funções celulares, bem como na depleção de sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos (PINNELL, 2003; SHINDO; WITT; PACKER, 1993), em alterações nas fibras elásticas (elastose solar) (PINNELL, 2003; RICHERT et al., 1996) e em danos em proteínas (STADMAN, 1992; SANDER, 2002; RICHERT, 1996).

As radiações UVA e UVB são absorvidas pelo DNA que sofre alterações como, por exemplo, a formação de dímeros de ciclopirimidina e de timina (YOUNG et al., 1998; KIELBASSA; EPE, 2000). Estas alterações são constantemente reparadas, porém se o dano ao genoma é muito grande, o gene p53 e algumas proteínas associadas (caspases, proteínas da família Bcl-2) induzem o queratinócito ao processo de apoptose, sendo que esta indução ocorre principalmente em resposta à produção de dímeros de timina pela radiação UVB. O último estágio da morte celular induzida por apoptose, pode ser visualizado histologicamente pela presença de células de queimadura solar, que são células apoptóticas que apresentam citoplasma eosinofílico e núcleos picnóticos (HALL et al., 1993; LU et al., 1999).

Se a mutação induzida ocorrer diretamente no gene p53, a célula pode perder o controle de qualidade de seu genoma, o que pode levar a queratose actínica e até mesmo ao câncer das camadas espinhosa ou basal (ZIEGLER et al., 1994; BALE; YU, 2001; ASZTERBAUM; BEECH; EPSTEIN, 1999).

A exposição à radiação UV também provoca uma severa hiperplasia da epiderme para repor as células danificadas, que resulta no aumento de sua espessura devido ao aumento do número de camadas celulares (EL-ABASERI; PUTTA; HANSEN, 2006). Tem sido sugerido que os processos de apoptose e proliferação estão intimamente relacionados e que a exposição crônica à radiação UV pode desregular estes dois eventos, levando ao desenvolvimento de câncer de pele (MEGURO et al., 1999; OUHTIT et al., 2000; LU et al., 1999; HENESSY et al., 2005).

As alterações histológicas que ocorrem após a irradiação por UV, incluem o espessamento do estrato córneo, formação de edema intercelular e perivascular na derme, assim como a presença de infiltrados perivasculares. A derme é preenchida com uma massa desordenada de fibras elásticas e as fibras de colágeno apresentam aspecto desordenado e coloração basofílica. As glicosaminoglicanas tornam-se proeminentes e os vasos sanguíneos dilatados e tortuosos. Há um aumento de células inflamatórias na derme e os queratinócitos tornam-se mais irregulares (LOWE et al., 1995; LAVKER et al., 1995a,b). Também ocorre um aumento de metaloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9) que são capazes de degradar as fibras de colágeno e que, por um mecanismo indireto, inibem a síntese de pró-colágeno (FISHER et al., 1996, 2000; VARANI et al., 2001; CHUNG

et al., 2001). Ocorre também depleção das células de Langerhans (LAVKER et al., 1995a,b) e alteração da morfologia e função das mesmas (GRANSTEIN, 1993).

2.4 Uso de antioxidantes em formulações fotoprotetoras

Oxidação é a transferência de elétrons de um átomo a outro e representa uma parte essencial do metabolismo aeróbio, sendo o oxigênio o último aceitor de elétrons num sistema de fluxo de elétrons que produz energia na forma de adenosina tri-fosfato (ATP). Entretanto, quando ocorre transferência de elétrons desemparelhados ou de um único elétron, ocorre geração de radicais livres. Exemplos de radicais livres centrados no oxigênio, conhecidos como espécies reativas do oxigênio (EROs), incluem superóxido ($O_2^{\bullet}$), peróxil ($ROO^{\bullet}$), alcóxil ($RO^{\bullet}$), hidroxil ($HO^{\bullet}$) e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) (PIETTA, 2000).

As EROs desempenham várias funções *in vivo*, sendo algumas positivas e relacionadas a produção de energia, fagocitose, regulação de crescimento celular e de sinalização intercelular e síntese de compostos biologicamente importantes (HALLIWELL, 1997). No entanto, as EROs podem ser extremamente danosas aos tecidos uma vez que atacam lipídeos de membranas celulares, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, causando oxidação e alteração destas moléculas, sendo que estes danos oxidativos são considerados chave nos processos de envelhecimento e de desenvolvimento de doenças como o câncer (PIETTA, 2000).

Acredita-se que a excessiva exposição da pele às EROs tem um papel importante no desenvolvimento de câncer, imunossupressão cutânea e envelhecimento prematuro (STEENVOORDEN; HENEGOUWEN, 1997; HIYACHI, 1995), sendo que esses efeitos são tipicamente observados após uma exposição crônica à radiação UV (EBERLEIN-KÖNIG; PLACZEK; PRYBILLA, 1998).

A pele possui um conjunto de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos que atuam protegendo os espaços intra e extracelulares. As enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase neutralizam o peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos usando a glutathione. A catalase reage com o peróxido de hidrogênio e é um importante antioxidante em peroxissomos. A superóxido dismutase-Cu-Zn e a superóxido dismutase-Mg protegem as células contra o radical superóxido. Antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a glutathione presente no compartimento celular, a vitamina E, presente nas membranas celulares e o ubiquinol, presente nas mitocôndrias (PODDA; GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

Considerando que a proteção da pele fornecida pelos filtros solares parece ser insuficiente contra as EROs (DAMIANI et al., 2006) e que a quantidade dos antioxidantes endógenos sofre redução brusca após a exposição à radiação UV (SHINDO; WITT; PACKER, 1993), a aplicação tópica de formulações contendo antioxidantes tem sido considerada uma interessante solução para proporcionar uma fotoproteção cutânea mais ampla.

Dentre as substâncias ativas com atividade antioxidante empregadas em produtos cosméticos, pode-se destacar as vitaminas, principalmente a C e a E, os flavonóides isolados e os extratos vegetais que contém alta concentração de polifenóis.

A vitamina C tem apresentado papel importante na neutralização de radicais livres, podendo assim, evitar os danos que estes poderiam causar. Sua atividade se deve à capacidade de capturar as EROs protegendo assim a membrana celular dos processos degenerativos. É eficaz na eliminação das espécies de oxigênio singlete, superóxido, hidroxil, peroxil e ácido hipocloroso (SHAPIRO; SALIOU, 2001), o que pode trazer vários benefícios à pele, tais como a prevenção de danos causados pela radiação solar e a melhoria das condições da pele fotoenvelhecida. Esta vitamina está presente na superfície da pele e na derme, porém, após a exposição à radiação UV os seus níveis são diminuídos bruscamente (PODDA et al. 1998; FOX, 1995).

A vitamina E (alfa-tocoferol) tem sido descrita como o mais importante antioxidante lipossolúvel presente na membrana celular (RANGARAJAN; ZATZ, 1999; IDSON, 1993; DARR et al., 1996), atuando na inibição de eritema, redução de células de queimadura solar (DARR et al., 1996), redução de danos ao colágeno, inibição da geração de radicais superóxido e da peroxidação lipídica (BISSET; HILLERBRAND; HANNON, 1989; BISSET; CHATTERJEE; HANNON 1990). Gaspar e Maia Campos (2003) observaram que a aplicação tópica de uma formulação fotoprotetora contendo 5% de acetato de alfa-tocoferila reduziu o número de células de queimadura solar após a irradiação UVA/UVB da pele de camundongos sem pêlo.

Os flavonóides foram descobertos em 1930, pelo ganhador do prêmio Nobel de Medicina Szent-György, que extraiu a citrina da casca do limão, a qual possuía a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares sanguíneos. Assim, esta classe de produtos naturais foi inicialmente denominada como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C2, visto que algumas das substâncias

pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém, dada a não confirmação destas substâncias como vitaminas, esta classificação foi abandonada em 1950 (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Estes compostos podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários que geralmente ocorrem nas plantas na forma glicosilada e participam da fotossíntese na fase dependente de luz, durante a qual catalisam o transporte de elétrons. Além disso, desempenham o papel de sinalizadores visuais (devido a suas cores atrativas) para polinizadores, de sistemas de defesa contra predadores (devido a propriedades adstringentes) e contra agentes oxidantes, como por exemplo, a radiação solar.

A estrutura básica dos flavonóides consiste de um núcleo contendo 15 carbonos arranjados em 3 anéis (C6-C3-C6) denominados A, B e C (Figura 2). As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C, enquanto que compostos de uma mesma classe diferem entre si pelo padrão de substituição dos anéis A e B. Dentre as muitas classes de flavonóides, as que mais se destacam são: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis (dihidroflavonóis), flavanóis (flavan-3-óis) e antocianidinas, sendo esta subdivisão baseada nas diferenças encontradas no anel C. Outras classes de flavonóides incluem biflavonas, chalconas e auronas.

Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os flavonóides inibem enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, como a xantina oxidase (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994) e a proteína kinase-C (URSINI et al., 1994). Além disso, inibem as enzimas ciclooxygenase, lipoxigenase, glutathione S-transferase e NADH oxidase, as quais também estão envolvidas na produção de EROs (KORKINA; AFANAS'EV, 1997; BROWN et al., 1998). Alguns flavonóides atuam quelando metais que desempenham um papel importante no metabolismo do

oxigênio, tais como ferro e cobre, os quais aumentam a formação de EROs, atuando na redução do peróxido de hidrogênio com a geração de radical hidroxil e na oxidação da lipoproteína de alta-densidade (PIETTA, 2000).

Devido ao seu baixo potencial redox, os flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres como o superóxido e os radicais peroxil, alcoxil e hidroxil, por meio da doação de elétrons a estes radicais (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988; PIETTA, 2000). Essa reação transforma os flavonóides em radical aroxil, que reagindo com um segundo radical livre forma uma quinona estável (Figura 3).

Figura 3. Mecanismo de redução de radicais livres pelos flavonóides.

A atividade antioxidante de um flavonóide depende de sua estrutura e de seus substituintes nos anéis B e C (BORS et al., 1990), sendo que os maiores determinantes para esta atividade são: a presença de um grupo catecol no anel B, o que aumenta a propriedade doadora de elétrons e a presença de ligação dupla nas posições 2 e 3 do anel C, conjugada com o grupo 4-oxo, formando uma enona, que é responsável pela deslocalização de elétrons. Estes e outros fatores explicam as diferenças de atividade antioxidante entre as diferentes classes de flavonóides (PIETTA, 2000).

Além da ampla utilização de flavonóides em suplementos alimentares, estes compostos têm sido também empregados em produtos cosméticos, apresentando destaque, as isoflavonas da soja, as catequinas do chá verde (principalmente a EGCG), a silimarina (que é uma mistura de três flavonóides principais: silibina, silidianina e silicristina da planta *Silybum marianum*) e o resveratrol (extraído de casca de *Vitis vinifera*) (CHIU; KIMBALL, 2003; PINNELL, 2003; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; DRAELOS, 2001).

Uma outra opção em produtos cosméticos tem sido aliar os efeitos antioxidantes de flavonóides com o apelo natural de extratos de plantas, sendo assim muitos produtos com finalidade anti-envelhecimento e/ou fotoprotetora tem incluído em sua composição extratos vegetais ricos em flavonóides. Dentre estes extratos, os de chá verde (que contém alto teor de catequinas) e de *Ginkgo biloba* (que contém principalmente quercetina, rutina, canferol e biflavonas) tem se destacado devido a sua grande popularidade uma vez que já são tradicionalmente utilizados como suplementos alimentares e como medicamentos fitoterápicos.

2.5 Extratos vegetais em produtos cosméticos

O uso de produtos vegetais para fins de embelezamento tem referências de 5000 anos atrás (VALFRÉ, 1990). As primeiras farmacopéias e formulários de produtos surgiram no Egito, destacando-se entre elas o *Papirus Ebers*, que continha centenas de fórmulas e remédios populares à base de plantas para cuidados de saúde, higiene e beleza (DE POLO, 1998).

Mais recentemente, o uso de extratos e óleos vegetais em produtos cosméticos industrializados teve início a partir do desenvolvimento de técnicas de extração que permitiram o uso de tais derivados sem que houvesse o comprometimento da qualidade do produto final (ABURJAI; NATSHEH, 2003).

Assim, as matérias-primas de origem vegetal foram inicialmente utilizadas, principalmente, em xampus, tinturas e pomadas, e posteriormente, sua aplicação estendeu-se também para cremes, loções, géis e produtos para banho em geral (ABURJAI; NATSHEH, 2003; CORAZZA et al., 1995), sendo que o objetivo principal era atrair a atenção do consumidor, utilizando um apelo de marketing natural. Além disso, em função do alto custo, tais matérias-primas eram utilizadas em baixas concentrações e não havia uma preocupação específica com a comprovação de seus efeitos.

Dentre as múltiplas disciplinas de áreas do conhecimento científico que se correlacionam com a Cosmetologia, a Farmacognosia, ou mais especificamente, a Fitocosmética, tem ocupado lugar de destaque, sendo um segmento da ciência cosmética que se dedica ao estudo e à aplicação dos conhecimentos da ação de princípios ativos e extratos de origem vegetal, em proveito da higiene, da estética, da correção e da manutenção de um estado normal e sadio da pele (VALFRÉ, 1990).

Embora tenha ocorrido um grande empenho científico e tecnológico, para aumentar a credibilidade na utilização de produtos de origem vegetal, existem ainda muitas questões a serem esclarecidas referentes à comprovação científica dos efeitos que têm sido atribuídos aos diferentes extratos. Ainda assim, a obtenção de matérias-primas de origem vegetal e a aplicação destas em produtos cosméticos, tem tido um grande crescimento, em função do sucesso destas formulações junto ao mercado consumidor que busca cada vez mais produtos que aproveitem os benefícios que a natureza proporciona.

A título de exemplos, extratos como os de *Aloe vera* (DAL BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006), aveia e malva tem sido utilizados com finalidade hidratante. Outros, como os extratos de camomila e calêndula são utilizados devido a suas propriedades antiinflamatórias e antialérgicas (ABURJAI; NATSHEH, 2003). Já o extrato de hamamélis, possui um alto teor de taninos, sendo assim tem sido aplicado com finalidade adstringente (VALFRÉ, 1990; TÈRAN, 1990). Além disso, muitos óleos de origem vegetal têm sido incorporados em cosméticos com a finalidade principal de conferir emoliência à pele; entre eles os que mais tem se destacado são os óleos de: abricó, germe de trigo, macadâmia, abacate, cenoura, jojoba, rícino, semente de uva, buriti, maracujá, rosa mosqueta (ABURJAI; NATSHEH, 2003; OLIVEIRA; BLOISE, 1995), e mais recentemente os óleos derivados de plantas da biodiversidade brasileira (OLIVEIRA, 2003; SILVA, 2002).

O emprego de extratos vegetais na tentativa de proteger a pele contra o fotoenvelhecimento vem crescendo muito nos últimos anos uma vez que muitos destes extratos apresentam substâncias com alto potencial antioxidante que poderiam neutralizar os radicais livres produzidos na pele após a exposição à radiação UV (CHIU; KIMBALL, 2003; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; KIM et al., 2002, AQUINO et al., 2002, BONINA et al., 2000). Dentre estes extratos, os de chá verde e de *Ginkgo biloba* se destacam pela grande popularidade e pelos seus efeitos antioxidantes.

2.5.1 Chá verde

O chá é obtido das folhas da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (Figura 4A), planta nativa da China e da Índia, cujo nome significa camélia chinesa. Esta planta dá origem a quatro variedades de chás: branco, verde, oolong e preto, sendo uma bebida popular consumida no mundo todo devido a seu sabor característico e

seus efeitos benéficos à saúde. Da produção total cerca de 78% é consumido na forma de chá preto e 20% na forma de chá verde (HSU, 2005).

Os quatro tipos de chá são distinguíveis pelo seu processamento, que confere um sabor diferenciado. A *Camelia sinensis* é um arbusto cujas folhas que se não são rapidamente secas depois de colhidas, rapidamente começam a oxidar. Assim, as diferentes variedades diferem entre si quanto ao grau de oxidação de seus compostos, processo também chamado de fermentação, embora este termo não reflita a realidade, pois tal processo não envolve ação microbiológica, mas apenas a ação da enzima catecol oxidase, presente naturalmente na planta, que oxida seus constituintes principais, flavanóis chamados de catequinas.

O preparo das folhas para a comercialização dos diferentes chás é feito por beneficiamento ou manufatura, por meio de uma série de operações que visam ao desenvolvimento do aroma e do sabor que conferem as características peculiares da infusão. O processo inicia-se pelo murchamento das folhas verdes, logo após a colheita, espalhando-as em camadas finas sobre bandejas, dispostas em prateleiras para facilitar a passagem do ar, provocando uma perda de umidade de 75% para em torno de 55%. Em seguida, inicia-se o enrolamento, também denominado de maceração, que é feito em máquinas contendo um rolo compressor que rompe os tecidos e comprime e enrola as folhas. O tempo de enrolamento varia de acordo com o tipo de chá desejado. Após o enrolamento, as folhas são levadas para uma sala escura e são espalhadas em finas camadas, para o início do processo dito fermentação, onde as folhas mudam de cor e tomam uma cor forte de cobre. Por fim, ocorre a tostagem, que seca o chá e interrompe a fermentação (GUTIERREZ, 2007).

O chá branco é obtido a partir de folhas jovens e dos botões que apresentam uma coloração branca. Este chá sofre somente um processo de secagem e não passa pelos demais processos, e, portanto não é fermentado. Já o chá oolong sofre um processo fermentativo parcial enquanto que o chá preto apresenta um alto grau de oxidação, sendo que as catequinas são oxidadas e transformadas principalmente em teaflavinas e tearrubiginas (MUTHUMANI; KUMAR, 2007).

O chá verde também não sofre fermentação e provém das folhas que são tratadas com vapor (método japonês) ou dispostas em bandejas quentes (método chinês) para inativar a catecol oxidase. Após este processo, as folhas sofrem enrolamento (Figura 4B).

A composição polifenólica do chá verde (20 a 40% do peso seco) é similar a das folhas frescas, sendo que os constituintes principais são flavanóis, também chamados de catequinas (ALEXIS; JONES; STILLER, 1999; HSU, 2005).

Figura 4. Folhas frescas da *Camellia sinensis* (A) e chá verde (B).

Os derivados catequínicos predominantes do chá verde são: a epicatequina (E), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina-3-galato (EGCG), sendo esta última o derivado mais abundante (Figura 5).

Figura 5. Estruturas químicas das principais catequinas do chá verde. A: epicatequina; B: epigalocatequina; C: epicatequina galato e D: epigalocatequina-3-galato (EGCG).

Inúmeros efeitos têm sido descritos para o extrato de chá verde, bem como para seus derivados catequínicos isolados. Dentre esses efeitos, os que mais se destacam para aplicação cosmética/dermatológica e que podem explicar possíveis efeitos na fotoproteção cutânea incluem efeitos antioxidantes, imunomoduladores e protetores do DNA.

Katiyar, Agarwal e Muktar (1994) investigaram a habilidade antioxidante das catequinas usando como marcador a ocorrência de lipoperoxidação. Nesse estudo verificou-se que EGCG, EGC e ECG inibiram a lipoperoxidação espontânea e a induzida pela radiação UV em microsomas de células epidérmicas de ratos. Em outro estudo, EGCG foi dado oralmente a ratos durante um mês, o que provocou inibição de danos causados em lipídeos hepáticos após a exposição à radiação gama (UCHIDA et al., 1992).

Estudos indicam que a liberação de citocinas após radiação UVB tem um importante papel na imunossupressão e pode ser um fator de crescimento de tumores de pele induzidos por UVB. O efeito imunossupressor de IL-10 pode ser um possível mecanismo pelo qual os tumores escapam do sistema imune.

A aplicação tópica de EGCG antes da exposição à radiação UVB resulta em diminuição da produção de IL-10, o que sugere um possível mecanismo pelo qual EGCG previne a imunossupressão cutânea (KATIYAR et al., 1999). Além disso, EGCG estimula a produção de IL-12, citocina que atua na prevenção da imunossupressão (KATIYAR et al., 1999).

A indução de danos ao DNA pela radiação UV se dá principalmente na forma de dímeros de ciclobutano pirimidinas (CPDs) que exercem papel essencial na indução de câncer e na imunossupressão. CPDs são formados rapidamente quando moléculas de DNA são submetidas à radiação UVB e um acúmulo desses dímeros resulta em mutações em genes críticos como o p53, o que contribui no desenvolvimento de câncer de pele.

A aplicação tópica de catequinas na pele humana antes da exposição à radiação UV resultou numa inibição dose dependente da formação de CPDs. Este efeito também representa um possível mecanismo de prevenção da imunossupressão cutânea (KATIYAR; PEREZ; MUKHTAR, 2000).

Zhao et al. (1999a) demonstraram que a administração oral e tópica de chá verde antes e durante o tratamento de psoríase pela aplicação de psoralenos seguida de radiação UVA, levou a uma redução da hiperplasia, edema e eritema em

pele animal. No mesmo estudo, a aplicação de extrato de chá verde em pele reconstituída artificialmente diminuiu danos ao DNA.

Os danos causados na pele após a exposição à radiação UV são mediados em parte pela liberação de EROs após a exposição à radiação. As catequinas podem atuar na fotoproteção cutânea uma vez que estes compostos neutralizam as EROs. Além disso, o extrato de chá verde possui efeito antiinflamatório, o que resulta na diminuição dos efeitos agudos como edema e imunossupressão.

Um estudo de Elmetts et al. (2001) verificou o efeito da aplicação tópica de uma solução hidroalcóolica de extrato de chá verde em diferentes concentrações e de quatro catequinas isoladas na diminuição dos efeitos da radiação UV em voluntários humanos. Como resultado obteve-se uma redução significativa do eritema com a aplicação do extrato, sendo essa redução dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração do extrato aplicada maior foi o efeito obtido. Para excluir a possibilidade do extrato de chá verde estar atuando meramente como um fotoprotetor químico, no mesmo estudo foram realizadas análises espectrofotométricas. Observou-se uma absorbância máxima em 273nm, constatando-se que o extrato não absorvia na faixa de comprimento de onda do UVB. Sendo assim, a proteção contra o eritema foi devido a um mecanismo diferente da simples absorção da radiação UV. Na avaliação histológica, o extrato reduziu o número de células de queimadura solar em relação ao controle, além de proteger as células de Langerhans e diminuir o dano ao DNA. Comparando-se o extrato com as catequinas isoladas, verificou-se que o extrato foi mais efetivo na proteção contra o eritema, sendo que os derivados contendo o grupo galoil na posição 3 da molécula (EGCG e ECG) foram os mais eficientes na inibição do eritema, enquanto que o EGC e EC praticamente não apresentaram efeito. Esse resultado destaca a importância de estudos que avaliem formulações de uso tópico contendo o extrato vegetal, uma vez que o efeito final é resultante de um efeito sinérgico de todos os seus constituintes.

Em outro estudo, a aplicação tópica de um creme contendo catequinas na pele de camundongos sem pêlo antes da exposição à radiação UVB preveniu a depleção de enzimas antioxidantes endógenas como a glutathione peroxidase, catalase, bem como reduziu a lipoperoxidação e a oxidação de proteínas (VAYALIL; ELMETS; KATIYAR, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado que as catequinas apresentam efeitos inibitórios na indução e na atividade das MMPs, enzimas que desempenham papel importante no envelhecimento cutâneo (AN et al., 2005; LEE; CHUNG; CHO, 2005). Outros estudos destacam que as catequinas do chá verde estimulam a diferenciação e proliferação de queratinócitos (CHUNG et al., 2003; ECKERT et al., 2006).

Um estudo de Syed et al. (2004) avaliou os efeitos anti-envelhecimento da aplicação tópica de um gel hidrofílico contendo EGCG, a catequina majoritária presente no chá verde, na pele de voluntárias durante quatro semanas. A avaliação clínica, feita por dermatologistas mostrou uma melhora de textura e aparência da pele em 45% das voluntárias que aplicaram o gel aditivado. Outro estudo realizado por Chiu et al (2005) avaliou os efeitos na pele de voluntárias que receberam uma associação de suplementação oral e aplicação tópica de um creme contendo 10% de extrato de chá verde. Após a análise histológica observou-se um aumento estatisticamente significativo do tecido elástico do grupo tratado com este extrato em comparação ao grupo que recebeu o placebo, porém não foram observados efeitos subjetivos, nem efeitos clínicos qualitativos na redução de rugas e na hidratação da pele.

2.5.2 *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba (Linné) é uma árvore de origem chinesa, sendo a única planta vivente da família Ginkgoaceae. Alguns fósseis da espécie possuem idade aproximada de 250 milhões de anos, sendo por esse motivo, referida por Darwin como um “fóssil vivo” (MAJOR, 1967). Curiosamente, possui forte resistência a uma grande quantidade de pragas e fungos, o que contribui para sua longevidade (GOLD et al., 2002). Foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão, Engelbert Kaelmpter, por volta de 1690, mas apenas despertou o interesse de pesquisadores após a Segunda Guerra Mundial, quando perceberam que a planta tinha sobrevivido à radiação em Hiroshima, brotando no solo da cidade devastada. A palavra ginkgo tem origem chinesa (ginkyo: 銀杏) e significa damasco prateado enquanto que a palavra biloba vem do formato bilobado das folhas desta planta (DIAMOND et al., 2000) (Figura 6).

Figura 6. Folhas frescas do *Ginkgo biloba*.

O extrato seco padronizado das folhas para uso em fitoterápicos (patenteado como Egb-761) contém 24% de flavonóides, 7% de proantocianidinas e 6% de terpenóides, 13% de ácidos carboxílicos e 2% de catequinas. Os flavonóides incluem canferol e quercetina conjugados com glicose ou rhamnose e biflavonas (ginkgetina, isoginkgetina). A fração terpênica consiste em lactonas diterpênicas (ginkgolideos A, B, C, J e M), e sesquiterpênicas como o composto bilobalídeo (VAN BEEK, 2002; MACLENNAN; DARLINGTON; SMITH, 2002) (Figura 7)

Figura 7. Estruturas químicas dos principais compostos presentes no extrato de *Ginkgo biloba* A: quercetina, canferol e rutina; B: ginkgolideos (lactonas diterpênicas); C: ginkgetina (biflavona).

O extrato de *Ginkgo biloba* tem sido usado tradicionalmente como fitoterápico para prevenção e tratamento de arteriosclerose, problemas de memória, demência, doença de Alzheimer, vertigens e cefaléia (MAHADY, 2001). Esses efeitos estão relacionados à alta atividade antioxidante de seus flavonóides e de suas lactonas diterpênicas (ginkgolideos), sendo que estas últimas atuam mais em regiões hidrofóbicas, como por exemplo, em membranas celulares (SCHOLTYSSSEK et al., 1997).

Seus compostos antioxidantes atuam bloqueando a ação de radicais livres como o ânion superóxido, o radical hidroxil (GARDÈS-ALBERT et al., 1993), o radical peróxido (MAITRA et al., 1995) e o radical óxido nítrico (MARCOCCI et al., 1994). Atuam também indiretamente via diminuição da formação de radicais livres ao inibir a atividade ou expressão de enzimas que catalisam a geração desses radicais ou então pelo aumento da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a heme-oxigenase, a superóxido dismutase mitocondrial e a glutathione peroxidase (GOHIL et al., 2000; RIMBACH et al., 2001; CHEN et al., 2001).

Recentemente o extrato de *Ginkgo biloba* tem sido proposto em diferentes produtos cosméticos, principalmente em produtos antienvhecimento (CHIU; KIMBALL, 2003; DRAELOS, 2001) e solares, devidos a sua rica composição em flavonóides. No entanto, os efeitos protetores contra a radiação UV deste extrato apenas foram demonstrados após sua ingestão oral (PIETSCHMANN; KUKLINSKI; OTTERSTEIN, 1992; OZKUR et al., 2002) ou por estudos *in vitro* (KIM, 2001; PINCEMAIL et al., 1989).

Alguns estudos destacam que a ação antioxidante do *Ginkgo biloba* pode ser empregada na tentativa de proteger a pele contra danos causados pela radiação UV na pele. O primeiro desses trabalhos foi realizado por Pietschmann, Kuklinski e Otterstein (1992) que avaliaram os efeitos da ingestão oral do extrato de *Ginkgo biloba* em comparação com outros antioxidantes após indução de estresse oxidativo por radiação UV em voluntários humanos. Verificou-se que após 14 dias de suplementação oral, houve redução do estresse oxidativo após uma segunda exposição à luz solar, sendo o *Ginkgo biloba* mais efetivo do que o beta caroteno e o alfa tocoferol.

Num estudo realizado por Ozkur et al. (2002), foi observado que a ingestão do extrato de *Ginkgo biloba* imediatamente após e cinco dias previamente à irradiação (UVB) da pele de camundongos, promoveu proteção da superóxido dismutase

(SOD), enzima cuja atividade é reduzida após radiação, assim como protegeu contra a peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle irradiado. Aricioglu et al. (2001) também avaliou os efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* na atividade da SOD após a exposição à radiação UVB e verificou que o tratamento com este extrato aumentou a atividade desta enzima.

Um dos componentes do extrato de *Ginkgo biloba* é uma isoflavona denominada genisteína (4',5,7-triidróxi-isoflavona), a qual tem sido relatada por possuir efeitos antioxidantes e anticarcinogênicos na pele (WEI et al., 1993; WEI et al., 1998; MILLER; HALE; PENTLAND, 1994). A genisteína também possui grande potencial na redução do edema inflamatório induzido pela radiação UV (WIDYARINI et al., 2001).

Outros estudos têm destacado a atividade antiinflamatória deste extrato na pele, graças à presença de biflavonas (ginkgetina, isoginkgetina) que inibem a produção de prostaglandinas E2, mediada em parte pela redução da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (LIM et al., 2006; KWAK et al., 2002).

Outra possível aplicação do extrato de *Ginkgo biloba* em produtos cosméticos com finalidade anti-envelhecimento seria devido ao fato de que este extrato estimula a síntese de colágeno. Um estudo de Kim et al. (1997) demonstrou efeitos *in vitro* do extrato de *Ginkgo biloba* e de seus flavonóides isolados (quercetina, canferol, sciadopitisina, ginkgetina, isoginkgetina) na proliferação de fibroblastos *in vitro* e na produção de colágeno e fibronectina.

Analisando-se todos os dados da literatura apresentados, verifica-se que os extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* possuem propriedades interessantes que podem ser aplicados em formulações fotoprotetoras e em produtos para os cuidados da pele, desde que sejam realizados estudos quando esses extratos forem veiculados em formulações tópicas, ou seja, estudos que mimetizem as reais condições de uso.

2.6 Avaliação dos efeitos fotoprotetores de formulações cosméticas

As características biológicas, mecânicas e funcionais da pele podem ser avaliadas por técnicas de Biofísica que permitem a análise rigorosa de determinadas variáveis por métodos objetivos e não-invasivos, sendo possível mensurar estas variáveis com grande confiabilidade e simplicidade de operação (ROGIERS, 1996).

Exemplos claros das possíveis análises incluem a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, do conteúdo sebáceo, do micro-relevo cutâneo, da perda transepidérmica de água, do índice de eritema, da anisotropia da pele, do pH, das propriedades mecânicas, dentre outros.

As técnicas de Biofísica têm sido empregadas tanto na pele de animais quanto na pele humana em estudos envolvendo formulações fotoprotetoras *in vivo*, sendo que as medidas de perda transepidérmica de água, a qual está relacionada com a função barreira da pele; e de eritema, resultado da inflamação após a radiação UV, tem sido as mais utilizadas (MAIA CAMPOS et al., 2006; HEINRICH et al., 2006; BONINA et al., 2005; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

A integridade da função barreira do estrato córneo após a radiação UV pode ser facilmente monitorada utilizando a medida da perda transepidérmica de água (do inglês *transepidermal water loss* – TEWL), que representa a evaporação de água na superfície da pele. Esta medida é baseada no princípio de difusão de Fick, o qual está relacionado à pressão formada pela difusão da água no eletrodo do equipamento. Assim, quanto maiores os valores de TEWL, expressos em g/m².h, pior pode ser considerada a função barreira da pele.

Meguro et al. (1999) observaram um aumento da TEWL após a radiação UVB em camundongos sem pêlo devido a um enfraquecimento dos segmentos das lamelas intercelulares do estrato córneo, resultado da redução na secreção de corpos lamelares e de enzimas responsáveis pela formação dos lipídeos que compõem a barreira cutânea.

A avaliação do eritema induzido pela radiação UVB também tem sido bastante utilizada para avaliar a efetividade de uma formulação fotoprotetora (PATHAK; FITZPATRICK, 1993), utilizando-se dois princípios diferentes: o espectrofotométrico (absorção e reflexão em três comprimentos de onda) e o índice L*a*b (determinação das cores azul, vermelha e verde refletidas) (FULLERTON et al., 1996).

O método espectrofotométrico baseia-se no fato da hemoglobina presente nos vasos sanguíneos da derme ser o maior cromóforo da luz verde. Quando o conteúdo de sangue do plexo subpapilar aumenta, resultando em eritema, uma grande quantidade de luz verde é absorvida e consequentemente uma menor quantidade desta é refletida, enquanto que a quantidade de luz vermelha absorvida e refletida apresenta pouca alteração. Sendo assim é obtido um índice comparando-

se a quantidade de luz vermelha e verde refletidas (LAHTI et al., 1993; FULLERTON et al., 1996).

Dentre as etapas relacionadas à pesquisa de novos produtos cosméticos, além das técnicas de Biofísica, a avaliação histológica dos efeitos de substâncias ativas no tecido cutâneo também apresenta grande importância, uma vez que pode orientar a indicação de uso das formulações, evidenciar possíveis efeitos indesejáveis e ainda auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia.

Os estudos histopatológicos e histométricos podem também auxiliar na avaliação dos danos causados pela radiação UV na pele e da proteção contra estes danos com a aplicação de substâncias ativas, uma vez que permitem a análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares (MAIA CAMPOS et al., 2006; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003). Assim, estas técnicas têm sido consideradas adequadas para a avaliação de efeitos fotoprotetores *in vivo*.

A análise histopatológica consiste na observação visual de biópsias ao microscópio óptico e permite a avaliação qualitativa das diversas estruturas presentes no tecido cutâneo. A coloração dos cortes histológicos com hematoxilina e eosina permite a descrição das fibras colágenas que após a exposição à radiação UV tornam-se atroficas e fragmentadas. Pode-se também verificar a presença de infiltrados inflamatórios na derme e a hiperplasia da epiderme (SOTER, 1990).

A histopatologia, por ser uma análise qualitativa, deve ser complementada pela histometria, por meio da qual é possível quantificar os efeitos observados na análise qualitativa, tais como a espessura da epiderme e da derme. Assim, os estudos histométricos possibilitam a aplicação de testes estatísticos para analisar se as alterações observadas são estatisticamente significativas em relação ao controle.

Vários estudos que avaliam substâncias ativas com finalidade fotoprotetora têm realizado a quantificação da hiperplasia da epiderme induzida pela radiação UV, por meio da medida da espessura da epiderme viável e da contagem de camadas de células nucleadas desta camada (LU et al., 1999; EL-ABASERI; PUTTA; HANSEN, 2006).

Para a determinação do mecanismo de ação de diversas substâncias naturais e sintéticas na fotoproteção, vários estudos têm utilizado modelo animal, sendo que o camundongo sem pêlo tem se apresentado um modelo útil para tal finalidade, uma vez que mimetiza os efeitos da radiação UV na pele humana. Os efeitos da radiação

UV na pele do camundongo sem pêlo são muito bem descritos na literatura (LU et al., 1999), sendo que os processos de apoptose e proliferação celular (hiperplasia) vêm sendo bastante utilizados para a avaliação da atividade fotoprotetora de diferentes substâncias ativas e de extratos vegetais (ALCARAZ et al., 1999; TREVITHICK et al., 1992; REAGAN-SHAW et al., 2004; FASEKAS et al., 2003; ZHAO et al., 1999a,b; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; DARR et al., 1996; LEE et al., 2003). Assim, a contagem de células de queimadura solar, identificadas na epiderme como sendo queratinócitos contendo núcleo pequeno e denso e citoplasma eosinofílico, também é um marcador bastante utilizado para avaliação da fotoproteção da pele (BRASH, 1997; DARR et al., 1996).

Considerando a necessidade de realização destas metodologias tradicionais, além das técnicas não-invasivas (Biofísica), para a avaliação da eficácia fotoprotetora *in vivo*, tais estudos devem ser realizados mediante a aprovação de um comitê de ética no uso de animais, com base em três princípios éticos fundamentais: refinamento, que visa à redução da dor e do sofrimento animal; redução, que se refere à incorporação de técnicas e abordagens que reduzam o número de animais utilizados e substituição, buscando a utilização de métodos que permitam a obtenção de resultados científicos sem a utilização de animais.

2.7 A pele e estudos de liberação e penetração cutânea

Uma das principais funções da pele é a de exercer uma barreira nos dois sentidos, evitando a perda de água, eletrólitos, e outros constituintes do corpo humano e impedindo, na medida do possível, a penetração de moléculas do ambiente. Esta função barreira, entretanto, não é infalível e é esta permeabilidade relativa que favorece a passagem das substâncias através da pele (DUBERTRET et al., 2001; LAFFORGUE; MARTY, 2007).

A principal barreira para a penetração de substâncias na pele é o estrato córneo, o qual pode ser descrito como uma “parede de tijolos”, onde as células queratinizadas (corneócitos) são embebidas numa matriz lipídica, organizada em bicamadas e composta por ceramidas (45-50%), colesterol (25%), ácidos graxos (10-15%), além de outros lipídeos (5%). Cada corneócito é envolvido por um envelope protéico, composto por várias proteínas estruturais, tais como a involucrina e a loricrina. A parte interior desse envelope é preenchida por filamentos de queratina enquanto que a superfície é preenchida por ceramidas de longa cadeia

(hidroxiceramidas), formando o envelope lipídico (MADISON, 2003). Dessa forma, a composição do estrato córneo e a disposição dos corneócitos e da matriz lipídica criam um caminho tortuoso, sendo por isso considerado a principal barreira à penetração de substâncias.

A passagem de uma molécula através da pele pode ser desejável quando se tratar de uma molécula que possui ação terapêutica seja topicamente ou sistemicamente. A passagem através da pele, no entanto, não é desejável para os outros constituintes da formulação de um medicamento que é administrado pela pele (DUBERTRET et al, 2001).

A absorção percutânea é o processo que em termos gerais descreve a passagem de um composto através da pele. Esse processo pode ser subdividido em três passos (OMS, 2005):

- penetração: entrada de uma substância numa camada cutânea particular ou estrutura, como por exemplo, a entrada de um composto no estrato córneo;
- permeação: penetração de uma substância de uma camada cutânea para outra, a qual é estruturalmente e funcionalmente diferente da primeira camada;
- reabsorção: captura da substância pelo sistema vascular (vasos sanguíneos e/ou linfáticos).

As moléculas ativas, das quais se deseja a passagem, raramente são isoladas, pois se encontram geralmente numa formulação que, segundo o caso, pode ser um creme, uma pomada, um gel, etc. Assim, antes da fase de contato entre a molécula e a superfície da pele, a substância ativa deve deixar o seu veículo para penetrar no estrato córneo, com mais ou menos facilidade, o que é caracterizado pelo coeficiente de partilha (K_m). A fase que segue consiste num preenchimento do estrato córneo onde se observa concentrações decrescentes da molécula em direção às camadas mais profundas. Este preenchimento é caracterizado por sua grande velocidade: as quantidades difundidas dependem da afinidade da molécula pelo estrato córneo. A fase seguinte corresponde ao fenômeno de absorção percutânea propriamente dito, onde se estabelece um fluxo constante de certa quantidade da molécula presente no estrato córneo. Este fluxo é proporcional à diferença de concentração da substância nesta camada da pele e é caracterizado pelo coeficiente de permeabilidade (K_p). Uma vez que a molécula chega à epiderme, esta pode alcançar também a derme superficial, podendo sofrer um metabolismo local ou difundir mais amplamente (DUBERTRET et al, 2001).

Anatomicamente, duas vias distintas estão disponíveis para a penetração cutânea: por meio dos anexos cutâneos (folículos pilo-sebáceos e/ou glândulas sudoríparas) ou pelo estrato córneo: através dos espaços intercelulares do estrato córneo (via intercelular) ou através dos corneócitos propriamente ditos (via transcelular) (Figura 8). A penetração não se efetua unicamente por uma das vias, ambas participam do fenômeno e a penetração global é a resultante da passagem através do estrato córneo e da passagem através dos anexos cutâneos (MARTY, 2000).

Figura 8. Esquema representando as vias de penetração de substâncias no estrato córneo. (TAVEIRA, 2007).

A penetração cutânea depende de três fatores principais e indissociáveis: a pele, o princípio ativo e o veículo. Em relação à pele, numerosos fatores podem alterar a absorção cutânea: a integridade do tecido, a idade, o fluxo sanguíneo, a região (espessura da camada córnea) a superfície de aplicação, a duração de contato entre o local de aplicação e o produto, a hidratação e a temperatura.

A penetração de um princípio ativo na pele depende fortemente das suas características físico-químicas: coeficiente de partilha e solubilidade (afinidade do princípio ativo com o seu veículo e com a camada córnea), massa molecular, estado de ionização da molécula, estabilidade e concentração do princípio ativo no veículo.

A liberação do princípio ativo de uma formulação e conseqüentemente sua absorção percutânea dependem também da natureza e da composição do veículo

no qual este se encontra. A escolha do veículo é primordial porque certos excipientes podem favorecer a penetração na pele, aumentando a afinidade da molécula pelo estrato córneo ou alterando reversivelmente a permeabilidade deste.

A lei de Fick, que rege de maneira geral a passagem de uma substância através de uma membrana é também aplicada à pele. Esta lei permite prever a quantidade absorvida (J) em função da concentração (C) pela fórmula:

$$J = (K_m \cdot D_m) \cdot S \cdot C / e \quad \text{Equação 1}$$

J : fluxo de absorção: quantidade de substância absorvida por unidade de superfície e de tempo (g ou mol/ cm²/h);

S : superfície de absorção (cm²);

C : concentração da substância (g ou mol/ cm³);

K_m : coeficiente de partilha da substância estrato córneo / veículo;

D_m : coeficiente de difusão da substância no estrato córneo (cm²/ h);

e : espessura do estrato córneo (cm).

Pode-se expressar a permeação de uma molécula em percentagem da dose aplicada. Isso somente é possível numa situação dita “dose finita”, onde toda a quantidade de substância depositada sobre a pele é utilizada, e quando o fluxo de absorção conseqüentemente é reduzido até se anular.

As células de difusão são utilizadas há vários anos para avaliar a penetração cutânea de uma molécula. São constituídas de duas partes separadas pela pele. Uma alíquota de formulação contendo a substância ativa é aplicada sobre a pele por meio do compartimento superior e esta substância após atravessar a pele é quantificada numa solução receptora contida na porção inferior da célula (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática de uma célula de difusão. Adaptado de <http://www.permeagear.com/franz.htm>. Acesso em 02 de setembro de 2007.

Durante a fase de desenvolvimento de formulações fotoprotetoras e previamente aos estudos de penetração cutânea, é de extrema importância a realização de um estudo da liberação *in vitro*, a fim de se avaliar a capacidade das substâncias ativas em serem liberadas da formulação, antes que estas entrem em contato com o estrato córneo. Tais estudos são realizados com membranas sintéticas, que são barreiras porosas funcionando como barreiras de difusão passiva, onde a taxa de liberação é determinada avaliando-se a quantidade de substância liberada em função da raiz quadrada do tempo (CLÉMENT, LAUGEL, MARTY, 2000).

Após os estudos de liberação, é necessário avaliar a permeação e a retenção cutânea das substâncias, pois, em geral, os ingredientes utilizados numa formulação cosmética não devem atravessar totalmente a pele (absorção sistêmica). No entanto, a fim de que substâncias antioxidantes possam exercer seus efeitos fotoprotetores na pele, estas devem ser capazes de penetrar no estrato córneo e atingir a epiderme, uma vez que a radiação UV atinge as camadas mais profundas do tecido cutâneo.

Para os estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*, dois modelos principais têm sido utilizados: pele de orelha de porco e pele humana proveniente de cirurgia plástica. A pele de orelha de porco tem demonstrado propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana e por isso tem sido bastante utilizada. A vantagem da utilização da pele humana ao invés da pele de porco

consiste no fato de que esta última em alguns casos é mais permeável do que a pele humana (BOUDRY et al., 2007). Além disso, a Organização Mundial da Saúde recomenda se possível a utilização de pele humana nos estudos de absorção cutânea (OMS, 2005).

Para estudos de permeação e retenção cutânea de formulações tópicas, as substâncias ativas devem ser quantificadas na solução receptora, na solução de lavagem (que retira os resíduos que não penetraram na pele), na fita adesiva utilizada para a remoção do estrato córneo e por fim na epiderme viável e na derme. Para tal deve-se utilizar um método analítico sensível a pequenas concentrações das substâncias, como por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e este método deve ser validado de forma a se considerar as diferenças de solubilidade das substâncias ativas em cada meio e também a existência de efeito matriz da fita adesiva e da pele.

O interesse na utilização oral do extrato de chá verde e a problemática da biodisponibilidade de algumas catequinas quando administradas por esta via (CHEN et al., 1997) estimulou a publicação de pesquisas científicas com o objetivo de desenvolver um sistema de liberação transdérmico para este extrato (BATCHELDER et al., 2004; FANG et al., 2006; FANG et al., 2007). No entanto, nenhum estudo foi feito avaliando a penetração cutânea quando este extrato é utilizado numa formulação cosmética com o objetivo de se obter um efeito local.

Já para o extrato de *Ginkgo biloba*, graças a sua adequada biodisponibilidade por via oral, não houve interesse por parte da comunidade científica em desenvolver dispositivos transdérmicos e, por conseguinte, não se tem informações sobre a penetração cutânea deste extrato.

Assim, este estudo propõe-se a estudar a liberação *in vitro* dos flavonóides de formulações cosméticas contendo os extratos de chá verde ou *Ginkgo biloba*, bem como avaliar a penetração cutânea *in vitro*, utilizando pele humana, esperando que tais flavonóides penetrem na pele e permaneçam no tecido cutâneo a fim de exercer os seus efeitos protetores, sem que haja a possibilidade de absorção sistêmica.

2.8 Compatibilidade cutânea

Produtos cosméticos necessitam de ensaios clínicos em humanos, para que se possa oferecer aos consumidores o máximo de segurança com o menor risco, garantindo as melhores condições de uso do produto. A partir de informações pré-

clínicas coletadas, deve haver a comprovação de segurança de uso por humanos. Estas informações são importantes para determinação do modo e local de uso, advertências de rotulagem e orientações para o serviço de atendimento ao consumidor (BRASIL – ANVISA, 2003). Além disso, para que um produto seja considerado “dermatologicamente testado”, ensaios de compatibilidade cutânea devem ser conduzidos.

A compatibilidade cutânea é definida como a ausência de irritação na pele sob circunstâncias normais do uso e sob condições de mau uso razoavelmente previsíveis que levam em consideração reações objetivas assim como respostas subjetivas tais como sensação de pinicação, queimação ou coceira (BÉLGICA – COLIPA, 1997).

Os ensaios de compatibilidade têm por objetivo comprovar a inocuidade dos produtos em pele humana. São realizados de modo geral com apósitos oclusivos ou semi-oclusivos (*patch tests*) ou em modelos abertos (*open tests*). Representam o primeiro contato do produto acabado com um ser humano, e por isso devem seguir premissas de ordem ética e de boas práticas clínicas (BRASIL – ANVISA, 2003).

O principal ensaio de compatibilidade é o Teste de Irritação Cutânea Primária e Acumulada, no qual o produto é aplicado de forma aberta, semi-oclusiva ou oclusiva, de acordo com o produto a ser avaliado. A duração do contato e periodicidade das leituras são padronizadas e a interpretação dos resultados é feita por um dermatologista, considerando o ICDRG (international Contact Dermatitis Research Group) (BRASIL – ANVISA, 2003).

Este teste pode ser usado para avaliar novas formulações com matérias-primas conhecidas, e para avaliar novas formulações cuja segurança foi comprovada em testes com apósitos (*patches*) abertos. Neste teste é possível fazer avaliações comparativas de diversas formulações no mesmo indivíduo, incluindo geralmente um padrão que não provoca reação, como a água deionizada, por exemplo. As formulações são aplicadas em pequenas cúpulas de inox presentes no apósito, e em seguida este é aplicado nas costas ou no antebraço dos voluntários durante um período mínimo de 24 horas.

Assim, a realização de um teste de compatibilidade cutânea é importante para fornecer informações em relação à segurança de uso das formulações contendo os extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*, antes da realização de estudos clínicos de eficácia.

3 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba* a fim de avaliar a eficácia pré-clínica na proteção contra danos causados pela radiação UV, a penetração cutânea e a segurança de tais formulações.

4 Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas

As matérias-primas descritas, a seguir, estão de acordo com o INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) e quando necessário também está descrito o nome comercial e o fornecedor/fabricante.

- Acetato de sódio anidro, Fluka;
- Acetonitrila, Prolabo;
- Ácido acético, Prolabo;
- Ácido cítrico mono-hidratado, Cooper;
- Água destilada e deionizada;
- Álcool isopropílico, JT Baker;
- Base autoemulsificante contendo álcool cetoestearílico e fosfatos de dicetila e cetearila (Crodafos CES®), Croda;
- Base autoemulsificante contendo manteiga de karité, sesquioleato de sorbitano, polissorbato 20, carbômero e celulose (Nanocolloidyl 2022®), Lipotec;
- Base autoemulsificante contendo triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, ácido esteárico, álcool batílico e lecitina de soja (Nikkolipid 81S®), Nikko Chemicals;
- Base autoemulsificante óleo mineral, palmitato de isopropila como emolientes; fosfato de trilaureth-4 e ésteres de óleo de canola e sorbitol como emulsionantes e copolímero do ácido sulfônico acriloidilmetiltaurato e vinilpirrolidona (VP) como doador de viscosidade (Hostacerin SAF®), Clariant;
- Butil hidroxi tolueno (BHT);
- Copolímero de ácido sulfônico acriloidilmetiltaurato e vinilpirrolidona, Aristoflex AVC®, Clariant;
- Crosspolímero de acrilatos/acrilato de alquila C10-30 (Pemulen TR1®), Goodrich;
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Merck;
- Enzima HRP (horseradish peroxidase), Sigma;
- Etanol absoluto RP Normapur, Prolabo;
- Ethomeen S12 (N,N-bishydroxyethyl-ollylamine), Alzo Nobel Surfactants;

- Extrato glicólico de *Camellia sinensis* (Titrami Green tea®), lotes nº 4513630 e 6620748 contendo respectivamente 0,74 e 0,82% de catequinas totais, Alban Muller International;
- Extrato glicólico de *Ginkgo biloba* (Titrami Ginkgo biloba®), lotes nº 3571053 e 7521578 contendo respectivamente 0,48 e 0,75mg/g de rutina, Alban Muller International;
- Fenoxietanol, metil, etil, butil e propilparabenos (Phenonip®), Clariant;
- Fosfato de sódio bibásico, Sharlau;
- Epigallocatequina-3-galato, lotes nº 08K1719 e 066K1881, Sigma Aldrich;
- Glicerina PA, Synth;
- Goma polissacarídica obtido de *Sclerotium rolfsii* (Amigel®), Alban Muller International;
- Hidróxido de sódio, Prolabo;
- Luminol, Sigma;
- Metabissulfito de sódio, Fluka;
- Metanol Chromanorm, Prolabo;
- Miristato de isopropila, Cooper;
- Peróxido de hidrogênio 36%, Calbiochem;
- Polissorbato 20 (Montanox® 20DF), Seppic;
- Propilenoglicol PA, Synth;
- Quercetina di-hidrato mínimo 98% HPLC código Q0125, lote 085K0720, Sigma Aldrich;
- Rutina, PVP.

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico Heidolph, RZR 2021;
- Agulha de Reverdin;
- Balança analítica Ohaus, modelo AS 200;
- Balança analítica Precisa 205, Swiss quality;
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000;
- Banho de ultrassom Transsonic 275/H, Prolabo;
- Banho-maria de circulação de água Tilderm contendo uma placa de agitação Polystat 16000 Tilderm que sustenta a parte inferior das

células de difusão e permite de aquecê-las a 32°C e homogeneizar o líquido receptor pelos movimentos de uma barra magnética;

- Bisturi cirúrgico;
- Bisturi e lâmina nº 23;
- Células de difusão estáticas de Franz™ contendo dois compartimentos: sendo um superior, constituído por um cilindro de vidro, de 3,14 cm² de superfície e outro compartimento inferior, que corresponde a um reservatório de volume fixo de 10 mL e contém um braço coletor lateral, Laraspiral;
- Centrífuga Excelsa Baby II modelo 206-R, potência 0,0440 kw, Fanem;
- Chapa de aquecimento;
- Coluna cromatográfica C18 RP, 250 x 4,6 mm ID, 5UA, 100A, Nucleodur, Macherey Nagel;
- Cromatógrafo Líquido LaChrom Merck, detector UV/visível L7400, injetor automático L-7200, interface D-7000;
- Dermatômetro de Brown, Zimmer;
- Espectrofotômetro Hitachi U-2001;
- Estufa termostatzada com controle de umidade e temperatura, 111FC, Eletrolab;
- Filtros de microfibras de vidro, 0.7µm de porosidade, Whatman GF/F;
- Filtros de nylon 17 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, Titan;
- Fita adesiva Scotch® Crystal, 3M;
- Hastes flexíveis de algodão, Monoprix;
- Lâminas de Dermatômetro, Zimmer;
- Lâminas e lamínulas de vidro para histologia, Knittel;
- Luminômetro Autolumat LB953 EG&G Berthold;
- Medidor de espessura de superfícies, Käfet;
- Membrana de acetato de celulose Diachema tipo 10.14, espessura 25±1,0, Dianorm;
- Membrana de polissulfona HT Tuffryn, diâmetro 47 mm, tamanho do poro 0.45 µm, Pall;
- Mexameter® MX16, Courage & Khazaka Electronic GmbH;
- Microscópio óptico Leica DMLB acoplado a uma câmera DC 300;
- Microscópio óptico Olympus;

- Mini-termômetro de medida de superfícies, Testo;
- Moinho misturador MM301, Retsch;
- Parafilm®;
- *Patch*, Epitest Ltd Oy;
- Peagômetro DM 20, Digimed;
- Peagômetro MP220, Mettler Toledo;
- Pinças cirúrgicas;
- Potes de vidro neutro, com capacidade para 30 gramas;
- Purificador de água Milli Q;
- Radiômetro 70260 acoplado a um detector de silicone 70282 e a um filtro de sílica fundida U-340, Oriel Corporation;
- Simulador solar 96000 que consiste de uma lâmpada de arco de xenônio de 150W ligada a uma fonte acoplada a um espelho dicróico 81045 (para filtrar as radiações com comprimentos de onda inferiores a 280nm e superiores a 400nm) e a um filtro 59450 (para bloquear os comprimentos de onda UVC), Oriel Corporation;
- Termômetro;
- Tesoura cirúrgica;
- Tewameter® TM 210, Courage & Khazaka Electronic GmbH;
- Tubos de 2 mL, Eppendorf;
- Vidrarias em geral;
- Vortex Polymix, Bioblock.

4.1.3 Pele

- Pele humana caucasiana de uma mulher, proveniente de cirurgia plástica na região abdominal, Hospital de Antony (França).

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização dos extratos vegetais

4.2.1.1 Determinação do espectro de absorção

Soluções dos extratos glicólicos de chá verde (Titrami Green tea®) e de *Ginkgo biloba* (Titrami Ginkgo biloba®) diluídas (1:5) em álcool isopropílico foram

analisadas em espectrofotômetro Hitachi U-2001 na faixa de 200 a 400nm para a obtenção do espectro de absorção.

4.2.1.2 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

No presente estudo, o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos glicólicos de chá verde e de *Ginkgo biloba* foi investigado pelo método da quimioluminescência dependente de luminol, cujo princípio baseia-se na absorção de fótons emitidos pelo luminol quando este reage com os radicais livres produzidos pela associação de peróxido de hidrogênio e uma enzima peroxidase. Assim, quanto maior o sinal captado pelo equipamento, maior a produção de radicais livres. Quando da adição de uma substância antioxidante, ocorre neutralização de parte dos radicais livres, o que leva a uma menor emissão de fótons e consequentemente um menor sinal é detectado pelo equipamento (CHENG et al., 2003).

Inicialmente, alíquotas de 10 µL de soluções em DMSO (0,040 mmol/L) contendo padrões de rutina, quercetina e de galato de epigallocatequina (EGCG) e de soluções diluídas (1:9) de extratos glicólicos titulados de chá verde ou de *Ginkgo biloba* e de uma solução diluída (1:8) da associação contendo 50% de cada um desses extratos e de uma solução controle (tampão fosfato), foram acrescidas de 400µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), de 10µL de solução de luminol (5mg/mL) e de 100µL H₂O₂. A reação foi iniciada pela adição de 500µL de solução (0,2 UI/mL) de HRP (horseradish peroxidase) e a quimioluminescência foi quantificada utilizando-se o luminômetro Autolumat LB953 EG&G Berthold (CHENG et al., 2003; LUCISANO-VALIM et al., 2002; KROL et al., 1994; MAIA CAMPOS et al., 2006).

Os resultados foram expressos em área sobre a curva (AUC) de quimioluminescência, obtidas em triplicata para cada amostra e representam o total de EROs produzido em 15 minutos a 30°C.

4.2.2 Desenvolvimento das formulações

Foram desenvolvidas 13 diferentes formulações (Tabela 1). O processo de preparação constituiu primeiramente da obtenção de um gel com os diferentes polímeros hidrofílicos utilizados (Pemulen TR1®, Aristoflex AVC® e Amigel®) com 95% da água e a glicerina. Em seguida, as emulsões foram obtidas com a adição das fases oleosas, constituídas pelas quatro bases auto-emulsificantes (Hostacerin

SAF®, Nikkolipid 81S®, Nanocolloidyl 2022® e Crodafos CES®) e BHT (formulações de n^{os} 5 a 7) e submetidas à agitação de 625 rpm durante 25 minutos em agitador Heidolph RZR 2021. Após o esfriamento, adicionou-se a mistura de propilenoglicol e preservante (Phenonip®) e nas formulações de n^{os} 8 a 13 acrescentou-se também o metabissulfito de sódio solubilizado nos 5% da água restante. Por fim todas as formulações foram acrescidas ou não (veículo) de 6% do extrato glicólico de chá verde (Titrami Green tea®) ou de 6% do extrato glicólico de *Ginkgo biloba* (Titrami *Ginkgo biloba*®) ou de 6% de cada extrato.

As formulações foram acondicionadas em frascos de vidro neutro transparente, com capacidade para 30g.

4.2.2.1 Testes de estabilidade das formulações

4.2.2.1.1. Determinação do pH

A medida de pH foi realizada em peagômetro Digimed DM 20, utilizando-se amostras da formulação veículo e da formulação contendo a associação dos extratos, diluídas a 10% em água destilada e deionizada, 24 horas após a preparação.

4.2.2.1.2. Centrifugação

Neste teste preliminar de estabilidade, 5 gramas de cada formulação foram centrifugados a 604,8g (3000 rpm) por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R Fanem (MAIA CAMPOS; BADRA, 1992).

4.2.2.1.3. Estresse térmico

Amostras das formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C, e observadas visualmente durante sete dias, a fim de verificar alterações do tipo: cor, odor, separação de fases e homogeneidade.

4.2.2.2 Análise sensorial das formulações

4.2.2.2.1. Casuística

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Protocolo nº 42-CEP/FCFRP – Anexo 1), 25 voluntárias foram selecionadas para esta etapa obedecendo aos seguintes critérios de inclusão: sexo feminino, idade de 20 a 50 anos e exclusão: alergia a algum tipo de cosmético e presença de dermatoses na região dos antebraços.

As voluntárias primeiramente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando que estavam plenamente de acordo em participar desta pesquisa e em seguida, permaneceram durante 15 minutos em ambiente com temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (45 - 60%) controladas. Posteriormente, tiveram seus antebraços subdivididos em três regiões cada e receberam 0,2 g das formulações de nºs 8, 9, 10, 11, 12 e 13 contendo a associação dos extratos vegetais

objeto de estudo. As formulações foram aplicadas pelas próprias voluntárias que imediatamente e após 5 minutos atribuíram notas a cada formulação, na ficha de avaliação sensorial, em relação aos seguintes parâmetros: toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata na pele e sensação na pele após 5 minutos da aplicação (Figura 10) (GOMES et al., 1998). Após a análise estatística dos dados obtidos, a formulação que apresentou a melhor performance sensorial foi selecionada para as próximas etapas do estudo.

Responda a avaliação abaixo utilizando os seguintes parâmetros sensoriais:								
1= péssimo 2= ruim 3= regular 4= bom 5= excelente								
Parâmetros avaliados:			Notas atribuídas:					
Toque e pegajosidade			F8	F9	F10	F11	F12	F13
Espalhabilidade e aparência na pele								
Sensação na pele imediatamente								
Sensação na pele após 5 minutos								

Figura 10. Ficha de avaliação sensorial.

4.2.3 Avaliação pré-clínica da eficácia fotoprotetora

Este estudo foi realizado com a formulação escolhida com base nas etapas referentes aos testes de estabilidade (item 4.2.2.1) e à análise sensorial das formulações (item 4.2.2.2).

4.2.3.1 Animais de laboratório e aplicação das formulações

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no uso de animais do Câmpus da USP-RP (Protocolo nº 041945531 - Anexo 2), 5mg/cm² das formulações foram aplicadas no dorso de 24 camundongos sem pêlo, adultos, machos, pesando em média 30 gramas, linhagem HRS/J, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, ME, doados pelo Laboratório JOHNSON & JOHNSON, Brasil, seguindo o protocolo a seguir:

Grupo 1:

- Área I: foi aplicada a formulação de nº 11 sem nenhum extrato (veículo: V);
- Área II: foi aplicada a formulação de nº 11 acrescida do extrato de chá verde (CV);

Grupo 2:

- Área I: foi aplicada a formulação de nº 11 acrescida do extrato de *Ginkgo biloba* (GB);
- Área II: foi aplicada a formulação de nº 11 acrescida dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* (CV+GB);

Grupo 3:

- Área I: sem aplicação de formulação e irradiada (controle irradiado: CI);
- Área II: sem aplicação de formulação e não-irradiada (controle não-irradiado: CNI).

Os camundongos foram imobilizados e, após 15 minutos da aplicação das formulações objeto de estudo, foram expostos à radiação UVA/UVB.

4.2.3.2 Irradiação

Os grupos foram submetidos à radiação UV emitida por lâmpada de arco de xenônio. Para tal, os camundongos foram imobilizados em suportes posicionados a 20 cm da lâmpada e a área dorsal foi exposta à radiação UV na faixa de 280 a 400nm, a uma dose de 0,399mW/cm² (determinada a 290nm) durante 9 minutos, resultando uma dose acumulada de 215,46 mJ/cm² ou 10,26 DEM/cm² (GASPAR; CAMPOS, 2007; ROPKE et al., 2003).

O simulador solar utilizado consiste de uma lâmpada de arco de xenônio de 150W 96000 (Oriel Corporation), ligada a uma fonte acoplada a um espelho dicróico 81045 Oriel e a um filtro 59450 Oriel (WG 305). A dose da radiação UV foi calculada por um sensor (Radiômetro 70260 Oriel) acoplada a um detector de silicone 70282 e um filtro U-340 (TREVITHICK et al.,1992; MEGURO et al.,1999; MCVEAN; LIEBLER, 1997; THIELE; TRABER, PACKER., 1998).

4.2.3.3 Medida do eritema

O índice de eritema foi medido após 20 horas da irradiação, nas áreas irradiadas e não irradiadas, utilizando-se o equipamento Mexameter® MX16. Foram efetuadas 6 medidas em cada área, e a média dos valores foi utilizada para as análises posteriores. O índice de eritema está relacionado com o conteúdo de hemoglobina na pele, baseado no princípio da absorção. O Mexameter® apresenta uma sonda que emite luz em três comprimentos de onda pré-definidos e um receptor que mede a luz refletida, podendo-

se assim, calcular a luz absorvida pela pele. O eritema é medido por dois comprimentos de onda diferentes, um deles corresponde ao pico de absorção da hemoglobina e o outro evita a influência de outras cores, como por exemplo, a bilirrubina. Os resultados são exibidos pelo aparelho como E: valores de eritema.

Os índices eritema (E) são calculados como:

$$E: 500/\log 5 \times [\log (\text{reflexão vermelho}/ \text{reflexão verde}) + \log 5] \text{ Equação 2}$$

Este princípio de medida do eritema é descrito por Fullerton et al. (1996) e Lahti et al. (1993), entre outros.

4.2.3.4 Medida da perda transepidérmica de água (TEWL)

A medida da perda transepidérmica de água foi realizada visando avaliar a integridade da função barreira da pele, uma vez que quanto maior os valores de TEWL, pior é a integridade da barreira cutânea. As medidas foram obtidas após 20 horas da irradiação, em sala com temperatura e umidade relativa do ar controlada utilizando-se o equipamento Tewameter® TM 210. Foram realizadas 10 medidas em cada área após 30 segundos de estabilização da sonda na pele, e a média destes valores foi utilizada para as análises posteriores. O equipamento consiste de um sistema para medida da evaporação de água nas superfícies da pele, baseado no princípio de difusão descoberto por Adolf Fick em 1885.

$$\frac{dm}{dt} = - D \times A \times \frac{dc}{dx} \text{ Equação 3}$$

Onde, dm/dt é o fluxo de difusão, A é a área, dc/dx é a alteração de concentração por distância e D é o coeficiente de difusão do vapor de água no ar. Este princípio é utilizado por Meguro et al. (1999) e por Gaspar e Maia Campos (2003).

4.2.3.5 Análises histopatológica e histométrica

4.2.3.5.1. Obtenção dos cortes histológicos

Após 24 horas (LU et al., 1999) da exposição à radiação UV, os camundongos sem pelo foram mortos por inalação de CO_2 e colhidos fragmentos da

pele de 4 mm de diâmetro de cada área tratada através da utilização de um *punch* dermatológico, os quais foram imersos imediatamente em solução fixadora de álcool 80% (85mL) formalina (10mL) e ácido acético (5mL) e deixados fixar durante 24 horas. Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Posteriormente foram realizados cortes de 6 micrômetros de espessura, dos quais foram selecionados 10 cortes por bloco, de modo que cada um destes 10 cortes corresponda a um intervalo de 50 secções. Estes cortes foram então corados com hematoxilina e eosina.

4.2.3.5.2. Análise histopatológica

A análise histopatológica do tecido cutâneo dos diferentes grupos foi realizada em microscópio óptico Jenamed com objetiva de 40x (MAIA CAMPOS et al., 1999; SILVA; MAIA CAMPOS, 2000).

4.2.3.5.3. Contagem de células de queimadura solar (CQS)

O número de células de queimadura solar (queratinócitos apoptóticos presentes na camada basal que apresentam núcleo picnótico e citoplasma eosinofílico) foi determinado em microscópio óptico Olympus e objetiva de 40x, obtendo-se a média do número total de CQS em 5 cortes para cada animal (LU et al., 1999).

4.2.3.5.4. Quantificação da hiperplasia da epiderme

A medida da espessura da epiderme foi realizada utilizando um microscópio óptico Leica DMLB, com objetiva de imersão (100x), acoplado a uma câmara DC 300, com o auxílio do analisador de imagens Image J. Para tal, foram selecionadas aleatoriamente 3 imagens por animal e a partir delas foram realizadas 10 medidas por imagem, sendo obtido um valor médio para cada animal (LU et al., 1999). Nas mesmas regiões da epiderme foi realizada a contagem do número de camadas de células nucleadas (EL-ABASERI; PUTTA; HANSEN, 2006).

4.2.4 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos na avaliação sensorial das formulações, na avaliação do potencial antioxidante *in vitro* dos extratos vegetais e na avaliação da eficácia pré-clínica das formulações foram submetidos à análise de normalidade da

distribuição amostral analisada, sendo selecionado o teste não paramétrico de Friedman para a análise dos dados obtidos na avaliação sensorial e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise dos dados obtidos na avaliação do potencial antioxidante *in vitro* e na avaliação da eficácia pré-clínica. Todos os testes foram realizados por meio de software estatístico GMC elaborado por Maia Campos (1999).

4.2.5 Estudos de liberação e penetração cutânea *in vitro*

Os estudos de liberação e penetração cutânea foram realizados com a formulação de nº 11 adicionada de 6% extrato de chá verde ou de 6% do extrato de *Ginkgo biloba*. As metodologias analíticas utilizadas para avaliar estes estudos foram desenvolvidas e validadas como descrito abaixo.

4.2.5.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) para a dosagem dos flavonóides nos extratos vegetais

Foram desenvolvidos dois métodos analíticos diferentes: um para a análise de epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Figura 5D) no extrato de chá verde (método E) e outro para a análise de quercetina (Figura 7B) no extrato de *Ginkgo biloba* (método Q).

A validação do método analítico foi realizada seguindo os principais parâmetros propostos para métodos analíticos pela Sociedade Francesa de Ciências e Técnicas Farmacêuticas (HUBERT et al., 2003; CAPORAL-GAUTIER) e pela ANVISA (BRASIL – ANVISA, 2003).

4.2.5.1.1. Separação dos flavonóides dos extratos vegetais

Após a realização de diferentes ensaios, os parâmetros seguintes foram fixados:

- Coluna C18 RP, 250 x 4,6 mm ID, 5UA, 100A;
- Volume de injeção : 20µL
- Fluxo: 1,0mL/min.
- Detecção UV: 270nm (método E) e 360nm (método Q)
- Tempos de análise (minutos): 16 (método E) et 20 (método Q)

Foram avaliadas diferentes fases móveis para a obtenção de uma boa separação dos constituintes dos extratos vegetais e também com o objetivo de se obter os picos dos flavonóides (EGCG e quercetina) após 10 minutos de análise para evitar interferências de picos da pele que apresentam baixo tempo de retenção. As seguintes condições foram selecionadas uma vez que proporcionaram melhor resolução dos picos cromatográficos dos flavonóides dos extratos vegetais: fase móvel isocrática: acetonitrila (30%) / tampão acetato pH 3,0 (70%) para o método Q e gradiente de acetonitrila / tampão acetato pH 3,0 (Tabela 2) para o método E.

Tabela 2. Gradiente utilizado no método E.

Tempo (minutos)	Tampão acetato pH 3,0	Acetonitrila
0	90	10
1	88	12
2	86	14
3	84	16
4	82	18
5	80	20
6	80	20
7	80	20
8	80	20
9	78	22
10	76	24
11	74	26
12	80	20
13	85	15
14	90	10
15	90	10
16	90	10

4.2.5.1.2. Escolha dos líquidos receptores e da solução de lavagem

Segundo o *Scientific Committee on Consumer Products* da Comunidade Européia (BELGICA – SCCP, 2006), a escolha do líquido receptor para os estudos de liberação e permeação é feita de modo a garantir solubilidade e estabilidade das substâncias a serem analisadas. Assim, primeiramente foi feita uma tentativa de utilizar o tampão fosfato pH 7,4 que é amplamente empregado em tais estudos por apresentar pH fisiológico. Porém, foi verificado que a EGCG era bastante instável nesse meio, possivelmente devido ao alto pH. Assim, baseando-se num estudo de BATCHELDER et al. (2004), decidiu-se avaliar o tampão citrato pH 5,5, o qual se mostrou mais adequado para garantir *sink conditions* e estabilidade desta catequina. Assim, decidiu-se utilizar tal tampão, visto que o pH 5,5 é compatível com a pele e que o SCCP aceita a utilização de outros tampões desde que devidamente justificado. Para a quercetina, alguns

ensaios foram feitos comparando sua solubilidade nos dois diferentes tampões. O tampão citrato pH 5,5 foi o que permitiu melhor solubilização deste flavonóide. Seguindo o estudo de Casagrande et al. (2006), adicionou-se também 0,5% de polissorbato 20, que melhorou ainda mais tal solubilidade.

Para a solução de lavagem da superfície da pele, optou-se por utilizar uma solução de água e etanol 50:50 (v/v), ajustado a pH 5,5.

4.2.5.1.3. Pesquisa de interferentes: especificidade/seletividade

A especificidade de um método analítico é sua capacidade de estabelecer, de maneira inequívoca, a existência de uma substância a ser analisada na presença de outros componentes. Um procedimento analítico é dito “específico” se ele permite garantir que o sinal obtido é proveniente unicamente de uma substância a ser analisada. Segundo estas definições, torna-se necessário demonstrar que a substância analisada na presença de outros componentes é realmente o analito pesquisado (HUBERT et al., 2003).

A seletividade é ligada à capacidade de separação do analito com a presença de outras substâncias, como metabólitos, por exemplo. O grau de seletividade de um procedimento analítico depende, dentre outros, da qualidade da separação cromatográfica e da seletividade intrínseca do método de detecção.

Para a pesquisa de picos interferentes, as soluções que seriam utilizadas nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea (metanol, líquidos receptores e solução de lavagem) foram analisadas para cada método analítico (E e Q). Foi necessário também avaliar a interferência de compostos da epiderme e da derme da biópsia utilizada no estudo, da fita adesiva utilizada para a remoção do estrato córneo por *tape stripping* e dos excipientes do veículo. Assim, as soluções extratoras (24h de contato) contendo amostras da epiderme e da derme (proveniente da célula controle do estudo de difusão cutânea), 0,018g (cerca de 2cm²) de fita adesiva e 0,5% da formulação de n° 11 (veículo) em metanol foram analisadas pelos dois métodos (E e Q).

4.2.5.1.4. Linearidade e curvas de calibração

A linearidade é a capacidade de um procedimento analítico de fornecer resultados diretamente proporcionais à quantidade (concentração) da substância em análise, dentro de certo intervalo (CAPORAL-GAUTIER et al, 1992).

O intervalo de concentração a ser validado deve estar coberto por uma série de cinco concentrações mínimas de analito (triplicata), regularmente espaçadas. Com estes dados, constrói-se uma curva de calibração com as concentrações (eixo X) e as respostas (sinais) obtidas (eixo Y). O coeficiente de correlação (r) nos dá informações sobre a existência de uma relação linear (sob a forma de uma reta) entre as duas grandezas consideradas. Quanto mais o valor de r é próximo de 1, maior é a probabilidade de haver uma correlação linear entre as duas variáveis x e y .

Construiu-se 5 curvas de calibração (denominadas como A) para a quantificação dos flavonóides nos extratos vegetais e nos diferentes meios de estudo de liberação e penetração cutânea: metanol, metanol contendo fita adesiva (onde o estrato córneo é aderido), metanol contendo pele, líquido receptor e solução de lavagem. A construção das curvas com a pele e com a fita adesiva foi realizada para avaliar o efeito matriz dos seus componentes, e, as curvas de calibração com o líquido receptor e a solução de lavagem, foram realizadas devido à diferenças de solubilidade dos flavonóides nas diferentes soluções. Todas as curvas de calibração descritas abaixo foram preparadas em triplicata a partir de soluções estoque contendo 400µg/mL de EGCG ou quercetina em metanol.

- **Curva nº 1A:** soluções de metanol contendo 0,1562; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20µg/mL de quercetina ou 0,4166; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40µg/mL de EGCG.

- **Curva nº 2A:** soluções de metanol contendo 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20µg/mL de quercetina ou 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40µg/mL de EGCG, adicionadas de 0,018g de fita adesiva. Tais soluções sofreram extração durante 24 horas em refrigerador antes da injeção.

- **Curva nº 3A:** soluções de metanol contendo 0,625; 0,9375; 1,25; 2,5; 5; 10; e 20µg/mL de quercetina ou 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40µg/mL de EGCG, adicionadas de 0,15g de pele caucasiana dermatomizada. Tais soluções foram vertidas em tubos plásticos de 2mL contendo 2 pequenas esferas de aço inoxidável, submetidas à agitação por um moinho misturador durante 40 minutos a uma frequência de 30 oscilações/s e submetidas à extração durante 24 horas em refrigerador antes da injeção.

- **Curva nº 4A:** soluções em tampão citrato pH 5,5 acrescido de 0,5% de polisorbato 20 (líquido receptor para o extrato de *Ginkgo biloba*) contendo 0,1562; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20µg/mL de quercetina e soluções em tampão citrato pH 5,5 (líquido receptor para o extrato de chá verde) contendo 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40µg/mL de EGCG.

- **Curva nº 5A:** soluções em água/etanol (50:50, v/v) ajustado a pH 5,5 (solução de lavagem) contendo 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20µg/mL de quercetina ou 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40µg/mL de EGCG. Tais soluções foram mantidas em refrigerador durante 24 horas antes da injeção.

Para cada curva obtida, adicionou-se uma linha de tendência para a determinação do coeficiente de correlação linear (r) e obteve-se a equação da reta. Considerou-se, que as curvas de calibração eram aceitáveis somente se o coeficiente de correlação linear fosse superior a 0,99.

4.2.5.1.5. Exatidão

A exatidão exprime a proximidade entre o valor experimental (obtido) fornecido pela análise e o valor real (teórico) da amostra. Esta proximidade assim observada é a resultante da soma dos erros sistemáticos e aleatórios, ou seja, o erro total ligado ao resultado (HUBERT et al., 2003).

A exatidão é avaliada pela relação entre a concentração encontrada e a concentração teórica expressa em porcentagem. Neste estudo, a exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação (KARTAL, 2001; SHABIR, 2003) utilizando a seguinte fórmula:

$$Exatidão = \frac{Concentração\ calculada}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Para calcular a exatidão dos métodos para os diferentes meios, construiu-se 5 novas curvas de calibração (denominadas como B) utilizando concentrações ligeiramente menores (em torno de 5%) do que as concentrações utilizadas nas curvas nomeadas como A. Todas as curvas de calibração descritas abaixo foram

preparadas em triplicata a partir de soluções estoque contendo 400µg/mL de EGCG ou quercetina em metanol.

- **Curva nº 1B:** soluções em metanol contendo 0,1484; 0,2968; 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5 e 19µg/mL de quercetina ou 0,3958; 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5; 19 e 38µg/mL de EGCG.

- **Curva nº 2B:** soluções em metanol contendo 0,2968; 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5 e 19 µg/mL de quercetina ou 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5; 19 e 38µg/mL de EGCG, adicionadas de 0,018g de fita adesiva. Tais soluções sofreram extração durante 24 horas em refrigerador antes da injeção.

- **Curva nº 3B:** soluções em metanol contendo 0,5937; 0,8906; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5 e 19µg/mL de quercetina ou 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5; 19 e 38µg/mL de EGCG, adicionadas de 0,15g de pele caucasiana dermatomizada. Tais soluções foram vertidas em tubos plásticos de 2mL contendo 2 pequenas esferas de aço inoxidável, submetidas à agitação por um moinho misturador durante 40 minutos a uma frequência de 30 oscilações/s e submetidas à extração durante 24 horas em refrigerador antes da injeção.

- **Curva nº 4B:** soluções em tampão citrato pH 5,5 acrescido de 0,5% de polisorbato 20 contendo 0,1484; 0,2968; 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5 e 19µg/mL de quercetina e soluções em tampão citrato pH 5,5 contendo 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5; 19 e 38µg/mL de EGCG.

- **Curva nº 5B:** soluções em água/etanol (50:50, v/v) ajustado a pH 5,5 (solução de lavagem) contendo 0,2968; 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5 e 19µg/mL de quercetina ou 0,5937; 1,1875; 2,375; 4,75; 9,5; 19 e 38µg/mL de EGCG. Tais soluções foram mantidas em refrigerador durante 24 horas antes da injeção.

Em seguida, utilizando-se as equações das retas obtidas com as curvas A, calculou-se a concentração real (calculada) para cada concentração das curvas B e utilizando a fórmula acima, obteve-se a exatidão em cada ponto das curvas B.

4.2.5.1.6. Limite de quantificação e intervalo de dosagem

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito numa amostra que pode ser quantificada, nas condições experimentais descritas, com exatidão definida (HUBERT et al., 2003). O intervalo de dosagem é a região entre os níveis superior e inferior (sendo estes valores inclusos) para a qual foi demonstrado que o procedimento é adequado quanto a sua exatidão e a sua linearidade (HUBERT et al., 2003).

Os limites de quantificação foram determinados para cada método, considerando-se a concentração mais baixa das curvas padrão B onde se obteve exatidão entre 85 e 115%. O intervalo de dosagem foi determinado na região da curva, onde a exatidão era compreendida entre 85 e 115%.

4.2.5.1.7. Precisão

A precisão exprime a concordância (coeficiente de variação) entre uma série de medidas que provêm de múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea (resultados de ensaios independentes) nas condições prescritas. A precisão fornece uma indicação sobre os erros vinculados aleatoriamente (HUBERT et al., 2003). As medidas de precisão dependem de maneira crítica das condições estipuladas. Duas condições principais podem assim ser distinguidas:

- *repetibilidade*: condições em que os resultados dos ensaios independentes são obtidos pelo mesmo método a partir de amostras de ensaio idênticas no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e durante um curto intervalo de tempo;
- *precisão intermediária*: condições em que os resultados de ensaio independentes são obtidos pelo mesmo método a partir de amostras de ensaio idênticas no mesmo laboratório, com diferentes operadores, utilizando equipamentos diferentes e durante um dado intervalo de tempo (diferentes dias).

Para a determinação da precisão neste estudo, soluções dos flavonóides a 5µg/mL em metanol foram preparadas e injetadas 6 vezes no cromatógrafo num mesmo dia e durante 3 dias consecutivos. Os resultados foram calculados para o

primeiro dia (repetibilidade) e para 3 dias consecutivos (precisão intermediária) a partir do desvio padrão dos resultados, de acordo com a fórmula seguinte:

$$Precisão = \frac{Desvio\ padrão}{Concentração\ média\ calculada} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Neste estudo, apenas valores mais baixos que 2% para a repetibilidade e 4% para a precisão intermediária foram aceitos.

4.2.5.1.8. Dosagem de flavonóides nos extratos vegetais de chá verde e *Ginkgo biloba*

Para a determinação da concentração de EGCG no extrato de chá verde e de quercetina no extrato de *Ginkgo biloba*, três diferentes soluções contendo 5000 µg/mL dos extratos foram preparadas em metanol e injetadas em triplicata. Calculou-se a área média dos picos e a concentração utilizando a equação da reta das curvas de calibração 1A.

4.2.5.2 Estudo do perfil de liberação *in vitro*

A metodologia utilizada no estudo de liberação *in vitro* seguiu as recomendações do F.D.A (*Food and Drug Administration*) (EUA - FDA, 1997).

Este estudo foi realizado utilizando células de difusão estáticas de Franz™ (Laraspical, Dijon, França), nas quais uma membrana é mantida horizontalmente entre as duas partes da célula que delimita dois compartimentos: um superior, constituído por um cilindro de vidro com área de difusão de 3,14 cm², depositado sobre a face superior; e um compartimento inferior, que compreende um reservatório de volume fixo (10,0 mL) contendo um braço coletor. O compartimento inferior é preenchido por um líquido receptor no qual a substância liberada através da membrana é dosada. Os dois elementos são mantidos fixos através de uma presilha e a impermeabilidade é assegurada pela espessura da membrana mantida entre os dois compartimentos (Figura 9).

Um banho-maria de circulação de água envolve a parte inferior da célula e permite aquecer o conjunto a 37°C. A homogeneidade do conteúdo do compartimento inferior dérmico é assegurada pelos movimentos de uma barra magnética, sendo as células posicionadas sobre um banco de agitação.

Para o estudo de liberação da EGCG das formulações contendo o extrato de chá verde utilizou-se a membrana hidrofílica de acetato de celulose. Para o estudo de liberação da quercetina das formulações contendo o extrato de *Ginkgo biloba* utilizou-se primeiramente a membrana hidrofílica de acetato de celulose e posteriormente a membrana hidrofílica de polisulfona.

As membranas foram preparadas antes do experimento da seguinte forma: a membranas de acetato de celulose foram lavadas em água destilada e deionizada, repetindo-se este procedimento 3 vezes. As membranas de polisulfona foram imersas numa solução contendo 15% de Ethomeen em miristato de isopropila, durante 30 minutos antes do início do experimento (CLÉMENT; LAUGEL; MARTY, 2000).

As membranas foram instaladas sobre as células de Franz (n = 6 células para cada extrato) e antes da aplicação das formulações, procedeu-se a desareação dos líquidos receptores e por meio de ultra-som e em seguida preencheu-se o compartimento inferior das células de Franz com o líquido receptor e deixou-se o sistema equilibrar durante 2 horas. Em seguida, uma dose infinita (533mg) das formulações de nº 11 contendo 6% do extrato de chá verde ou 6% do extrato de *Ginkgo biloba* foi depositada sobre a membrana com o auxílio de uma micro-espátula. As células foram fechadas com Parafilm® para evitar a evaporação das fórmulas (CLÉMENT; LAUGEL; MARTY, 2000).

A retirada de líquido receptor foi feita após 1, 2, 3, 4 e 6 horas para as células que receberam as formulações contendo o extrato de chá verde e de 2, 4, 6 e 8 horas para as células que receberam as formulações contendo o extrato de *Ginkgo biloba*. Para cada tempo, o líquido receptor foi totalmente retirado, pesado e imediatamente substituído por líquido novo. A dosagem das alíquotas retiradas foi feita imediatamente após a retirada pelo método de CLAE anteriormente descrito, utilizando a equação da reta das curvas de calibração 4A.

O perfil de liberação das formulações contendo os extratos vegetais foi avaliado matematicamente seguindo os modelos de ordem zero (quantidade liberada acumulada *versus* tempo), pseudoprimeira ordem (quantidade liberada acumulada *versus* raiz quadrada do tempo) e primeira ordem (Log da quantidade liberada acumulada *versus* tempo). A análise dos dados foi feita pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e o gráfico que apresentou o maior coeficiente de correlação linear (r) definiu a cinética de liberação.

4.2.5.3 Estudo de penetração cutânea *in vitro*

A metodologia utilizada neste estudo seguiu as recomendações do SCCP (*Scientific committee on consumer products*) da Comunidade Européia (BÉLGICA. SCCP, 2006).

A penetração cutânea *in vitro* foi estudada em amostras de pele humana, colocadas em células de difusão estáticas de Franz™ (Laraspiral, Dijon, França), previamente descritas no item anterior.

4.2.5.3.1. Preparação da pele humana

A pele humana utilizada foi do tipo caucasiana, proveniente da região abdominal de uma mulher (POTARD et al., 1999), vinda de cirurgia plástica do Hospital de Antony (França).

Na véspera do experimento, a pele foi retirada do congelador e deixada no refrigerador. No dia seguinte, a gordura foi retirada com o auxílio de um bisturi. Em seguida, a pele inteira foi dermatomizada a uma espessura constante de aproximadamente 200 a 400 µm, utilizando um dermatômetro de Brown™. Uma vez dermatomizada, a pele foi cortada em pequenos pedaços de cerca de 4cm².

Um controle de qualidade da espessura foi realizado em cada biópsia por meio de um medidor de espessuras Käfet e em seguida, as amostras de pele foram randomizadas e aplicadas nas células de difusão entre os compartimentos superior e inferior, sendo que estes elementos foram mantidos fixos por presilhas.

4.2.5.3.2. Aplicação das formulações e coleta do líquido receptor

Antes da aplicação das formulações, procedeu-se a desaeração dos líquidos receptores por meio de ultra-som e em seguida preencheu-se o compartimento inferior das células de Franz. Deixou-se o sistema estabilizar durante 2 horas e em seguida, cerca de 10 mg/cm² (31,4 mg) da formulação de nº 11 contendo 6% de extrato de chá verde e 10 mg/cm² (31,4 mg) da formulação de nº 11 contendo 6% de extrato de *Ginkgo biloba* foram aplicados sobre toda a superfície da pele (3,14 cm²) com o auxílio de uma micro-espátula (n=6 para cada formulação). A quantidade de formulação aplicada em cada célula foi pesada individualmente.

A parte superior do compartimento superior foi deixada aberta ao exterior, expondo assim a superfície da epiderme ao ambiente. A temperatura da superfície

da pele nestas condições experimentais foi de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, controlado por um mini-termômetro de superfícies.

Durante a experimentação, as coletas do líquido receptor foram efetuadas pelo braço coletor nos tempos: 6 e 24 horas. Para cada tempo, os 10mL de líquido receptor foram totalmente retirados, pesados e imediatamente substituídos por 10mL de líquido novo. As alíquotas de líquido receptor foram filtradas em filtros de nylon (diâmetro de 17 mm e porosidade de $0,45\text{ }\mu\text{m}$) e quantificadas imediatamente após a coleta pelos métodos de CLAE anteriormente descritos, utilizando a equação da reta das curvas de calibração 4A.

4.2.5.3.3. Lavagem da superfície das células e retenção cutânea

Após 24 horas de difusão, a fim de avaliar as quantidades de EGCG e quercetina que não penetraram no estrato córneo, a superfície cutânea foi lavada de acordo com o seguinte procedimento:

- limpeza cuidadosa da superfície com a ajuda de uma haste flexível de algodão embebido na solução de lavagem (água/etanol, 50:50, pH 5,5);
- secagem cuidadosa da superfície com a ajuda de uma haste flexível de algodão seco;
- repetição deste procedimento uma vez.

Após este procedimento, as hastes flexíveis de algodão e a parte superior das células de difusão foram mergulhadas em 5,0 mL da solução de lavagem. Tais amostras foram objeto de extração durante 24 horas sob refrigeração e posteriormente foram filtradas e quantificadas pelos métodos de CLAE anteriormente descritos, utilizando a equação da reta das curvas de calibração 5A.

Para a avaliação da retenção cutânea, as biópsias de pele de cada célula foram retiradas e colocadas em série num papel alumínio e o estrato córneo foi separado por *tape stripping* com a ajuda de uma fita adesiva com a aplicação de uma pressão constante. Três pedaços de fita adesiva foram retirados de cada biópsia. Em seguida, a epiderme viável e a derme foram separadas mecanicamente com o auxílio de pinças.

Os pedaços de fita adesiva onde estava aderido o estrato córneo foram objeto de extração por 0,8mL de metanol durante 24 horas e posteriormente filtradas em filtros de nylon e quantificadas pelos métodos de CLAE anteriormente descritos, utilizando a equação da reta das curvas de calibração 2A.

As amostras de epiderme e de derme foram colocadas em tubos Eppendorf® contendo 0,7 e 0,8 mL, respectivamente, de metanol e duas pequenas esferas de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro. Seguidamente os tubos foram submetidos à agitação por um moinho misturador durante respectivamente 20 e 40 minutos, a uma frequência de 30 oscilações/s. Em seguida, todas as amostras foram objeto de extração durante 24 horas e posteriormente filtradas em filtros de nylon e quantificadas pelos métodos de CLAE anteriormente descritos, utilizando a equação da reta das curvas de calibração 3A.

4.2.6 Avaliação da segurança por meio da avaliação da compatibilidade cutânea

Este estudo obteve a aceitação pelo Comitê de ética da empresa EVIC na França (Anexo 3) e teve por objetivo verificar a compatibilidade cutânea das formulações após uma única aplicação sobre a pele em condições oclusivas (apósito ou *patch*).

Avaliou-se a compatibilidade cutânea das seguintes formulações: veículo (formulação de nº 11), formulação contendo 6% do extrato de chá verde, formulação contendo 6% do extrato de *Ginkgo biloba*, formulação contendo 6% de cada extrato, formulação contendo EGCG, formulação contendo quercetina e formulação contendo rutina. As concentrações de EGCG, quercetina e rutina utilizadas nas formulações foram determinadas de acordo com a concentração destes flavonóides presentes nos extratos, de forma que em 100g da formulação houvesse uma quantidade de flavonóides presentes em 6g dos extratos (0,0405% de EGCG, 0,0069% de quercetina e 0,0045% de rutina).

Após a assinatura do Termo de consentimento, dez voluntários participaram deste estudo, sendo 8 homens com idades entre o 21 e 45 anos e 2 mulheres de 19 anos. Os produtos foram aplicados, de maneira randomizada, sobre cúpulas de alumínio (20µL em 1,0 cm² de diâmetro) de um *patch* (Epitest Ltd Oy). Este *patch* foi aplicado no dorso dos voluntários e retirado após 24 horas de contato (Figura 11).

Figura 11. Aplicação do *patch* no dorso dos voluntários.

A primeira leitura foi realizada 15 minutos e a segunda leitura 24 horas após a retirada do *patch*. As avaliações visuais das reações obtidas foram feitas de acordo com critérios propostos pelo ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) (MARZULLI; MAIBACH, 1976; FISCHER, 1995) (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios de avaliação propostos pelo ICDRG.

REAÇÃO	RESULTADO
0 – Ausente	Negativo (-)
1 - Eritema leve	Duvidoso (?)
2 - Eritema nítido	Positivo (+)
3 - Eritema + edema + pápulas	Positivo (++)
4 - Eritema + edema + pápulas + vesículas	Positivo (+++)

5 Resultados

5.1 Caracterização dos extratos vegetais

5.1.1 Determinação do espectro de absorção

O espectro de absorção dos extratos vegetais em estudo (Figura 12) mostrou uma curva com um pico máximo em 270nm para o extrato de CV e em 260nm para o extrato de GB, demonstrando que esses extratos não apresentam absorção significativa da luz nas regiões do UVA (320-400 nm) e do UVB (280-320 nm).

Figura 12. Varredura dos extratos de chá verde e *Ginkgo biloba* na região do ultravioleta (200 a 400nm).

5.1.2 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

Os valores referentes à quantidade de radicais livres produzida (AUC) pelo método da quimioluminescência dependente de luminol estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade de radicais livres produzida (AUC) pelo método da quimioluminescência dependente de luminol, quando presentes a quercetina, a rutina, a EGCG, o extrato de chá verde, o extrato de *Ginkgo biloba* e a associação dos extratos, bem como para o controle (n=3).

Amostra						
Controle	Quercetina	Rutina	EGCG	Extrato de chá verde	Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	Associação dos extratos
4,0070	3,1950	3,0580	3,8380	0,8199	3,6840	1,4580
4,0230	2,8830	2,9950	3,8730	1,7760	3,7900	1,3210
4,2200	2,7990	2,8560	3,4790	1,6720	3,5490	0,6503

Os dados experimentais obtidos no estudo do potencial antioxidante *in vitro* consistiram em 21 valores, correspondentes ao cruzamento dos valores obtidos de 7 amostras (controle, quercetina, rutina, EGCG, extrato de chá verde, extrato de *Ginkgo biloba* e associação dos extratos) X 3 repetições, dando o produto fatorial $7 \times 3 = 21$.

Os testes preliminares para verificação da normalidade da amostra obtida neste estudo revelaram que a distribuição não era normal, sendo assim, para a análise estatística, o teste selecionado para a melhor interpretação dos resultados obtidos foi um teste não paramétrico para dados não vinculados, específico para a comparação de mais de duas amostras entre si (Kruskal Wallis).

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 5 e na Figura 13, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 5 - Potencial antioxidante *in vitro*. EGCG: epigallocatequina-3-galato, CV: extrato de chá verde, GB: extrato de *Ginkgo biloba*, CV+GB: associação dos extratos Teste de Kruskal-Wallis, n=3.

Comparação entre as médias dos postos					
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
controle X quercetina	10,6667	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
controle X rutina	10,3333	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
controle X EGCG	4,0000	3,2654	4,5320	6,3024	5%
controle X CV	15,6667	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
controle X GB	5,0000	3,2654	4,5320	6,3024	1%
controle X CV+GB	17,3333	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
quercetina X rutina	0,3333	3,2654	4,5320	6,3024	ns
quercetina X EGCG	6,6667	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
quercetina X CV	5,0000	3,2654	4,5320	6,3024	1%
quercetina X GB	5,6667	3,2654	4,5320	6,3024	1%
quercetina X CV+GB	6,6667	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
rutina X EGCG	6,3333	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
rutina X CV	5,3333	3,2654	4,5320	6,3024	1%
rutina X GB	5,3333	3,2654	4,5320	6,3024	1%
rutina X CV+GB	7,0000	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
EGCG X CV	11,6667	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
EGCG X GB	1,0000	3,2654	4,5320	6,3024	ns
EGCG X CV+GB	13,3333	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
CV X GB	10,6667	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%
CV X CV+GB	1,6667	3,2654	4,5320	6,3024	ns
GB X CV+GB	12,3333	3,2654	4,5320	6,3024	0,1%

Figura 13. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos vegetais de chá verde (CV) e de *Ginkgo biloba* (GB) e da associação destes (CV+GB) pelo método de quimioluminescência dependente de luminol. Quercetina, rutina e EGCG foram utilizados como compostos padrões (n=3). Mediana e intervalo de confiança de 95%. Símbolos diferentes indicam valores estatisticamente diferentes

Os dados obtidos no estudo do potencial antioxidante *in vitro* com os compostos padrões demonstraram que, quando comparadas ao controle, a quercetina, a rutina e a EGCG apresentaram ação anti-radicais livres ($p < 0,05$), mostrando-se bons padrões para este estudo.

Por sua vez, os extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* também apresentaram atividade antioxidante quando comparados ao controle ($p < 0,01$), sendo que, quando estes extratos foram comparados, o chá verde foi o mais potente uma vez que os resultados de inibição para os dois extratos vegetais foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,01$). A associação dos dois extratos não provocou um efeito sinérgico na ação antioxidante observada para os extratos, uma vez que o efeito antioxidante observado para o extrato de chá verde foi estatisticamente equivalente ao efeito provocado pela associação de ambos os extratos.

5.2 Testes de estabilidade das formulações

5.2.1 Determinação do pH

Os valores de pH obtidos para as formulações estudadas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de pH das formulações estudadas.

Formulação de nº	Veículo	Veículo + associação dos extratos
1	7,20	6,98
2	7,04	6,60
3	5,54	5,36
4	6,52	6,06
5	7,04	6,65
6	7,10	6,55
7	6,20	6,00
8	5,30	5,23
9	4,74	4,94
10	4,46	4,96
11	4,80	5,03
12	4,38	4,62
13	4,65	4,83

A maioria das formulações objeto de estudo apresentou pH levemente ácido, sendo, portanto, compatíveis com o manto ácido da pele que apresenta pH entre 4,1 e 5,8 (SEGGER et al., 2007).

5.2.2 Centrifugação

A formulação de nº 3 apresentou diminuição brusca da consistência, após a adição dos extratos vegetais objeto de estudo, sendo por isso não submetida a esse teste. Todas as demais formulações foram submetidas à centrifugação e mostraram-se estáveis, visto que nenhuma delas apresentou separação de fases.

5.2.3 Estresse térmico

As formulações de nºs 1, 2 e 4 contendo o extrato de chá verde e a associação dos extratos, mostraram-se instáveis quando submetidas a 45°C, uma vez que estas formulações apresentaram escurecimento quando comparadas às formulações mantidas no ambiente.

As formulações de nºs 5 a 7, acrescidas de BHT, apresentaram escurecimento a 45°C. Já as formulações de nºs 8 a 13, acrescidas de metabissulfito de sódio, mostraram-se estáveis (sem alteração de cor quando submetidas a 45°C). Assim, as formulações de nºs 8 a 13 foram selecionadas para a etapa referente à análise sensorial.

5.3 Análise sensorial das formulações

As notas atribuídas, a cada formulação estudada, para os parâmetros: toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após cinco minutos da aplicação, estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8 a seguir.

Tabela 7 - Notas atribuídas pelas voluntárias às formulações de n^{os} 8 a 13 contendo a associação dos extratos vegetais para os parâmetros toque e pegajosidade e espalhabilidade e aparência na pele.

Formulações											
Toque e pegajosidade						Espalhabilidade e aparência na pele					
F8	F9	F10	F11	F12	F13	F8	F9	F10	F11	F12	F13
4	4	2	4	3	1	4	4	1	4	3	1
4	4	2	5	4	3	4	4	2	5	4	3
4	5	4	4	4	5	4	5	3	4	3	3
3	4	5	3	4	4	5	2	5	5	3	2
3	4	2	5	3	1	3	4	1	5	3	3
3	5	3	5	5	3	4	5	4	5	5	4
5	5	3	4	4	2	4	5	3	4	4	2
5	4	3	5	4	3	5	4	3	5	4	3
5	3	2	5	3	3	5	3	2	5	3	2
5	4	3	5	4	3	5	3	3	4	3	2
5	5	3	4	3	3	5	5	2	4	2	1
3	4	5	5	4	3	5	3	4	5	4	3
4	5	1	5	3	2	4	5	1	5	3	2
3	4	2	4	2	1	2	4	1	4	1	1
4	4	4	5	4	4	4	5	4	5	4	4
3	5	2	4	3	2	3	4	1	4	3	2
3	4	2	4	3	4	3	4	2	4	3	1
4	3	1	5	3	1	4	3	2	4	3	1
4	4	3	4	3	2	3	3	2	4	1	2
4	5	5	5	4	5	4	3	1	4	2	1
5	5	5	5	5	4	5	4	3	5	4	4
4	3	4	5	4	4	5	3	4	5	5	3
4	4	2	5	3	2	5	3	2	5	3	2
5	4	3	5	3	2	5	4	2	5	2	1
5	4	2	5	3	1	5	5	1	4	4	1

Tabela 8 - Notas atribuídas pelas voluntárias às formulações de n^{os} 8 a 13 contendo a associação dos extratos vegetais para os parâmetros sensação imediata e sensação após 5 minutos da aplicação.

Formulações											
Sensação imediata						Sensação após 5 minutos da aplicação					
F8	F9	F10	F11	F12	F13	F8	F9	F10	F11	F12	F13
4	3	2	4	3	2	4	2	2	4	3	2
4	4	2	5	4	3	5	5	3	5	5	3
4	4	4	4	4	4	5	5	4	5	5	4
4	3	5	5	3	2	4	3	5	4	3	2
5	3	2	5	3	1	5	3	3	5	4	2
5	4	5	5	5	3	4	5	4	4	5	3
4	4	3	4	4	3	4	5	3	4	4	3
4	4	4	4	4	4	5	3	3	5	3	3
5	4	3	5	4	3	5	5	5	5	5	4
5	3	3	4	4	1	4	4	4	4	5	3
5	5	2	5	3	3	4	5	5	4	3	3
3	4	5	5	4	5	5	4	3	5	4	3
4	5	1	5	3	2	5	4	1	5	4	1
2	3	1	5	1	1	2	2	2	5	2	1
4	4	4	5	4	4	5	5	4	5	5	5
2	5	1	5	4	3	3	2	1	5	4	3
2	5	2	4	3	2	3	4	4	5	4	4
3	2	2	5	3	1	5	4	2	5	4	4
4	3	3	3	3	2	2	3	4	4	3	3
3	5	5	3	3	4	5	3	3	5	3	2
5	4	4	5	4	4	4	4	5	4	5	5
4	4	4	3	5	4	5	4	4	5	4	4
4	3	2	4	4	3	5	3	3	5	5	4
4	4	3	5	3	2	5	4	4	5	3	3
5	4	3	5	4	1	3	4	2	3	4	1

Os dados experimentais obtidos na avaliação sensorial consistiram em 150 valores, correspondentes ao cruzamento dos valores obtidos com a aplicação das 6 formulações (F8, F9, F10, F11, F12, F13) X 25 repetições, dando o produto fatorial $6 \times 25 = 150$.

Os testes preliminares para verificação da normalidade da amostra obtida neste estudo revelaram que a distribuição não era normal, sendo assim, o teste selecionado para a melhor interpretação dos resultados obtidos foi um teste não-paramétrico para dados vinculados, específico para a comparação de mais de duas amostras entre si (Friedman).

Os resultados do teste de Friedman para os diferentes parâmetros avaliados na análise sensorial estão apresentados na Tabelas de 9 a 12 e na Figura 14, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 9 - Notas atribuídas pelas voluntárias para o parâmetro toque e pegajosidade após a aplicação das formulações. Teste de Friedman, n=25 (diferenças entre postos).

Comparação entre as médias dos postos

Amostras comparadas (comparações duas a duas)	Diferenças entre postos	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
F8 X F9	9,5000	24,0747	37,7554	64,3209	ns
F8 X F10	39,0000	24,0747	37,7554	64,3209	1%
F8 X F11	26,0000	24,0747	37,7554	64,3209	5%
F8 X F12	20,0000	24,0747	37,7554	64,3209	ns
F8 X F13	45,5000	24,0747	37,7554	64,3209	1%
F9 X F10	48,5000	24,0747	37,7554	64,3209	1%
F9 X F11	16,5000	24,0747	37,7554	64,3209	ns
F9 X F12	29,5000	24,0747	37,7554	64,3209	5%
F9 X F13	55,0000	24,0747	37,7554	64,3209	1%
F10 X F11	65,0000	24,0747	37,7554	64,3209	0,1%
F10 X F12	19,0000	24,0747	37,7554	64,3209	ns
F10 X F13	6,5000	24,0747	37,7554	64,3209	ns
F11 X F12	46,0000	24,0747	37,7554	64,3209	1%
F11 X F13	71,5000	24,0747	37,7554	64,3209	0,1%
F12 X F13	25,5000	24,0747	37,7554	64,3209	5%

Tabela 10 - Notas atribuídas pelas voluntárias para o parâmetro espalhabilidade e aparência na pele após a aplicação das formulações. Teste de Friedman, n=25 (diferenças entre postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparações duas a duas)	Diferenças entre postos	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
F8 X F9	9,0000	19,0613	29,8930	50,9264	ns
F8 X F10	65,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F8 X F11	15,0000	19,0613	29,8930	50,9264	ns
F8 X F12	36,0000	19,0613	29,8930	50,9264	1%
F8 X F13	73,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F9 X F10	56,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F9 X F11	24,0000	19,0613	29,8930	50,9264	5%
F9 X F12	27,0000	19,0613	29,8930	50,9264	5%
F9 X F13	64,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F10 X F11	80,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F10 X F12	29,0000	19,0613	29,8930	50,9264	5%
F10 X F13	8,0000	19,0613	29,8930	50,9264	ns
F11 X F12	51,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F11 X F13	88,0000	19,0613	29,8930	50,9264	0,1%
F12 X F13	37,0000	19,0613	29,8930	50,9264	1%

Tabela 11 - Notas atribuídas pelas voluntárias para o parâmetro sensação imediata após a aplicação das formulações. Teste de Friedman, n=25 (diferenças entre postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparações duas a duas)	Diferenças entre postos	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
F8 X F9	10,5000	24,4346	38,3199	65,2826	ns
F8 X F10	39,0000	24,4346	38,3199	65,2826	1%
F8 X F11	17,0000	24,4346	38,3199	65,2826	ns
F8 X F12	16,0000	24,4346	38,3199	65,2826	ns
F8 X F13	50,5000	24,4346	38,3199	65,2826	1%
F9 X F10	28,5000	24,4346	38,3199	65,2826	5%
F9+ X F11	27,5000	24,4346	38,3199	65,2826	5%
F9 X F12	5,5000	24,4346	38,3199	65,2826	ns
F9 X F13	40,0000	24,4346	38,3199	65,2826	1%
F10 X F11	56,0000	24,4346	38,3199	65,2826	1%
F10 X F12	23,0000	24,4346	38,3199	65,2826	ns
F10 X F13	11,5000	24,4346	38,3199	65,2826	ns
F11 X F12	33,0000	24,4346	38,3199	65,2826	5%
F11 X F13	67,5000	24,4346	38,3199	65,2826	0,1%
F12 X F13	34,5000	24,4346	38,3199	65,2826	5%

Tabela 12 - Notas atribuídas pelas voluntárias para o parâmetro sensação após 5 minutos da aplicação das formulações. Teste de Friedman, n=25 (diferenças entre postos).

Comparação entre as médias dos postos					
Amostras comparadas (comparações duas a duas)	Diferenças entre postos	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
F8 X F9	17,5000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F8 X F10	35,0000	25,0898	39,3473	67,0329	5%
F8 X F11	14,5000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F8 X F12	10,0000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F8 X F13	54,0000	25,0898	39,3473	67,0329	1%
F9 X F10	17,5000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F9 X F11	32,0000	25,0898	39,3473	67,0329	5%
F9 X F12	7,5000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F9 X F13	36,5000	25,0898	39,3473	67,0329	5%
F10 X F11	49,5000	25,0898	39,3473	67,0329	1%
F10 X F12	25,0000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F10 X F13	19,0000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F11 X F12	24,5000	25,0898	39,3473	67,0329	ns
F11 X F13	68,5000	25,0898	39,3473	67,0329	0,1%
F12 X F13	44,0000	25,0898	39,3473	67,0329	1%

Figura 14. Gráficos referentes às notas atribuídas para os parâmetros toque e pegajosidade (A), espalhabilidade e aparência na pele (B), sensação imediata (C) e sensação após 5 minutos da aplicação (D). Mediana e intervalo de confiança de 95%.

A análise estatística mostrou que a formulação de nº 8, a base de Hostacerin SAF® e Aristoflex AVC®, como agente de consistência e a formulação de nº 11, a base de Hostacerin SAF® e Amigel®, como agente de consistência, obtiveram notas estatisticamente mais altas do que as demais formulações, sendo que no parâmetro toque e pegajosidade a formulação de nº 11 obteve notas estatisticamente maiores do que a formulação de nº 8. Assim, a formulação de nº 11 foi selecionada para os estudos de eficácia *in vivo*, penetração e segurança.

5.4 Avaliação pré-clínica da eficácia fotoprotetora

Os dados experimentais obtidos na avaliação de cada parâmetro (índice de eritema, perda transepidermica de água, contagem de células de queimadura solar, espessura da epiderme viável e contagem do número de camadas de células nucleadas da epiderme viável) estão apresentados a seguir (Tabelas 13, 15, 17, 19 e 20) e consistiram em 48 valores, correspondentes ao cruzamento dos valores

obtidos dos 2 controles (CI e CNI) e das 4 formulações (V, CV, GB e CV+GB) X 8 repetições, dando o produto fatorial $6 \times 8 = 48$.

Os testes preliminares para verificação da normalidade da amostra obtida nestes estudos revelaram que a maioria das distribuições não era normal, sendo assim, para a análise estatística, o teste selecionado para a melhor interpretação dos resultados obtidos foi um teste não paramétrico para dados não vinculados, específico para a comparação de mais de duas amostras (Kruskal Wallis).

5.4.1 Medida do eritema

Os resultados referentes às médias dos índices de eritema, obtidos após 20 horas da aplicação das formulações seguida da irradiação, estão apresentados na Tabela 13 a seguir.

Tabela 13 - Valores de índice de eritema obtidos após 20 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI).

Grupos irradiados					CNI
V	CV	GB	CV+GB	CI	
605,23	586,83	587,50	601,16	607,42	576,50
605,33	598,50	596,00	580,37	614,00	573,00
601,42	589,83	580,28	578,16	609,14	595,83
598,24	602,16	583,27	594,06	608,42	592,16
599,42	593,16	597,53	593,27	607,83	575,66
608,66	594,33	594,26	586,50	613,24	584,66
598,33	598,66	582,50	585,83	605,80	597,00
611,00	597,00	589,66	596,33	608,42	586,83

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para os valores de índice de eritema estão apresentados na Tabela 14 e na Figura 15, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 14 - Índices de eritema obtidos após 20 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Teste de Kruskal-Wallis, n=8.

Comparação entre as médias dos postos					
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CN X CI	31,3750	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
CN X V	24,7500	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
CN X CV	12,5000	8,1485	10,8959	14,2955	1%
CN X GB	3,5000	8,1485	10,8959	14,2955	ns
CN X CV+GB	4,3750	8,1485	10,8959	14,2955	ns
CI X V	6,6250	8,1485	10,8959	14,2955	ns
CI X CV	18,8750	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
CI X GB	27,8750	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
CI X CV+GB	27,0000	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
V X CV	12,2500	8,1485	10,8959	14,2955	1 %
V X GB	21,2500	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
V X CV+GB	20,3750	8,1485	10,8959	14,2955	0,1 %
CV X GB	9,0000	8,1485	10,8959	14,2955	5 %
CV X CV+GB	8,1250	8,1485	10,8959	14,2955	ns
GB X CV+GB	0,8750	8,1485	10,8959	14,2955	ns

Figura 15. Valores de índice de eritema obtidos após 20 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Mediana e intervalo de confiança de 95%.

Significativo em relação ao grupo controle não irradiado ($p < 0,01$)

* Significativo em relação ao grupo controle irradiado ($p < 0,001$)

A análise estatística dos dados obtidos mostrou que ocorreu um aumento significativo do índice de eritema nas áreas irradiadas (controle irradiado) em relação às áreas não-irradiadas (controle não-irradiado) ($p < 0,001$) (Tabela 14 e Figura 15).

Verificou-se que somente as formulações acrescidas de GB ou de CV ou da associação desses extratos, protegeram contra a formação de eritema induzido pela radiação UV, quando comparadas ao controle irradiado ($p < 0,001$) (Tabela 14 e Figura 15).

A área tratada com a associação dos extratos (CV+GB) apresentou valores de eritema estatisticamente equivalentes aos valores obtidos na área tratada com GB, sendo que estes dois grupos foram também estatisticamente equivalentes ao controle não-irradiado, demonstrando que GB apresentou um efeito mais pronunciado na proteção contra a formação de eritema (Tabela 14 e Figura 15).

5.4.2 Medida da perda transepidermica de água (TEWL)

Os resultados referentes às médias da perda transepidermica de água, obtidos após 20 horas da aplicação das formulações seguida da irradiação, estão apresentados na Tabela 15 a seguir.

Tabela 15 - Valores de perda transepidermica de água (TEWL) obtidos após 20 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI).

Grupos irradiados					CNI
V	CV	GB	CV+GB	CI	
17,52	10,86	11,53	10,90	21,15	6,72
17,36	7,00	9,04	9,16	26,26	5,69
22,70	14,02	7,36	7,39	23,54	7,74
14,89	11,42	9,05	8,35	24,40	7,67
18,07	8,84	4,46	2,97	27,19	6,76
30,13	7,22	4,82	7,91	29,54	7,02
20,37	8,84	5,85	8,38	26,40	6,35
21,10	14,23	5,77	3,18	26,19	6,73

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para os valores de TEWL estão apresentados na Tabela 16 e na Figura 16, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 16 - Perda transepidérmica de água (TEWL) obtida após 20 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Teste de Kruskal-Wallis, n=8.

Comparação entre as médias dos postos					
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CN X CI	32,0000	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
CN X V	26,2500	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
CN X CV	12,3750	7,4114	9,9102	13,0023	1%
CN X GB	2,8750	7,4114	9,9102	13,0023	ns
CN X CV+GB	5,2500	7,4114	9,9102	13,0023	ns
CI X V	5,7500	7,4114	9,9102	13,0023	ns
CI X CV	19,6250	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
CI X GB	29,1250	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
CI X CV+GB	26,7500	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
V X CV	13,8750	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
V X GB	23,3750	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
V X CV+GB	21,0000	7,4114	9,9102	13,0023	0,1 %
CV X GB	9,5000	7,4114	9,9102	13,0023	5 %
CV X CV+GB	7,1250	7,4114	9,9102	13,0023	ns
GB X CV+GB	2,3750	7,4114	9,9102	13,0023	ns

Figura 16. Valores de perda transepidérmica de água (TEWL) obtidos após 20 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Mediana e intervalo de confiança de 95%.

Significativo em relação ao grupo controle não irradiado ($p<0,01$)

* Significativo em relação ao grupo controle irradiado ($p<0,001$)

A análise estatística dos dados obtidos mostrou que ocorreu um aumento significativo da perda transepidérmica de água nas áreas irradiadas (controle irradiado) em relação às áreas não-irradiadas (controle não-irradiado) ($p<0,001$), mostrando que a radiação UV causou danos na função barreira da pele (Tabela 16 e Figura 16).

Apenas as formulações acrescidas de CV ou de GB ou da associação desses extratos, protegeram a pele contra danos na função barreira, induzidos pela radiação UV, uma vez que diminuíram os valores de TEWL, quando comparadas ao controle irradiado ($p<0,001$) (Tabela 16 e Figura 16).

A área tratada com a associação dos extratos (CV+GB) apresentou valores de TEWL estatisticamente equivalentes aos valores obtidos na área tratada com GB, sendo que estes dois grupos foram também estatisticamente equivalentes ao controle não-irradiado, demonstrando que GB também apresentou um efeito mais pronunciado na proteção da barreira cutânea (Tabela 16 e Figura 16).

5.4.3 Contagem de células de queimadura solar (CQS)

Os resultados referentes à contagem de células de queimadura solar, obtidos após 24 horas da aplicação das formulações seguida da irradiação, estão apresentados na Tabela 17 a seguir.

Tabela 17 - Número de células de queimadura solar obtido após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI).

Grupos irradiados					CNI
V	CV	GB	CV+GB	CI	
46,0	10,7	36,0	17,0	70,0	1,8
65,7	18,0	48,5	11,0	68,0	1,5
34,3	13,0	51,0	15,0	42,0	2,0
35,0	10,0	44,6	17,0	37,0	1,2
36,0	18,0	36,8	17,8	41,0	0,8
52,0	16,0	10,0	19,6	56,0	0,4
77,0	27,0	51,4	31,0	69,0	1,0
61,0	32,0	45,2	34,6	77,0	0,6

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a contagem de CQS estão apresentados na Tabela 18 e na Figura 17, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 18 - Número de células de queimadura solar obtido após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Teste de Kruskal-Wallis, n=8.

Comparação entre as médias dos postos					
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CN X CI	35,4375	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CN X V	31,6250	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CN X CV	12,1875	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CN X GB	26,8750	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CN X CV+GB	13,8750	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CI X V	3,8125	6,7092	8,9713	11,7704	ns
CI X CV	23,2500	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CI X GB	8,5625	6,7092	8,9713	11,7704	5 %
CI X CV+GB	21,5625	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
V X CV	19,4375	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
V X GB	4,7500	6,7092	8,9713	11,7704	ns
V X CV+GB	17,7500	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CV X GB	14,6875	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %
CV X CV+GB	1,6875	6,7092	8,9713	11,7704	ns
GB X CV+GB	13,0000	6,7092	8,9713	11,7704	0,1 %

Figura 17. Número de células de queimadura solar obtido após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV – formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Mediana e intervalo de confiança de 95%.

Significativo em relação ao grupo controle não irradiado ($p < 0,001$)

* Significativo em relação ao grupo controle irradiado ($p < 0,05$)

A análise estatística dos dados obtidos mostrou que ocorreu um aumento significativo do número de células de queimadura solar (CQS) nas áreas irradiadas (controle irradiado) em relação às áreas não-irradiadas (controle não-irradiado) ($p < 0,001$) (Tabela 18 e Figura 17).

Apenas as formulações acrescidas de CV ou de GB ou da associação desses extratos, protegeram os queratinócitos contra danos causados pela radiação UV, o que foi demonstrado pela redução de CQS nas áreas que receberam estas formulações em relação ao controle irradiado ($p < 0,05$) (Tabela 18 e Figura 17).

A formulação contendo CV foi considerada mais efetiva na proteção contra a formação de CQS, uma vez que a região tratada com o GB apresentou valores estatisticamente diferentes da área tratada com CV ($p < 0,05$). A área tratada com a associação dos extratos (CV+GB) apresentou número de CQS estatisticamente equivalente à área tratada com CV, demonstrando que CV apresentou um efeito mais pronunciado na proteção dos queratinócitos (Tabela 18 e Figura 17).

5.4.4 Quantificação da hiperplasia da epiderme

Os resultados referentes à análise da espessura da epiderme viável e do número de camadas celulares obtidos após 24 horas da aplicação das formulações seguida da irradiação, estão apresentados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente e a seguir.

Tabela 19 - Espessura da epiderme viável (μm) obtida após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI).

Grupos irradiados					CNI
V	CV	GB	CV+GB	CI	
39,75	22,04	28,82	30,97	34,87	17,78
40,94	29,22	30,56	27,81	39,81	14,99
32,52	31,04	34,72	30,97	48,95	21,99
35,60	34,30	23,18	25,94	41,87	15,07
28,06	23,84	25,30	25,65	36,17	18,45
24,30	26,40	23,09	28,18	44,38	24,19
34,50	35,30	27,38	22,20	42,20	19,11
35,69	26,58	29,06	28,39	31,83	22,26

Tabela 20 - Número de camadas de células nucleadas da epiderme viável obtido após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI).

Grupos irradiados					CNI
V	CV	GB	CV+GB	CI	
3,90	2,83	2,90	3,27	3,97	2,20
4,57	3,70	3,33	2,70	4,37	1,73
4,00	3,80	3,47	3,12	5,10	2,33
4,23	3,27	2,10	2,90	4,63	1,87
3,03	2,23	2,83	2,80	3,13	2,47
3,40	2,10	2,60	3,30	4,37	2,70
4,23	3,30	2,57	1,90	4,07	2,30
4,60	2,57	2,87	2,93	3,73	2,43

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a espessura da epiderme viável estão apresentados na Tabela 21 e na Figura 18, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 21 - Espessura da epiderme viável obtida após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Teste de Kruskal-Wallis, n=8.

Comparação entre as médias dos postos					
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CN X CI	37,0000	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CN X V	28,2500	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CN X CV	17,8750	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CN X GB	16,0000	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CN X CV+GB	15,6250	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CI X V	8,7500	8,3511	11,1667	14,6509	5%
CI X CV	19,1250	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CI X GB	21,0000	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
CI X CV+GB	21,3750	8,3511	11,1667	14,6509	0,1%
V X CV	10,3750	8,3511	11,1667	14,6509	5%
V X GB	12,2500	8,3511	11,1667	14,6509	1%
V X CV+GB	12,6250	8,3511	11,1667	14,6509	1%
CV X GB	1,8750	8,3511	11,1667	14,6509	ns
CV X CV+GB	2,2500	8,3511	11,1667	14,6509	ns
GB X CV+GB	0,3750	8,3511	11,1667	14,6509	ns

Figura 18. Espessura da epiderme viável obtida após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV – formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Mediana e intervalo de confiança de 95%.

Significativo em relação ao grupo controle não irradiado ($p < 0,001$)

* Significativo em relação ao grupo controle irradiado ($p < 0,05$)

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis para o número de camadas de células nucleadas da epiderme viável estão apresentados na Tabela 22 e na Figura 19, na forma de gráfico tipo colunas agrupadas.

Tabela 22 - Número de camadas de células nucleadas da epiderme viável obtido após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV - formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Teste de Kruskal-Wallis, n=8.

Comparação entre as médias dos postos					
Grupos comparados (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CN X CI	31,3125	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
CN X V	29,4375	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
CN X CV	10,5625	8,9037	11,9057	15,6205	5%
CN X GB	11,0000	8,9037	11,9057	15,6205	5%
CN X CV+GB	11,8125	8,9037	11,9057	15,6205	5%
CI X V	1,8750	8,9037	11,9057	15,6205	ns
CI X CV	20,7500	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
CI X GB	20,3125	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
CI X CV+GB	19,5000	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
V X CV	18,8750	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
V X GB	18,4375	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
V X CV+GB	17,6250	8,9037	11,9057	15,6205	0,1%
CV X GB	0,4375	8,9037	11,9057	15,6205	ns
CV X CV+GB	1,2500	8,9037	11,9057	15,6205	ns
GB X CV+GB	0,8125	8,9037	11,9057	15,6205	ns

Figura 19. Número de camadas de células nucleadas da epiderme viável obtido após 24 horas da aplicação das formulações objeto de estudo (V – veículo, CV – formulação contendo extrato de chá verde, GB - formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e CV+GB - formulação contendo a associação dos extratos) e irradiação dos camundongos sem pêlo, bem como dos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). Mediana e intervalo de confiança de 95%.

Significativo em relação ao grupo controle não irradiado ($p < 0,05$)

* Significativo em relação ao grupo controle irradiado ($p < 0,001$)

Na análise histométrica verificou-se um aumento significativo tanto da espessura ($p < 0,001$), quanto do número de camadas de células nucleadas da epiderme viável ($p < 0,001$) nas áreas irradiadas (controle irradiado) em relação às áreas não-irradiadas (controle não-irradiado), sendo assim, a radiação UV provocou uma hiperplasia da epiderme para reposição de células danificadas (Tabelas 21 e 22 e Figuras 18 e 19).

Todas as formulações acrescidas dos extratos objeto de estudo protegeram a pele contra a hiperplasia da epiderme, o que foi evidenciado na redução tanto da espessura quanto do número de camadas da epiderme viável quando comparadas ao controle irradiado ($p < 0,001$). Quando comparadas entre si, não foram observadas diferenças estatísticas entre as formulações contendo CV ou GB ou a associação desses extratos vegetais, tanto para a espessura, quanto para o número de camadas de células nucleadas (Tabelas 21 e 22 e Figuras 18 e 19).

5.4.5 Análise histopatológica

5.4.5.1 Descrição da pele do animal de experimentação (controle não-irradiado)

A epiderme do camundongo sem pêlo (controle não irradiado) é do tipo pavimentoso estratificado queratinizado, constituída de queratinócitos. A camada basal ou germinativa é constituída de uma única camada de queratinócitos cúbicos ou cilíndricos e esta separada da derme pela membrana basal. Observa-se a presença de mais de uma camada epidérmica que pode se tratar da camada espinhosa ou granulosa, não sendo possível uma identificação clara. A camada córnea é a mais superficial da epiderme, sendo formada por células muito planas e anucleadas, semelhantes a escamas. A observação dessa camada é dificultada devido ao seu desprendimento da epiderme, o que ocorre devido à técnica de preparação do material histológico (Figura 20A).

A derme está constituída por tecido conjuntivo fibroso celular, rico em cistos, vasos sanguíneos, nervos e fibras colágenas (Figura 20B).

5.4.5.2 Descrição da pele do animal de experimentação submetido à irradiação (controle irradiado)

Os animais que não receberam nenhuma formulação e foram irradiados apresentaram hiperplasia da epiderme, um grande número de células apoptóticas e células basais arredondadas e com núcleo grande. A camada espinhosa apresentou-se mais espessa, com desarranjo celular e núcleos claros. A camada granulosa continha grânulos de querato-hialina grandes, espessos e volumosos, caracterizando-se como um estímulo para produção de querato-hialina (Figura 21A).

A derme apresentou-se bem densa e corada, com fibras colágenas hipertróficas. Observou-se também processo inflamatório na região subepitelial e em algumas regiões mais profundas da derme (Figura 21B).

5.4.5.3 Grupo que recebeu a aplicação da formulação veículo e irradiação

Os animais que receberam a formulação veículo apresentaram hiperplasia da epiderme e um grande número de células apoptóticas. A camada espinhosa apresentou-se mais espessa e a camada granulosa continha grânulos de querato-

hialina grandes, espessos e volumosos. Observou-se também desarranjo celular nas camadas espinhosa e granulosa (Figura 22A).

A derme apresentou-se bem densa e corada, com fibras colágenas hipertróficas. Observou-se processo inflamatório na região subepitelial e nas regiões mais profundas da derme, além de vasos sanguíneos hiperêmicos (Figura 22B).

5.4.5.4 Grupo que recebeu a aplicação da formulação contendo extrato de chá verde e irradiação

A epiderme dos animais que receberam a formulação contendo o extrato de chá verde apresentou uma hiperplasia reduzida quando comparada com os grupos controle irradiado e veículo. O desarranjo da camada granulosa não foi tão evidente como nos grupos anteriores e poucas células apoptóticas foram observadas. Além disso, a camada córnea apresentou-se mais espessa (Figura 23A).

A derme continha fibras colágenas espessas nas camadas mais profundas e fibras mais finas na região subepitelial. Em geral não foi observado processo inflamatório (Figura 23B).

5.4.5.5 Grupo que recebeu a aplicação da formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* e irradiação

A epiderme dos animais que receberam a formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba* apresentou-se fina e com a camada córnea fina e desgarrada. A camada granulosa apresentou-se presente com grânulos de querato-hialina. Observou-se desarranjo celular e células apoptóticas (Figura 24A).

A derme apresentou fibras colágenas espessas nas camadas mais profundas e fibras colágenas mais finas na região subepitelial. Verificou-se também a presença de infiltrado inflamatório logo abaixo da epiderme (Figura 24B).

5.4.5.6 Grupo que recebeu a aplicação da formulação contendo associação dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* e irradiação

A epiderme dos animais que receberam a formulação contendo a associação dos dois extratos em estudo apresentou-se fina e com células apoptóticas. A camada córnea apresentou espessura considerada normal (Figura 25A).

A derme apresentou fibras colágenas espessas nas camadas mais profundas e fibras mais finas na região subepitelial. Observou-se também pequena quantidade de células inflamatórias na região logo abaixo da epiderme (Figura 25B).

A)

B)

Figura 20. Aspecto histológico da pele do camundongo sem pêlo do grupo controle não-irradiado. A) epiderme (aumento inicial de 100x) B) notar fibras colágenas densas e numerosas (aumento inicial de 20x).

A)

B)

Figura 21. Aspecto histológico da pele do camundongo sem pêlo do grupo controle irradiado. A) epiderme – notar hiperplasia e células de queimadura solar (aumento inicial de 100x). B) notar fibras colágenas hipertróficas e processo inflamatório nas regiões subepitelial e profunda (aumento inicial de 20x). As setas indicam CQS.

A)

B)

Figura 22. Aspecto histológico da pele do camundongo sem pêlo do grupo que recebeu a formulação veículo. A) epiderme – notar hiperplasia e células de queimadura solar (aumento inicial de 100x). B) notar fibras colágenas hipertróficas e processo inflamatório nas regiões subepitelial e profunda (aumento inicial de 20x). As setas indicam CQS.

A)

B)

Figura 23. Aspecto histológico da pele do camundongo sem pêlo do grupo que recebeu a formulação contendo o extrato de chá verde. A) epiderme – notar redução da hiperplasia (aumento inicial de 100x). B) notar fibras colágenas espessas nas camadas mais profundas e fibras mais finas na região subepitelial e ausência de processo inflamatório (aumento inicial de 20x).

A)

B)

Figura 24. Aspecto histológico da pele do camundongo sem pêlo do grupo que recebeu a formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba*. A) epiderme – notar epitélio fino e células de queimadura solar (aumento inicial de 100x). B) notar fibras colágenas espessas nas camadas mais profundas e fibras mais finas na região subepitelial e processo inflamatório na região subepitelial (aumento inicial de 20x). As setas indicam CQS.

A)

B)

Figura 25. Aspecto histológico da pele do camundongo sem pêlo do grupo que recebeu a formulação contendo a associação dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba*. A) epiderme – notar epitélio fino (aumento inicial de 100x). B) notar fibras colágenas espessas nas camadas mais profundas e fibras mais finas na região subepitelial e pequena quantidade de células inflamatórias na região subepitelial (aumento inicial de 20x). As setas indicam CQS.

5.5 Estudos de liberação e penetração cutânea *in vitro*

Os estudos de liberação e penetração cutânea foram realizados com a formulação de n° 11 adicionada de 6% extrato de chá verde ou de 6% do extrato de *Ginkgo biloba*. As metodologias analíticas utilizadas para avaliar estes estudos foram desenvolvidas e validadas como descrito a seguir.

5.5.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de CLAE para a dosagem dos flavonóides nos extratos vegetais

5.5.1.1 Separação dos flavonóides dos extratos vegetais

Os cromatogramas dos padrões (flavonóides) e dos extratos vegetais estão apresentados a seguir nas Figuras de 26 a 29.

Figura 26. Cromatograma da EGCG (40 µg/mL). Método E. Tempo de retenção: 11,26 minutos.

Figura 27. Cromatograma do extrato de chá verde (5000 µg/mL). Método E. Tempos de retenção: 2,64; 3,44; 3,74; 4,46; 5,34; 8,00; 9,01; 10,53; 11,15 (EGCG), 12,45; 13,88; 14,55 e 15,43 minutos.

Figura 28. Cromatograma da quercetina (20 µg/mL). Método Q. Tempo de retenção: 14,64 minutos.

Figura 29. Cromatograma do extrato de *Ginkgo biloba* (5000 µg/mL). Método Q. Tempos de retenção: 2,28 (rutina); 3,36; 3,96; 5,67; 7,17 e 14,88 (quercetina) minutos.

Analisando-se os tempos de retenção observados para a EGCG e a quercetina, puras ou quando presentes nos extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*, respectivamente, foi possível considerar ambos os métodos analíticos específicos para a dosagem destes flavonóides nos extratos vegetais em estudo.

5.5.1.2 Pesquisa de interferentes: seletividade

Os cromatogramas do metanol puro, da fita adesiva, da epiderme, da derme e do creme (veículo), assim como dos líquidos receptores, e da solução de lavagem estão apresentados a seguir nas Figuras de 30 a 43.

Figura 30. Cromatograma do metanol puro. Método E. Tempos de retenção: 2,53; 3,30 e 3,54 minutos.

Figura 31. Cromatograma do metanol puro. Método Q. Tempos de retenção: 2,57; 3,12 e 3,29 minutos.

Figura 32. Cromatograma da fita adesiva. Método E. Tempos de retenção: 2,82; 3,72 e 3,94 minutos.

Figura 33. Cromatograma da fita adesiva. Método Q. Tempos de retenção: 2,24 e 3,29 minutos.

Figura 34. Cromatograma da epiderme da pele caucasiana utilizada no estudo. Método E. Tempos de retenção: 2,55; 3,39; 3,46; 4,74; 7,37; 8,80; 10,12; 12,88 e 13,91 minutos.

Figura 35. Cromatograma da epiderme da pele caucasiana utilizada no estudo. Método Q. Tempos de retenção: 2,25; 2,56; 3,13 e 3,35 minutos.

Figura 36. Cromatograma da derme da pele caucasiana utilizada no estudo. Método E. Tempos de retenção: 2,53; 2,63; 2,94; 3,39; 3,47; 4,68; 7,33; 9,10; 10,19; 13,41 e 15,46 minutos.

Figura 37. Cromatograma da derme da pele caucasiana utilizada no estudo. Método Q. Tempos de retenção: 2,25; 2,56; 3,12 e 3,34 minutos.

Figura 38. Cromatograma do creme (veículo). Método E. Tempos de retenção: 2,84 e 3,95 minutos.

Figura 39. Cromatograma do creme (veículo). Método Q. Tempos de retenção: 2,47 e 3,22 minutos.

Figura 40. Cromatograma do tampão citrato pH 5,5 (líquido receptor para a formulação contendo o extrato de chá verde). Método E. Tempo de retenção: 2,06 minutos.

Figura 41. Cromatograma do tampão citrato pH 5,5 + 0,5% de polisorbato 20 (líquido receptor para a formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba*). Método Q. Tempos de retenção: 2,10; 2,73 e 3,10 minutos.

Figura 42. Cromatograma da solução de lavagem (água/etanol, 50:50 pH 5,5). Método E. Tempos de retenção: 2,94; 3,17 e 3,75 minutos.

Figura 43. Cromatograma da solução de lavagem (água/etanol, 50:50 pH 5,5). Método Q. Tempos de retenção: 2,59 e 3,12 minutos.

Analisando-se os cromatogramas do metanol puro, da fita adesiva, da epiderme, da derme, do creme, dos líquidos receptores e da solução de lavagem, observou-se a ausência de picos interferentes próximos aos tempos de retenção da EGCG (método E) e da quercetina (método Q). Sendo assim, foi possível considerar ambos os métodos analíticos seletivos para a análise destes flavonóides nos diferentes meios.

5.5.1.3 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram elaboradas com os dados obtidos a partir da análise das soluções de EGCG e de quercetina. Os dados são apresentados nas Figuras de 44 a 50.

Figura 44. Curvas de calibração da EGCG (A) e da quercetina (B) em metanol.

Figura 45. Curva de calibração da EGCG (A) em metanol contendo fita adesiva e efeito da adição da fita adesiva na curva de calibração da EGCG em metanol (B).

A)

B)

Figura 46. Curva de calibração da quercetina (A) em metanol contendo fita adesiva e efeito da adição da fita adesiva na curva de calibração da quercetina em metanol (B).

A)

B)

Figura 47. Curva de calibração da EGCG (A) em metanol contendo pele caucasiana e efeito da adição de pele caucasiana na curva de calibração da EGCG em metanol (B).

A)

B)

Figura 48. Curva de calibração da quercetina (A) em metanol contendo pele caucasiana e efeito da adição de pele caucasiana na curva de calibração da quercetina em metanol (B).

A)

B)

Figura 49. Curvas de calibração da EGCG (A) e da quercetina (B) nos líquidos receptores.

A)

B)

Figura 50. Curvas de calibração da EGCG (A) e da quercetina (B) na solução de lavagem (água/etanol, 50:50 pH 5,5).

Analisando-se os dados acima, observou-se que há diferenças entre as curvas de calibração obtidas para a mesma substância (EGCG e quercetina), dependendo do meio em que esta se encontra.

5.5.1.4 Exatidão

Os dados de exatidão calculados em cada ponto (concentração) das curvas de calibração B estão apresentados nas Tabelas 23 a 32 a seguir.

Tabela 23 - Dados de exatidão da EGCG em metanol.

Concentração de EGCG (µg/mL)	Concentração de EGCG calculada (µg/mL)	Exatidão
0,3958	0,5070	128,10
0,3958	0,4838	122,22
0,3958	0,4782	120,81
0,5937	0,6350	106,94
0,5937	0,6639	111,81
0,5937	0,6475	109,05
1,1875	1,2128	102,13
1,1875	1,3276	111,80
1,1875	1,2619	106,26
2,375	2,2014	92,69
2,375	2,2592	95,12
2,375	2,5326	106,63
4,75	5,0314	105,92
4,75	4,8758	102,65
4,75	4,8311	101,71
9,5	10,0488	105,78
9,5	9,5131	100,14
9,5	10,4796	110,31
19	21,3441	112,34
19	21,3795	112,52
19	20,7402	109,16
38	43,0964	113,41
38	43,1600	113,58
38	43,1662	113,60

Tabela 24 - Dados de exatidão da quercetina em metanol.

Concentração de quercetina (µg/mL)	Concentração de quercetina calculada (µg/mL)	Exatidão
0,1484	0,2197	148,03
0,1484	0,2021	136,15
0,1484	0,2325	156,64
0,2968	0,3363	113,28
0,2968	0,3376	113,73
0,2968	0,3411	114,89
0,5937	0,6130	103,24
0,5937	0,6402	107,82
0,5937	0,6560	110,48
1,1875	1,2040	101,39
1,1875	1,2436	104,72
1,1875	1,2390	104,34
2,375	2,4376	102,64
2,375	2,4222	101,99
2,375	2,4422	102,83
4,75	4,7324	99,63
4,75	4,8208	101,49
4,75	4,8245	101,57
9,5	9,8988	104,20
9,5	9,9169	104,39
9,5	9,8959	104,17
19	19,5961	103,14
19	19,8631	104,54
19	19,8807	104,64

Tabela 25 - Dados de exatidão da EGCG em metanol contendo a fita adesiva.

Concentração de EGCG (µg/mL)	Concentração de EGCG calculada (µg/mL)	Exatidão
0,5937	0,7221	121,62
0,5937	0,8160	137,42
0,5937	0,8929	150,38
1,1875	1,2469	105,00
1,1875	1,2172	102,50
1,1875	1,2256	103,21
2,375	2,3333	98,25
2,375	2,2180	93,39
2,375	2,2770	95,87
4,75	4,4329	93,32
4,75	4,2786	90,08
4,75	4,2484	89,44
9,5	8,7220	91,81
9,5	8,6966	91,54
9,5	8,5476	89,97
19	17,5013	92,11
19	17,5449	92,34
19	17,7085	93,20
38	35,3926	93,14
38	35,2305	92,71
38	35,0921	92,35

Tabela 26 - Dados de exatidão da quercetina em metanol contendo a fita adesiva.

Concentração de quercetina (µg/mL)	Concentração de quercetina calculada (µg/mL)	Exatidão
0,1484	0,3896	262,50
0,1484	0,3870	260,69
0,1484	0,3902	262,85
0,2968	0,4794	161,49
0,2968	0,4916	165,59
0,2968	0,4945	166,56
0,5937	0,6816	114,80
0,5937	0,6797	114,48
0,5937	0,6813	114,74
1,1875	1,1642	98,03
1,1875	1,1948	100,62
1,1875	1,2105	101,93
2,375	2,1459	90,35
2,375	2,2097	93,04
2,375	2,1708	91,40
4,75	4,3080	90,70
4,75	4,2492	89,46
4,75	4,3179	90,90
9,5	8,5212	89,70
9,5	9,0169	94,92
9,5	8,4918	89,39
19	20,1549	106,08
19	19,9529	105,02
19	19,8453	104,45

Tabela 27 - Dados de exatidão da EGCG em metanol contendo a pele caucasiana.

Concentração de EGCG (µg/mL)	Concentração de EGCG calculada (µg/mL)	Exatidão
0,5937	0,7733	130,24
0,5937	0,9866	166,17
0,5937	1,0298	173,44
1,1875	1,3549	114,09
1,1875	1,3651	114,96
1,1875	1,3352	112,43
2,375	2,6896	113,24
2,375	2,6709	112,46
2,375	2,6067	109,76
4,75	4,0537	90,08
4,75	4,1599	92,44
4,75	4,2347	94,10
9,5	8,3288	87,67
9,5	8,5508	90,01
9,5	9,2527	97,40
19	16,2920	85,75
19	17,0813	89,90
19	17,1069	90,04
38	40,1485	105,65
38	39,8551	104,88
38	37,8989	99,73

Tabela 28 - Dados de exatidão da quercetina em metanol contendo a pele caucasiana.

Concentração de quercetina (µg/mL)	Concentração de quercetina calculada (µg/mL)	Exatidão
0,5937	0,81834	137,83
0,5937	0,79983	134,71
0,5937	0,79629	134,11
0,8906	0,98408	110,50
0,8906	0,99100	111,27
0,8906	1,02223	114,78
1,1875	1,24222	104,61
1,1875	1,23146	103,70
1,1875	1,24329	104,70
2,375	2,07484	87,36
2,375	2,05516	86,53
2,375	2,10810	88,76
4,75	4,20145	93,37
4,75	4,17464	92,77
4,75	4,37610	97,25
9,5	8,71387	91,72
9,5	8,86152	93,28
9,5	9,30184	97,91
19	17,85891	93,99
19	17,88060	94,11
19	18,31369	96,39

Tabela 29 - Dados de exatidão da EGCG no líquido receptor.

Concentração de EGCG (µg/mL)	Concentração de EGCG calculada (µg/mL)	Exatidão
0,5937	0,9771	164,57
0,5937	0,9878	166,37
0,5937	0,9851	165,92
1,1875	1,3535	113,98
1,1875	1,3568	114,25
1,1875	1,3513	113,80
2,375	2,4292	102,28
2,375	2,4225	102,00
2,375	2,4520	103,24
4,75	4,5355	95,48
4,75	4,6102	97,06
4,75	4,6032	96,91
9,5	9,1995	96,84
9,5	9,2822	97,71
9,5	9,1248	96,05
19	18,2051	95,82
19	18,2534	96,07
19	18,3500	96,58
38	38,4022	101,06
38	38,2593	100,68
38	38,8267	102,18

Tabela 30 - Dados de exatidão da quercetina no líquido receptor.

Concentração de quercetina (µg/mL)	Concentração de quercetina calculada (µg/mL)	Exatidão
0,1484	0,2213	149,08
0,1484	0,2233	150,40
0,1484	0,2129	143,42
0,2968	0,3327	112,08
0,2968	0,3391	114,21
0,2968	0,3403	114,64
0,5937	0,6236	105,03
0,5937	0,6160	103,75
0,5937	0,6386	107,55
1,1875	1,1570	97,43
1,1875	1,1725	98,74
1,1875	1,1535	97,14
2,375	2,1922	92,31
2,375	2,2008	92,66
2,375	2,2242	93,65
4,75	4,3726	92,05
4,75	4,3842	92,30
4,75	4,4625	93,95
9,5	8,9490	94,20
9,5	9,0252	95,00
9,5	8,9197	93,89
19	15,5057	81,61
19	17,5711	92,48
19	14,6806	77,27

Tabela 31 - Dados de exatidão da EGCG na solução de lavagem.

Concentração de EGCG (µg/mL)	Concentração de EGCG calculada (µg/mL)	Exatidão
0,5937	0,7806	131,48
0,5937	0,7869	132,52
0,5937	0,7760	130,69
1,1875	1,1930	100,46
1,1875	1,2018	101,21
1,1875	1,2000	101,05
2,375	2,4125	101,58
2,375	2,4115	101,54
2,375	2,3743	99,97
4,75	4,6993	104,43
4,75	4,7112	104,69
4,75	4,7289	105,09
9,5	9,0369	95,13
9,5	9,0026	94,76
9,5	9,0273	95,02
19	18,9644	99,81
19	19,2367	101,25
19	19,0672	100,35
38	38,7879	102,07
38	38,6066	101,60
38	38,6000	101,58

Tabela 32 - Dados de exatidão da quercetina na solução de lavagem.

Concentração de quercetina (µg/mL)	Concentração de quercetina calculada (µg/mL)	Exatidão
0,2968	0,4243	142,92
0,2968	0,4241	142,84
0,2968	0,4282	144,24
0,5937	0,6539	110,12
0,5937	0,6405	107,88
0,5937	0,6125	103,16
1,1875	1,0443	87,94
1,1875	1,0473	88,20
1,1875	1,0316	86,88
2,375	2,2691	95,54
2,375	2,2779	95,91
2,375	2,2392	94,28
4,75	4,5320	95,41
4,75	4,5355	95,48
4,75	4,5588	95,98
9,5	9,3695	98,63
9,5	9,2067	96,91
9,5	9,2969	97,86
19	18,7952	98,92
19	18,8402	99,16
19	18,8673	99,30

5.5.1.5 Limite de quantificação e intervalo de dosagem

Os resultados do limite de quantificação e intervalos de dosagem para a EGCG e a quercetina nos diferentes meios estão apresentados nas Tabelas 33 e 34 a seguir.

Tabela 33 - Valores obtidos para os limites de quantificação e intervalos de dosagem da EGCG.

Padrão	Limite de quantificação (µg/mL)	Intervalo de dosagem (µg/mL)
EGCG em metanol	0,5937	0,5937 - 40
EGCG em metanol contendo a fita adesiva	1,1875	1,1875 - 40
EGCG em metanol contendo a pele	1,1875	1,1875 - 40
EGCG no líquido receptor	1,1875	1,1875 - 40
EGCG na solução de lavagem	1,1875	1,1875 - 40

Tabela 34 - Valores obtidos para os limites de quantificação e intervalos de dosagem da quercetina.

Padrão	Limite de quantificação (µg/mL)	Intervalo de dosagem (µg/mL)
Quercetina em metanol	0,2968	0,2968 - 20
Quercetina em metanol contendo a fita adesiva	0,5937	0,5937 - 20
Quercetina em metanol contendo a pele	0,8906	0,8906 - 20
Quercetina no líquido receptor	0,2968	0,2968 - 9,5
Quercetina na solução de lavagem	0,5937	0,5937 - 20

Analisando-se os resultados obtidos para os limites de quantificação e intervalo de dosagem, foram observadas diferenças nestes resultados para a mesma substância (EGCG e quercetina), dependendo do meio em que esta se encontrava.

5.5.1.6 Precisão

Os valores de precisão estão apresentados nas Tabelas 35, 36 e 37.

Tabela 35 -Dados de repetibilidade dos métodos analíticos.

Padrão	Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Média (µg/mL)	Repetibilidade
EGCG	5,0	5,11	5,09	0,6336
	5,0	5,09		
	5,0	5,13		
	5,0	5,04		
	5,0	5,10		
	5,0	5,07		
Quercetina	5,0	4,89	4,93	0,7448
	5,0	4,92		
	5,0	4,95		
	5,0	4,90		
	5,0	4,97		
	5,0	4,97		

Tabela 36 - Dados de precisão intermediária do método E.

Padrão	Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Média (µg/mL)	Precisão intermediária
EGCG	5,0	5,11	5,11	0,6380
	5,0	5,09		
	5,0	5,13		
	5,0	5,04		
	5,0	5,10		
	5,0	5,07		
	5,0	5,11		
	5,0	5,15		
	5,0	5,14		
	5,0	5,14		
	5,0	5,16		
	5,0	5,11		
	5,0	5,12		
	5,0	5,09		
	5,0	5,16		
	5,0	5,10		
	5,0	5,07		
	5,0	5,09		

Tabela 37 - Dados de precisão intermediária do método Q.

Padrão	Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Média (µg/mL)	Precisão intermediária
Quercetina	5,0	4,89	4,92	0,8847
	5,0	4,92		
	5,0	4,95		
	5,0	4,90		
	5,0	4,97		
	5,0	4,97		
	5,0	4,87		
	5,0	4,90		
	5,0	4,91		
	5,0	4,87		
	5,0	4,87		
	5,0	4,84		
	5,0	4,96		
	5,0	4,90		
	5,0	4,97		
	5,0	4,96		
	5,0	4,94		
	5,0	4,97		

Os resultados obtidos de repetibilidade (0,6336 e 0,7448%) e de precisão intermediária (0,6380 e 0,8847%) para os dois métodos foram considerados aceitáveis visto que para a repetibilidade foram obtidos valores mais baixos que 2% e para a precisão intermediária, valores mais baixos que 4%.

5.5.1.7 Dosagem dos flavonóides nos extratos vegetais de chá verde e *Ginkgo biloba*

Os resultados obtidos para a quantificação de EGCG no extrato de chá verde e de quercetina no extrato de *Ginkgo biloba* estão apresentados nas Tabelas 38 e 39 a seguir.

Tabela 38 - Dados obtidos pela dosagem do extrato de chá verde (soluções contendo 5000 µg/mL de extrato vegetal).

Área dos picos	Área média	Concentração de EGCG calculada (µg/mL)	Concentração de EGCG no extrato (mg/g)	Concentração de EGCG no extrato (%)
Sol.1 30732	530764	33,785	6,757	0,6757
Sol. 2 30933				
Sol. 3 30627				

Tabela 39 - Dados obtidos pela dosagem do extrato de *Ginkgo biloba* (soluções contendo 5000 µg/mL de extrato vegetal).

Área dos picos	Área média	Concentração de quercetina calculada (µg/mL)	Concentração de quercetina no extrato (mg/g)	Concentração de quercetina no extrato (%)
Sol.1 28724				
Sol. 2 29103	328871	5,800	1,160	0,1160
Sol. 3 28786				

5.5.2 Estudo do perfil de liberação *in vitro*

Os resultados do estudo de liberação *in vitro* em membranas sintéticas obtidos para a formulação contendo o extrato de chá verde e para a formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba* estão apresentados nas Tabelas de 40 e 41 e nas Figuras de 51 a 54.

Tabela 40 - Liberação de EGCG da formulação de nº 11 contendo extrato de chá verde (média ± desvio padrão, n = 6 células).

Tempos (horas)	Quantidade liberada acumulada de EGCG (µg/cm ²)
1	9,1290 ± 0,3266
2	14,7673 ± 0,6081
3	19,2185 ± 0,7549
4	23,5214 ± 0,8572
6	28,1877 ± 1,2013

Figura 51. Perfil de liberação *in vitro* da EGCG através da membrana de acetato de celulose em função do tempo a partir da formulação de nº 11 contendo 6% de extrato de chá verde (n = 6). Dose infinita aplicada. (533mg da formulação / 68,82µg/cm² de EGCG), superfície de difusão da célula: 3,14 cm², volume receptor: 10mL.

Os resultados obtidos para a formulação contendo o extrato de chá verde mostraram uma boa liberação da EGCG já a partir da primeira hora, com uma tendência a chegar ao estado de equilíbrio a partir de 6 horas. No último tempo estudado pode-se observar uma liberação média de 40,96% da quantidade depositada e conseqüentemente, o gradiente de concentração através da membrana diminuiu (Figura 51).

Modelo de Ordem Zero:

Modelo de Pseudoprimeira Ordem:

Modelo de Primeira Ordem:

Figura 52. Modelos de cinética de liberação da EGCG das formulações contendo extrato de chá verde.

A avaliação dos modelos matemáticos (Figura 52) e a comparação dos coeficientes de correlação linear (r) obtidos permitiu concluir que a liberação de EGCG da formulação de nº 11 contendo o extrato de chá verde através da membrana de celulose segue o modelo de pseudoprimeira ordem, também conhecido como Modelo de Higuchi. Assim, a taxa de liberação foi obtida pela inclinação da reta do modelo de pseudoprimeira ordem, sendo de $13,391 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$ para o EGCG.

Utilizando a membrana de acetato de celulose, não se teve êxito em quantificar a quercetina liberada da formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba*, em nenhum dos tempos estudados. Assim, utilizou-se a membrana de polisulfona e os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

Tabela 41 - Liberação de quercetina da formulação de nº 11 contendo o extrato de *Ginkgo biloba* (média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$ células).

Tempos (horas)	Quantidade liberada acumulada de quercetina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
2	$0,7581 \pm 0,0232$
4	$1,2240 \pm 0,0352$
6	$1,6402 \pm 0,1572$
8	$1,8953 \pm 0,3149$

Figura 53. Perfil de liberação *in vitro* da quercetina através da membrana de polisulfona em função do tempo a partir da formulação de nº 11 contendo 6% de extrato de extrato de *Ginkgo biloba* ($n = 6$). Dose infinita aplicada. (533mg da formulação / $11,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de quercetina), superfície de difusão da célula: $3,14 \text{ cm}^2$, volume receptor: 10mL.

Os resultados obtidos com a membrana de polisulfona mostraram que esta membrana permitiu a liberação da quercetina para o líquido receptor, sendo possível verificar liberação da quercetina já a partir da segunda hora de estudo. Após 8 horas

de estudo houve uma leve tendência na redução da liberação, obtendo-se neste tempo uma liberação média de 16,05% da quantidade depositada (Figura 53)

Modelo de Ordem Zero:

Modelo de Pseudoprimeira Ordem:

Modelo de Primeira Ordem:

Figura 54. Modelos de cinética de liberação da quercetina das formulações contendo extrato de *Ginkgo biloba*.

A avaliação dos modelos matemáticos (Figura 53) e a comparação dos coeficientes de correlação linear (r) obtidos permitiu concluir que a liberação de quercetina da formulação de nº 11 contendo o extrato de *Ginkgo biloba* através da membrana de polisulfona segue o modelo de pseudoprimeira ordem, também conhecido como Modelo de Higuchi. Assim, a taxa de liberação foi obtida pela inclinação da reta do modelo de pseudoprimeira ordem, sendo de $0,8173 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$ para a quercetina (Figura 54).

5.5.3 Estudo de penetração cutânea *in vitro*

A espessura média dos fragmentos de pele dermatomizados das células que receberam as formulações contendo o extrato de chá verde foi de $202,00 \pm 19,67 \mu\text{m}$ e a das células que receberam as formulações contendo o extrato de *Ginkgo biloba* foi de $234,00 \pm 10,10 \mu\text{m}$.

Os resultados do estudo de penetração cutânea estão agrupados nas Tabelas de 42 a 45 e nas Figuras 55 e 56.

Tabela 42 - Quantidades ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de EGCG no líquido receptor ($n = 6$ células, ND = não detectável).

Flavonóide	Tempo (horas)	
	6	24
EGCG	ND	ND

Tabela 43 - Quantidades de EGCG encontradas nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável, epiderme, derme e pele total) e na solução de lavagem (expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e % da dose aplicada) após 24 horas de difusão (média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$ células, dose média de EGCG aplicada: $12,7842 \pm 0,9035 \mu\text{g}$), NQ = não quantificável.

Estrato córneo (EC) 24h	Epiderme viável (EV) 24h	Epiderme (EC + EV) 24h	Derme (D) 24h	Pele total (EC + EV + D) 24h	Lavagem 24h
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$
$0,8730 \pm 0,1547$	$0,5418 \pm 0,2030$	$1,4148 \pm 0,2300$	$0,3791 \pm 0,1274$	$1,7938 \pm 0,2788$	NQ
% dose	% dose	% dose	% dose	% dose	% dose
$21,42 \pm 3,40$	$13,48 \pm 5,35$	$34,90 \pm 6,33$	$9,19 \pm 2,36$	$44,09 \pm 6,62$	-

Figura 55. Quantidades de EGCG encontradas nas camadas da pele: estrato córneo, epiderme viável, epiderme, derme e pele total (expressas em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 horas de difusão (média $\pm$ desvio padrão).

Os resultados obtidos no estudo de penetração cutânea da formulação contendo o extrato de chá verde mostraram que o seu flavonóide majoritário, a EGCG, após 6 e 24 horas de difusão, não permeou até o líquido receptor ou a quantidade foi extremamente pequena para ser detectada pelo método de CLAE desenvolvido.

A avaliação das diferentes camadas da pele permitiu verificar que a EGCG permaneceu majoritariamente no estrato córneo (21,42% da dose aplicada) e na epiderme viável (13,48% da dose aplicada). Uma pequena porcentagem de EGCG também foi encontrada na derme (9,19% da dose aplicada).

Tabela 44 - Quantidades ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de quercetina no líquido receptor (n = 6 células, ND = não detectável).

Flavonóide	Tempo (horas)	
	6	24
Quercetina	ND	ND

Tabela 45 - Quantidades de quercetina encontradas nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável, epiderme, derme e pele total) e na solução de lavagem (expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e % da dose aplicada) após 24 horas de difusão (média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$ células, dose média de quercetina aplicada: $2,2063 \pm 0,0775\mu\text{g}$), NQ = não quantificável.

Estrato córneo (EC) 24h	Epiderme viável (EV) 24h	Epiderme (EC + EV) 24h	Derme (D) 24h	Pele total (EC + EV + D) 24h	Lavagem 24h
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$
$0,1652 \pm 0,0177$	$0,2313 \pm 0,0359$	$0,3965 \pm 0,0404$	NQ	-	NQ
% dose	% dose	% dose	% dose	% dose	% dose
$23,59 \pm 3,30$	$32,96 \pm 5,85$	$56,55 \pm 7,45$	-	-	-

Figura 56. Quantidades de quercetina encontradas nas camadas da pele: estrato córneo, epiderme viável e epiderme (expressas em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 horas de difusão (média $\pm$ desvio padrão).

Os resultados obtidos para o estudo de penetração cutânea da formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba* mostraram que a quercetina, após 6 e 24 horas de difusão, não permeou até o líquido receptor ou estas quantidades foram extremamente pequenas para serem detectadas pelo método de CLAE desenvolvido.

Em relação à quantidade de quercetina depositada na pele, pôde-se observar que a maior parte deste flavonóide permaneceu majoritariamente na epiderme viável (32,96% da dose aplicada) e no estrato córneo (23,59% da dose aplicada). Foi possível encontrar quercetina na derme, mas em concentrações muito pequenas, as quais eram menores do que o limite de quantificação.

5.6 Avaliação da segurança por meio da avaliação da compatibilidade cutânea

Os resultados do teste de compatibilidade cutânea estão apresentados na Tabela 46 e o laudo deste teste está apresentado no Anexo 4.

Tabela 46 - Resultados obtidos 15 minutos e 24 horas após a retirada do *patch*.

Formulação	Tempo	
	15 minutos	24 horas
Formulação de nº 11 (veículo)	(-) reação negativa	(-) reação negativa
Formulação de nº 11 contendo 6% de extrato de chá verde	(-) reação negativa	(-) reação negativa
Formulação de nº 11 contendo 6% de extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	(-) reação negativa	(-) reação negativa
Formulação de nº 11 contendo 0,0405% de EGCG	(-) reação negativa	(-) reação negativa
Formulação de nº 11 contendo 0,0069% de quercetina	(-) reação negativa	(-) reação negativa
Formulação de nº 11 contendo 0,0045% de rutina	(-) reação negativa	(-) reação negativa

Todas as formulações estudadas apresentaram ótima compatibilidade com a pele uma vez que não foram observadas reações de irritação cutânea após 24 horas de contato sob oclusão.

6 Discussão

O termo “produto natural” sempre foi bem aceito por parte do consumidor, o que tem aumentado o interesse das indústrias cosméticas em acrescentar extratos vegetais na composição de seus produtos. Dentre os vários extratos utilizados, os de chá verde (*Camellia sinensis*) e de *Ginkgo biloba* têm sido amplamente utilizados em formulações para os cuidados da pele com finalidade de prevenir os danos causados pela radiação solar.

Assim, com o objetivo de avaliar a eficácia e a segurança desses extratos quando presentes em formulações cosméticas, esse estudo foi conduzido utilizando extratos glicólicos destas plantas, os quais vêm sendo muito utilizados em formulações cosméticas. Além disso, foram utilizados extratos padronizados em teor de seus marcadores químicos, o que é fundamental para garantir a reprodutibilidade dos experimentos.

Inicialmente foi feita a caracterização dos extratos vegetais, e para tal foi determinado o espectro de absorção destes extratos na região do ultravioleta. Embora muitos extratos de plantas apresentem absorção nas regiões do UVA e do UVB, os extratos glicólicos de chá verde e de *Ginkgo biloba* apresentaram respectivamente picos de absorção em 270 e 260nm, ou seja, praticamente não apresentaram absorção da luz nas regiões do UVB ou do UVA, ou seja, de 280 a 320nm ou de 320 a 400nm. Elmetts et al. (2001) também observaram que o pico de absorção máxima do extrato de chá verde é em 273nm, demonstrando também a ausência de absorção nessas regiões do ultravioleta.

Em seguida, foi determinado o potencial antioxidante *in vitro* desses extratos glicólicos pelo método da quimioluminescência dependente de luminol. A realização de tal estudo foi importante, pois, embora descritos como antioxidantes, foi preciso verificar previamente se os extratos objeto de estudo de fato apresentavam efeitos anti-radicais livres para assim justificar a posterior realização de estudos de eficácia *in vivo* (MAIA CAMPOS et al., 2006).

O método da quimioluminescência dependente de luminol tem sido um dos mais utilizados atualmente, por ser rápido, confiável e eficaz na determinação da capacidade que alguns antioxidantes possuem de neutralizar radicais livres (LUCISANO-VALIM et al., 2002; CHENG et al., 2003). Além disso, a quimioluminescência tem sido amplamente utilizada para avaliação do potencial antioxidante de flavonóides (KROL et al., 1994) e de extratos vegetais (CHEN et al., 2006; PAPADOPOULOS et al., 2003; MAIA CAMPOS et al., 2006). Os resultados

obtidos nesta etapa mostraram que ambos os extratos glicólicos de chá verde e de *Ginkgo biloba* apresentaram atividade antioxidante, sendo que na diluição empregada (1:9) o chá verde foi mais potente do que o *Ginkgo biloba*. A associação dos dois extratos não provocou um sinergismo de efeito antioxidante.

A alta atividade antioxidante observada em nosso estudo para o extrato de chá verde está de acordo com estudos anteriormente relatados na literatura (MAJCHRZAK; MITTER; ELMADFA, 2004; NAKAGAWA; YOKOZAWA, 2002; VAN DYKE; MCCONNELL; MARQUARDT, 2000; WEI et al., 1999) que comprovaram a atividade antioxidante deste extrato e de suas catequinas isoladas em soluções alcoólicas, hidroalcólicas e em tampões. Os resultados obtidos no presente estudo para o extrato de *Ginkgo biloba* também são semelhantes a estudos relatados na literatura (ELLNAIN-WOJTASZEK; KRUCZYNSKI; KASPRZAK, 2003; HIBATALLAH; CARDUNER; POELMAN, 1999) que também demonstraram atividade antioxidante *in vitro* para este extrato.

Após a comprovação do potencial antioxidante *in vitro* dos extratos vegetais em estudo, foram desenvolvidas 13 formulações cosméticas contendo quatro diferentes bases auto-emulsificantes e três diferentes polímeros hidrofílicos, visando obter formulações com características sensoriais agradáveis e de acordo com as tendências do mercado cosmético, ou seja, com baixo conteúdo oleoso.

Todas as formulações foram acrescidas ou não (veículo) de 6% de extrato glicólico de chá verde ou de 6% de extrato glicólico de *Ginkgo biloba* ou de 6% de cada extrato (associação).

A escolha da concentração utilizada de extratos na formulação foi baseada na indicação de uso do fabricante, que recomenda de 2 a 10%, assim optou-se utilizar uma concentração intermediária entre esses valores, considerando aspectos de farmacotécnica e estabilidade na formulação cosmética, custo e o emprego de uma concentração que pudesse realmente promover efeitos na pele, uma vez que tais extratos são diluídos.

A proposta de que tratamentos fitoterápicos baseados no uso de algumas associações de diferentes extratos vegetais apresentam eficácia superior em relação a esses mesmos extratos isolados tem sido estudada e comprovada nos últimos anos (WAGNER, 2006). Em relação às formulações cosméticas, verifica-se uma ampla utilização de diferentes misturas (*blends*) de extratos vegetais em diversos produtos, com o apelo de que estas misturas poderiam promover efeitos sinérgicos

na pele. No entanto, poucos estudos têm sido realizados no sentido de avaliar se a associação de extratos vegetais poderia levar a efeitos sinérgicos, obtendo-se melhores resultados do que os extratos isolados. Assim, neste estudo optou-se por avaliar também a associação dos extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*.

Os estudos de estabilidade têm por objetivo avaliar a capacidade de um produto manter as características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e de segurança e eficácia (BRASIL – ANVISA, 2004). Conseqüentemente, o estudo da estabilidade deve ser visto como um requisito necessário para a garantia da qualidade do produto. Neste estudo, todas as formulações foram submetidas a testes preliminares de estabilidade por avaliação do pH, centrifugação e estresse térmico.

A pele apresenta pH levemente ácido (4,1 – 5,8) (SEGGER et al., 2007), o que contribui para que exerça sua proteção contra microorganismos. O pH da pele é influenciado pelas substâncias hidrossolúveis presentes no estrato córneo, pela secreção sebácea e sudorípara e pela liberação de ácido carbônico (EHLERS et al., 2001). Segundo a ANVISA (BRASIL – ANVISA, 2004), durante o desenvolvimento de formulações dermocosméticas, devem-se compatibilizar três diferentes aspectos relacionados ao valor de pH da formulação final: estabilidade dos ingredientes, eficácia e segurança do produto. Sendo assim, a avaliação do pH das formulações estudadas foi realizada visando à obtenção de formulações com pH levemente ácido para uma boa compatibilidade com a pele e também porque o pH levemente ácido (4,5 - 5,5) pode favorecer a estabilidade e/ou a atividade antioxidante dos principais flavonóides dos extratos em estudo (LIN et al., 2007; GORDON; ROEDIG-PENMAN, 1998).

Antes de iniciar a etapa de estabilidade por estresse térmico, recomenda-se submeter o produto ao teste de centrifugação, uma vez que este teste produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades, que poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, coalescência entre outras (BRASIL – ANVISA, 2004).

Dentre as 13 formulações estudadas, somente a formulação de nº 3 não foi submetida ao teste de centrifugação, visto que esta apresentou diminuição brusca da consistência, logo após a adição dos extratos vegetais objeto de estudo, o que pode ter sido devido à incompatibilidade destes com o agente de consistência

(celulose) que faz parte da base autoemulsificante utilizada nesta formulação (Nanocolloidy® 2022®). Todas as demais formulações foram submetidas à centrifugação e mostraram-se estáveis, visto que nenhuma delas apresentou separação de fases.

A seguir, as formulações em estudo foram submetidas a condições de estresse térmico visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade, tais como separação de fases da emulsão e oxidação dos ativos, o que pode levar a alterações de cor e odor do produto. As formulações de n^{os} 1, 2 e 4 contendo o extrato de chá verde e a associação dos dois extratos em estudo mostraram-se instáveis quando submetidas à temperatura de 45°C, uma vez que apresentaram escurecimento quando comparadas à coloração das formulações mantidas no ambiente, o que possivelmente ocorreu devido à oxidação dos compostos fenólicos (catequinas) presentes no extrato de chá verde (PRONIUK; LIEDERER; BLANCHARD, 2002). Tal alteração não ocorreu com as formulações contendo somente o extrato de *Ginkgo biloba*. Na tentativa de proteger esses compostos da oxidação e a fim de se determinar o melhor antioxidante, as formulações de n^{os} 1, 2 e 4 foram acrescidas de BHT, um antioxidante lipossolúvel, originando as formulações de n^{os} 5 a 7. Já as formulações de n^{os} 8 a 13 foram modificadas quanto ao agente de consistência para permitir a adição de metabissulfito de sódio, um antioxidante hidrossolúvel, que por ser um eletrólito, é incompatível com polímeros de acrilato, como por exemplo o Pemulen®, utilizado nas primeiras formulações. Assim, as formulações de n^{os} 8 a 10 foram preparadas com um copolímero do ácido sulfônico e vinilpirrolidona e as formulações de n^{os} 11 a 13 foram preparadas com uma goma polissacarídica.

As formulações de n^{os} 5 a 7 apresentaram um escurecimento quando submetidas ao estresse térmico, concluindo-se assim que a adição de BHT não evitou a oxidação dos compostos fenólicos. Já as formulações de n^{os} 8 a 13 não apresentaram alteração de cor após sete dias de estudo, ou seja, o metabissulfito de sódio foi efetivo na proteção dos flavonóides. Tais resultados sugerem que escurecimento ocorrido nas formulações foi realmente devido à oxidação das catequinas do chá verde, uma vez que a adição de metabissulfito de sódio (hidrossolúvel) foi capaz de proteger esses compostos, que de maneira geral, também são hidrossolúveis (NWUHA et al., 1999), enquanto que a adição de BHT, um antioxidante de caráter lipossolúvel, não foi efetiva.

Assim, as formulações de nºs 8 a 13, consideradas estáveis, foram selecionadas para a etapa de avaliação sensorial, uma vez que o desempenho sensorial de um produto cosmético é um fator importante que interfere na aceitação do produto pelo consumidor e consequentemente no seu potencial de venda (WORTEL; WIECHERS, 2000). Nesta etapa, a formulação de nº 11, composta pela base autoemulsificante contendo fosfato de trilaureth-4 e pela goma polissacarídica (agente de consistência), foi a formulação que obteve maior aceitação pelas voluntárias em todos os parâmetros estudados, sendo por esse motivo selecionada para os estudos de eficácia *in vivo*, penetração e compatibilidade cutânea.

Dando continuidade aos objetivos propostos, a próxima etapa do estudo foi avaliação pré-clínica da eficácia fotoprotetora das formulações. Neste trabalho optou-se pela utilização do camundongo sem pêlo como modelo experimental, pois, embora o uso de modelos animais tenha sido questionado em relação à extrapolação dos resultados para os humanos (HERMANNNS; PIÉRARD-FRANCHIMONT; PIÉRARD, 2000), vários estudos têm demonstrado que este animal é um modelo útil para demonstrar o efeito protetor de extratos vegetais e substâncias antioxidantes contra diversos danos ocorridos com a exposição aguda e crônica à radiação UV. Dentre estes danos podemos citar o eritema, a formação de radicais livres, de células de queimadura solar e a hiperplasia da epiderme.

A dose de radiação escolhida para este estudo foi a de 215,46 mJ/cm², a qual foi previamente padronizada pelo nosso grupo de pesquisa para estudar os efeitos fotoprotetores de formulações contendo antioxidantes na pele de camundongos sem pêlo (MAIA CAMPOS et al., 2006; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007).

No presente estudo, técnicas biofísicas foram utilizadas para avaliar o eritema e a TEWL, uma vez que o emprego de tais métodos tem sido uma tendência em estudos de eficácia. Assim, na avaliação do eritema, foi observado que as formulações acrescidas de chá verde (CV), de *Ginkgo biloba* (GB) e da associação destes extratos (CV+GB) protegeram a pele dos camundongos sem pêlo contra o eritema induzido pela radiação UV, quando comparadas ao controle irradiado (CI), sendo que no caso de formulações contendo GB esse efeito protetor foi mais pronunciado. Além disso, quando comparado com o controle não irradiado, as formulações que continham somente GB ou este associado ao CV, proporcionaram alta proteção uma vez que as referidas formulações protegeram totalmente a pele contra o eritema, o que foi evidenciado pelas médias estatisticamente equivalentes a

esse controle. Assim, embora a maioria dos estudos relatados na literatura compare a eficácia de produtos fotoprotetores com o controle irradiado, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a importância da comparação também com o controle não irradiado, que representa a área totalmente intacta da pele.

Essa alta proteção do extrato de *Ginkgo biloba* contra o eritema pode estar relacionada à presença dos flavonóides como a quercetina e o canferol nesse extrato, uma vez que alguns autores demonstraram que a aplicação tópica de outros extratos vegetais ricos nestes flavonóides também promove proteção da pele contra o eritema induzido por UV (KIM et al., 2002; AQUINO et al., 2002).

Muitos estudos têm demonstrado ainda que, além da atividade antioxidante, muitos flavonóides possuem propriedade antiinflamatória, o que pode contribuir para seus efeitos protetores *in vivo* contra a inflamação cutânea, induzida pela radiação UV, que leva ao eritema (PIETTA, 2000; PELZER et al., 1998). Assim, a proteção contra a formação de eritema proporcionada pelo extrato de *Ginkgo biloba*, também pode estar relacionada ao efeito antiinflamatório frente à radiação UV. Um estudo conduzido por Hibatallah, Carduner e Poelman (1999) mostrou que a aplicação tópica de uma formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* na pele humana, reduziu significativamente a inflamação da pele induzida por metilnicotinato. Além disso, alguns estudos têm demonstrado (KWAK et al., 2002; LIM et al., 2006) que a biflavona ginkgetina, isolada das folhas de *Ginkgo biloba*, apresenta atividade antiinflamatória *in vivo* na pele por regulação da expressão da ciclooxigenase-2.

Analisando o efeito do extrato de chá verde, verificou-se que, embora esse tenha apresentado um efeito menos pronunciado do que o extrato de *Ginkgo biloba*, o mesmo também reduziu o eritema quando comparado ao controle irradiado. Elmetts et al. (2001) demonstraram que a aplicação tópica de uma solução hidroalcoólica contendo polifenóis do chá verde na pele humana previamente à irradiação por UV, resultou em uma redução da resposta eritematogênica dose-dependente. Além disso, Katiyar e Mukhtar (2001) demonstraram que a aplicação tópica de EGCG antes da exposição à radiação UVB, reduziu a presença de infiltrados de leucócitos e reduziu o eritema. Assim, a formulação desenvolvida utilizada como veículo neste estudo não interferiu nessa propriedade do extrato de chá verde, o que, além de garantir a eficácia proposta para o referido extrato em produtos cosméticos, comprovou a validade do emprego de formulações contendo extratos vegetais, o que é a real condição de uso dos mesmos na pele.

A exposição da pele à radiação UV provoca lipoperoxidação de ácidos graxos das membranas celulares, resultando em danos nas estruturas relacionadas à adesão dos corneócitos no estrato córneo. Estes danos reduzem a integridade da função barreira da pele e, assim, ocorre um aumento da perda transepidérmica de água (TEWL). Conseqüentemente, a determinação da TEWL é um importante parâmetro em estudos de eficácia fotoprotetora (MEGURO et al., 1999).

No presente estudo, observou-se que as formulações acrescidas de CV, GB e da associação destes extratos protegeram a função barreira da pele, diminuindo os valores de TEWL, sendo que, a formulação contendo o extrato GB apresentou efeitos mais pronunciados do que a formulação contendo somente o extrato de chá verde. Assim como observado para o eritema, as áreas irradiadas que receberam as formulações contendo GB ou a associação deste com CV apresentaram valores de TEWL equivalentes aos valores obtidos na área do controle não-irradiado (CNI), e conseqüentemente, pode-se sugerir que GB apresenta um importante efeito de prevenção de danos na barreira cutânea frente à radiação UV.

O efeito pronunciado do extrato de *Ginkgo biloba* contra esse dano pode estar relacionado ao fato de que muitos dos compostos antioxidantes deste extrato apresentam caráter lipofílico, como por exemplo, as lactonas terpênicas (ginkgolideos) (SCHOLTYSSSEK et al., 1997), o que poderia ter proporcionado maior proteção das membranas celulares no estrato córneo, protegendo assim, a função barreira da pele.

Cumprе salientar que a manutenção da função barreira da pele é de fundamental importância na prevenção de várias alterações cutâneas relacionadas a danos na barreira, tais como o ressecamento e irritações da pele. Assim, o efeito proporcionado pela formulação contendo o extrato de GB é de fundamental importância para a prevenção de alterações cutâneas e para a manutenção da eudermia, ou seja da manutenção da saúde da pele.

Visando complementar os resultados obtidos com as técnicas de biofísica da pele, foram realizados estudos histopatológicos e histométricos, que permitem avaliar quali e quantitativamente os efeitos da radiação UV por meio das células de queimadura solar (CQS), bem como pela medida da hiperplasia da epiderme. Tais métodos vêm sendo bastante utilizados para a avaliação da atividade fotoprotetora de diferentes substâncias ativas, tais como vitaminas, extratos vegetais e de substâncias antioxidantes isoladas destes extratos (MAIA CAMPOS et al., 2006;

ALCARAZ et al., 1999; TREVITHICK et al., 1992; REAGAN-SHAW et al., 2004; FAZEKAS et al., 2003; ZHAO et al., 1999b).

A determinação do número de CQS é um marcador muito utilizado para a avaliação da fotoproteção cutânea uma vez que estudos anteriores (BRASH, 1997) demonstraram que estas células, identificadas na epiderme como sendo queratinócitos contendo núcleo pequeno e denso e citoplasma com intensa eosinofilia, são realmente células apoptóticas, e são identificadas por microscopia óptica e coloração de hematoxilina e eosina.

Todas as formulações acrescidas dos extratos em estudo protegeram a pele contra a formação de CQS, quando comparadas ao CI, sendo que a formulação acrescida de CV apresentou efeitos mais pronunciados do que a formulação contendo somente GB. Nossos resultados são similares aos obtidos por Elmetts et al. (2001), que, embora avaliando a aplicação tópica de uma solução hidroalcoólica contendo catequinas do chá verde na pele humana antes da irradiação UV, também verificaram redução do número de CQS. Por outro lado, Sevin et al. (2007) demonstraram que a aplicação tópica de um creme contendo 2% de EGCG isolada, que é a principal catequina do extrato de chá verde, na pele de ratos, antes da irradiação por UVA, protegeu contra a formação de CQS.

Uma vez que o GB apresentou efeito contra a formação de CQS, ficou clara a importância da aplicação tópica de formulações contendo esse extrato, uma vez que Ozkur et al. (2002) observaram que a administração oral de extrato de *Ginkgo biloba* a camundongos sem pêlo, previamente à irradiação da pele por UVB, não promoveu proteção significativa da pele contra a formação de CQS.

A medida da espessura da epiderme viável e a contagem do número de camadas de células nucleadas nas mesmas regiões também são de grande importância em estudos de eficácia fotoprotetora uma vez que a exposição à radiação UV causa uma severa hiperplasia da epiderme para reposição das células danificadas, sendo que os processos de apoptose e proliferação celular estão intimamente relacionados (LEE et al., 2003; OUHTIT et al., 2000).

O grupo controle não irradiado, em nossos experimentos, apresentava um valor médio de espessura de epiderme viável de aproximadamente 19,23 μm , valor semelhante aos descritos na literatura para o camundongo sem pêlo (16,4 μm) (LU et al., 1999). Após 24 horas da radiação UV há um aumento significativo da espessura da epiderme viável (LU et al., 1999). No presente estudo também foi

observado um aumento estatisticamente significativo na espessura da epiderme viável para o grupo controle irradiado, cuja média foi de 40,01µm.

Os resultados obtidos na análise histométrica mostraram que as formulações acrescidas de chá verde, de *Ginkgo biloba* e da associação destes dois extratos protegeram a pele contra a hiperplasia da epiderme induzida pela radiação UV, o que foi evidenciado tanto pela redução da espessura da epiderme viável, quanto pelo número de camadas desta camada em relação ao grupo CI, sendo que não foram observadas diferenças nos valores de espessura e número de camadas obtidos com a aplicação de GB, CV e CV+GB.

A análise histopatológica mostrou que o controle irradiado e o grupo tratado com o veículo foram amplamente afetados pela radiação UV, uma vez que o tecido cutâneo desses grupos apresentou hiperplasia da epiderme, um grande número de CQS, desarranjo celular na camada espinhosa e processo inflamatório generalizado. No entanto, a aplicação das formulações contendo CV, GB e CV+GB protegeu a pele dos camundongos já que as áreas tratadas com essas formulações mostraram redução do grau de hiperplasia da epiderme, pouco ou nenhum desarranjo celular, um número reduzido de CQS e redução da inflamação na derme papilar, quando comparadas aos grupos CI e V. Assim, foi possível verificar que os resultados obtidos nas análises histopatológica e histométrica foram coincidentes.

Considerando que o espectro de absorção obtido para os extratos em estudo no início desta pesquisa não indicou absorção da luz nas regiões do UVA e do UVB, provavelmente os efeitos protetores observados pelos extratos ocorreram devido a outros efeitos biológicos como por exemplo, a ação antioxidante, e não devido à absorção da radiação UVA/B, como é o caso dos filtros solares químicos (DAMIANI et al., 2006).

Na avaliação do conjunto de parâmetros estudados no estudo pré-clínico de eficácia, observou-se que os extratos de CV e GB apresentaram diferentes efeitos na fotoproteção da pele, uma vez que GB apresentou efeitos mais pronunciados na prevenção de eritema e danos na função barreira, inclusive apresentando valores equivalentes ao controle não irradiado, enquanto que CV foi mais efetivo na proteção da pele contra a formação de CQS. Assim, embora os efeitos acima mencionados para os extratos isolados não foram potencializados quando esses estavam associados na formulação, pode-se sugerir o uso da formulação que continha CV e GB, pois, esses proporcionaram efeitos que se complementam na

proteção contra o conjunto de danos induzidos pela radiação UV, principalmente no que se refere à função barreira e ao eritema.

Dando seqüência aos objetivos propostos, foi feito um estudo da penetração cutânea dos extratos presentes nas formulações, para uma avaliação mais detalhada em relação à eficácia e segurança de tais produtos. Previamente à realização de tal estudo, é recomendado avaliar o perfil de liberação dos flavonóides da formulação contendo os extratos vegetais, pois esse é de grande importância por avaliar a habilidade de um veículo em liberar uma substância ativa, tornando-a disponível para penetrar na pele (SHAH; ELKINS; WILLIAMS, 1999).

Para tal, a primeira etapa realizada foi o desenvolvimento e a validação de dois métodos analíticos para a quantificação dos flavonóides nos extratos vegetais. A Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) foi o método escolhido uma vez que tem sido amplamente empregada e indicada para estudos de liberação e difusão cutânea (BÉLGICA – SCCP, 2006). Inicialmente foram escolhidos os flavonóides a serem quantificados para cada extrato vegetal. A epigallocatequina-3-galato (EGCG) foi a substância escolhida para ser o marcador do extrato de chá verde, uma vez que este flavanol é considerado majoritário dentre as diversas catequinas presentes nesse extrato e além disso, este composto é considerado o mais ativo em diversos estudos envolvendo as catequinas do chá verde (SEVIN et al., 2007). Para o extrato de *Ginkgo biloba*, a quercetina foi o flavonóide escolhido como marcador, uma vez que ao analisar os cromatogramas deste extrato, verificou-se que este flavonóide estava presente em maior concentração do que a rutina. Além disso, a escolha da quercetina também foi baseada no fato de que esta apresenta melhor coeficiente de partição (octanol/água) ($\log P:1,8$) do que a rutina ($\log P:-0,64$), indicando que esta poderia apresentar melhor penetração na pele (HADGRAFT, 2004; ROTHWELL; DAY; MOGAN, 2005).

A escolha das condições cromatográficas para a análise dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* foi baseada em estudos da literatura que utilizam principalmente colunas de fase reversa C18 e fases móveis compostas por acetonitrila ou metanol, água e ácidos acético, fosfórico ou fórmico para impedir a ionização dos flavonóides, evitando assim o aparecimento de picos duplos (ROW; JIN, 2006; LIANG et al., 2006; FERRUZZI; GREEN 2006; CABRERA; GIMENEZ; LOPEZ, 2003; LIANG; LU; ZHANG, 2002; PELILLO et al., 2002; XIE et al., 2006; MESBAH et al., 2005; DUBBER et al., 2005; JI et al., 2005).

Assim, para o extrato de *Ginkgo biloba*, após alguns testes com diferentes condições, foi selecionada uma fase móvel isocrática de acetonitrila (30%) e tampão acetato pH 3,0 (70%), uma vez que esta condição permitiu a obtenção do pico da quercetina após 14 minutos de análise, o que é desejável, uma vez que se sabe que os componentes da pele apresentam baixo tempo de retenção (POTARD et al., 1999). Para o extrato de chá verde, dada a similaridade química entre as diferentes catequinas, a seleção de uma fase móvel que proporcionasse uma adequada separação destas foi mais trabalhosa, sendo avaliadas 6 diferentes fases móveis isocráticas e posteriormente 4 diferentes gradientes até se chegar ao gradiente de acetonitrila e tampão acetato pH 3,0 de 16 minutos de duração, que proporcionou a eluição da EGCG após 11 minutos e melhor resolução dos picos cromatográficos. Embora a eluição por gradiente seja um processo mais longo, que exige um maior tempo de análise em virtude da necessidade de um período de reestabilização da coluna, em alguns casos este procedimento é necessário para permitir a separação de substâncias muito parecidas, como é o caso das catequinas do chá verde.

Considerando que durante os estudos de penetração cutânea, os flavonóides são quantificados em diferentes meios, tais como: metanol puro, líquidos receptores, solução de lavagem, fita adesiva contendo o extrato córneo, epiderme e derme, foi necessária a validação dos métodos de CLAE em cada um desses meios. Assim, primeiramente analisou-se a especificidade e seletividade de cada método, a fim de avaliar a presença de picos interferentes nas seguintes soluções: metanol puro, líquidos receptores e solução de lavagem, soluções de metanol contendo amostras de epiderme, derme, fita adesiva e creme (veículo). Como não foram observados picos interferentes nos tempos de retenção da EGCG e da quercetina em cada método, foram elaboradas as curvas de calibração. Para tal, diferentes concentrações de EGCG e quercetina foram solubilizadas em metanol, líquidos receptores, solução de lavagem, metanol contendo fita adesiva ou pele e analisadas em cada método para determinação da curva de tendência e do coeficiente de correlação.

Os resultados mostraram que houve diferenças entre as diferentes curvas de calibração obtidas tanto para a EGCG quanto para a quercetina, nos diferentes meios em estudo, uma vez que há diferenças de solubilidade destes flavonóides nos diferentes meios. Além disso, o efeito matriz ocasionado pelos constituintes da pele e da fita adesiva levou a diferentes curvas e equações da reta, o que comprovou a

necessidade de se utilizar uma curva de calibração específica para a quantificação dos flavonóides em cada meio do estudo (POTARD et al., 1999).

A seguir, os dois métodos analíticos foram validados em termos de exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação e intervalo de dosagem. Os resultados obtidos para os limites de quantificação e intervalo de dosagem, mais uma vez mostraram a importância da validação dos métodos analíticos em cada meio do estudo, devido a diferenças de solubilidade das substâncias e ao efeito matriz ocasionado pela pele e pela fita adesiva, os quais também levaram a diferentes resultados de limites de quantificação e intervalos de dosagem.

De acordo com o que foi descrito e discutido anteriormente, a validação dos métodos analíticos para a análise dos extratos vegetais objeto de estudo foi bastante trabalhosa, como é o caso de vários outros extratos, em função da complexa composição dos mesmos. Além disso, quando tais métodos são utilizados em estudos de penetração cutânea, a validação deve ser feita considerando-se os diferentes meios em que os flavonóides dos extratos serão quantificados e os resultados devem estar dentro dos critérios de precisão e exatidão exigidos por agências reguladoras, o que exige ainda mais do analista.

Após a validação dos métodos de CLAE, os marcadores, EGCG e quercetina foram quantificados nos extratos objetos de estudo, sendo determinado 0,6757% de EGCG no extrato de chá verde e 0,1160% de quercetina no extrato de *Ginkgo biloba*, o que significa que na formulação contendo 6% de chá verde apresentava 0,0405% de EGCG e que na formulação contendo 6% de *Ginkgo biloba* apresentava 0,0069% de quercetina.

A seguir analisou-se o perfil de liberação *in vitro* das formulações utilizando células de Franz estáticas. Tal estudo objetivou verificar se a formulação de nº 11 era adequada para permitir uma boa liberação dos flavonóides das formulações contendo os extratos vegetais em estudo. A membrana escolhida foi a de acetato de celulose, uma membrana do tipo hidrofílica, comumente usada neste tipo de estudo. Tal membrana possibilitou uma boa liberação da EGCG da formulação nº 11 contendo extrato de chá verde para o líquido receptor, desde o primeiro tempo de análise, sendo que após 6 horas de estudo, observou-se liberação de 40,96% da dose de EGCG aplicada sobre a membrana. Em relação à formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba*, não foi possível quantificar a quercetina liberada utilizando a membrana de acetato de celulose, o que pode ter ocorrido devido ao baixo teor

desse flavonóide no extrato de *Ginkgo biloba*, o qual era seis vezes menor que a quantidade de EGCG presente no extrato de chá verde. Além disso, a quercetina é mais lipofílica que a EGCG, e possivelmente, apresentou uma tendência de permanecer na formulação, a qual é mais lipofílica que a membrana de celulose e o líquido receptor. Assim, decidiu-se avaliar a liberação da quercetina utilizando a membrana polissulfona, uma membrana menos hidrofílica que a membrana de celulose (CLEMENT, LAUGEL E MARTY, 2000), a qual favoreceu a passagem da quercetina para o líquido receptor e assim foi possível verificar liberação da quercetina desde o primeiro tempo de análise, sendo que após 8 horas de estudo, observou-se liberação de 16,05% da dose de quercetina aplicada sobre a membrana.

A avaliação dos modelos matemáticos estudados por meio dos coeficientes de correlação linear (r), permitiu concluir que a liberação de EGCG e de quercetina das formulações contendo os extratos vegetais em estudo seguiu o modelo de pseudoprimeira ordem, também conhecido como modelo de Higuchi, indicando desta forma que o passo determinante da velocidade de liberação dos flavonóides deve ser o processo de difusão destes nas formulações (HIGUCHI, 1962; LARRUCEA et al., 2001).

Assim, após a confirmação que as formulações em estudo permitiam a liberação dos flavonóides, os estudos de penetração cutânea foram realizados. Os resultados obtidos para a formulação contendo o extrato de chá verde mostraram que o seu flavonóide majoritário, a EGCG não permeou até o líquido receptor ou a quantidade foi extremamente pequena para ser detectada pelo método de CLAE. Estes resultados estão de acordo com Batchelder et al. (2004), que verificaram que apenas 0,1% de EGCG presente em dispositivos de liberação transdérmica contendo $1,35\text{mg}/\text{cm}^2$ de extrato de chá verde permeou até o líquido receptor. Fang et al. (2006) também verificaram uma grande retenção de EGCG na pele, quando esta catequina foi veiculada em lipossomas para favorecer a permeação. A avaliação das diferentes camadas da pele permitiu verificar que EGCG permaneceu majoritariamente na epiderme e no estrato córneo. Apesar de estudos sugerirem que ocorre metabolização de uma pequena parte da EGCG por estearases da derme (BATCHELDER et al., 2004), em nosso estudo encontrou-se na derme 9,19% da dose aplicada de EGCG.

Os resultados obtidos para a formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba* mostraram que a quercetina também não permeou até o líquido receptor ou estas quantidades foram extremamente pequenas para serem detectadas. Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado por Casagrande et al. (2007) que avaliaram a absorção percutânea de formulações contendo 1% de quercetina pura, utilizando como metodologia de quantificação a lipoperoxidação. Neste estudo, nenhuma atividade antioxidante foi observada no líquido receptor após 12 horas de difusão através da pele de porco. Em relação à quantidade de quercetina depositada na pele, no nosso estudo pôde-se observar que a maior parte deste flavonóide permaneceu na epiderme, principalmente na epiderme viável. Foi possível encontrar quercetina na derme, mas em concentrações muito pequenas, as quais estavam abaixo do limite de quantificação. Estes resultados também estão em acordo com Casagrande et al. (2007) que observaram uma atividade antioxidante significativa na pele total após 12 horas de difusão de uma formulação contendo quercetina pura.

Assim, para a formulação contendo o extrato de *Ginkgo biloba*, a retenção da quercetina no estrato córneo (23,59%) poderia explicar seus efeitos na proteção da função barreira da pele. Além disso, considerando que a maior parte da quercetina ficou na epiderme viável (32,96%), a qual permaneceu na pele após 24 horas de difusão, isto poderia estar relacionado ao efeito de proteção contra a hiperplasia desta camada.

Em relação à penetração cutânea da EGCG, marcador selecionado para o extrato de chá verde, este apresentou uma retenção de 21,42% no estrato córneo, o poderia estar relacionado com o efeito protetor da formulação que o continha na função barreira da pele (MEGURO et al., 1999). Além disso, observou-se que uma quantidade considerável de EGCG ficou retida na epiderme viável, favorecendo os efeitos de proteção dos queratinócitos contra a formação de CQS e a hiperplasia da epiderme viável.

Considerando os resultados obtidos nos experimentos realizados no presente estudo, pode-se sugerir que as formulações contendo os extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* apresentam grande potencial para aplicação em formulações cosméticas nas reais condições de uso, ou seja, na pele humana, visando a proteção de danos causados pela radiação UV. Porém, para tal, é imprescindível a avaliação da segurança e da eficácia clínica das referidas formulações objeto de estudo. Dessa maneira, ainda como objetivo desta pesquisa, foi realizado um estudo

de compatibilidade cutânea em voluntários humanos com a aplicação de um *patch* sob condições de oclusão, que facilitam a penetração dos ingredientes dos produtos na pele. Nesse teste, todas as formulações contendo os extratos vegetais de chá verde ou *Ginkgo biloba* ou a associação desses, bem como as formulações contendo seus flavonóides isolados (EGCG, rutina e quercetina), apresentaram ótimas compatibilidade com a pele, pois não foi observada nenhuma reação de irritação cutânea primária após a retirada dos *patches*, sendo assim, essas formulações foram consideradas seguras para uso cosmético.

Assim, os resultados obtidos neste estudo contribuíram para mostrar a importância da associação dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* em formulações cosméticas com finalidades fotoprotetoras, uma vez que ambos proporcionaram efeitos que se complementam na proteção contra os danos induzidos pela radiação UV. Além disso, uma vez que as formulações estudadas apresentaram compatibilidade cutânea e penetração e retenção dos flavonóides presentes nos extratos objeto de estudo, essas podem ser consideradas eficazes e seguras.

Finalizando, o presente trabalho abre perspectivas para a avaliação da eficácia clínica desses extratos, bem como para a busca de novas propostas científicas relacionadas à avaliação de eficácia e segurança de produtos cosméticos contendo as mais diferentes substâncias ativas.

7 Conclusões

Nas condições experimentais desse trabalho, foi possível concluir que:

- Dentre as 13 formulações desenvolvidas, as de nº 8 a 13, apresentaram-se estáveis frente aos testes de estabilidade, sendo que dentre essas, a formulação de nº 11, a base de fosfato de trilaureth-4 e goma polissacarídica, foi a que apresentou melhor performance na avaliação sensorial sendo, portanto, selecionada para os estudos de eficácia, penetração cutânea e segurança propostos;
- Na avaliação da eficácia fotoprotetora as formulações acrescidas dos extratos de chá verde, de *Ginkgo biloba* e da associação destes extratos protegeram a pele dos camundongos contra o eritema e danos na função barreira, sendo que o extrato de *Ginkgo biloba* apresentou efeitos mais pronunciados do que o extrato de chá verde em ambos os parâmetros analisados;
- As formulações acrescidas dos extratos vegetais em estudo protegeram a pele contra a formação de células de queimadura solar, porém, a formulação que continha o extrato de chá verde apresentou efeito mais pronunciado, ou seja, foi mais eficaz na referida proteção;
- Todas as formulações acrescidas dos extratos em estudo protegeram a pele contra a hiperplasia da epiderme causada pela radiação UV, não sendo encontradas diferenças significativas entre estas formulações;
- O estudo do perfil de liberação *in vitro* dos flavonóides mostrou que a formulação contendo extrato de chá verde apresentou liberação de 40,96% da dose de EGCG aplicada e, que, a formulação contendo extrato de *Ginkgo biloba* apresentou uma liberação de 16,05% da dose de quercetina aplicada;
- Os resultados do estudo de penetração cutânea mostraram que a EGCG do extrato de chá verde e a quercetina do extrato de *Ginkgo biloba* penetraram na pele, mas não permearam até o líquido receptor, ou seja, ficaram retidas no estrato córneo e na epiderme viável, sendo que no caso da EGCG, pequenas concentrações também foram encontradas na derme;
- O estudo de segurança mostrou que as diferentes formulações objeto de estudo apresentaram uma ótima compatibilidade cutânea, ou seja, não foi observado potencial de irritação cutânea primária;
- A associação dos extratos de chá verde e de *Ginkgo biloba* em formulações cosméticas com finalidades fotoprotetoras é de grande valia, pois, as

formulações estudadas mostraram efeitos que se complementam na proteção contra os danos induzidos pela radiação UV, penetração cutânea e segurança de uso.

8 Referências Bibliográficas

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. Plants used in cosmetics. **Phyther Res.**, v.17, p. 987-1000, 2003.

ALCARAZ, M.V.; PATHAK, M.A.; RIUS, F.; KOLLIAS, N.; GONZALEZ, S. An extract of *Polypodium leucotomos* appears to minimize certain photoaging changes in a hairless albino mouse animal model. A pilot study. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.15, n.3-4, p.120-126, 1999.

ALEXIS, A.F.; JONES, V.A.; STILLER, M.J. Potential therapeutic applications of tea in dermatology. **Int J Dermatol.**, v.38, n.10, p.735-743, 1999.

AN, B.J.; KWAK, J.H.; SON, J.H.; PARK, J.M.; LEE, J.Y.; PARK, T.S.; KIM, S.Y.; KIM, Y.S.; JO, C.; BYUN, M.W. Physiological activity of irradiated green tea polyphenol on the human skin. **Am J Chin Med.**, v.33, n.4, p.535-546, 2005.

AQUINO, R.; MORELLI, S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, A.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; BONINA, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. **J Ethnopharmacol.**, v.79, n.2, p.183-191, 2002.

ARICIOGLU, A.; BOZKURT, M.; BALABANLI, B.; KILINC, M. NAZAROGLU, N.K.; TURKOZKAN, N. Changes in zinc levels and superoxide dismutase activities in the skin of acute, ultraviolet-B-irradiated mice after treatment with Ginkgo biloba extract. **Biol Trace Elem Res.**, v.80, n.2, p.175-179, 2001.

ASZTERBAUM, M.; BEECH, J.; EPSTEIN, E.H.J. Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas. **J Invest Dermatol.**, v.4, p.41-45, 1999.

BALE, A.E.; YU, K.P. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. **Hum Mol Genet.**, v.10, p.757-762, 2001.

BATCHELDER, R.J.; CALDER, R.J.; THOMAS, C.P.; HEARD, C.M. In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Camellia sinensis*. **Int J Pharm.**, v.283, n.1-2, p.45-51, 2004.

BECHELLI, L.M.; CURBAN, G.V. **Compêndio de dermatologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1975. 588p.

BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **Br J Dermatol.**, v.149, n.4, p.841-849, 2003.

BÉLGICA - European Commission . Health & Consumer Protection Directorate - General. SCCP/0970/06. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Basic Criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Atualizado em março de 2006 e adotado pela SCCP em 28 de março de 2006. Disponível em:

http://www.ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf

Acesso em: 15 de junho de 2006.

BÉLGICA – The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility, 1997. Disponível em: <http://www.colipa.com> . Acesso em 17 de janeiro de 2006.

BENEDETTO, A.V. The environment and skin aging. **Clin Dermatol.**, v.16, p.129-139, 1998.

BISSET, D.L.; CHATTERJEE, R.; HANNON, D.P. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.7, p.56-62, 1990.

BISSET, D.L.; HILLERBRAND, G.G.; HANNON. The hairless moues as a model of skin photoaging: its use to evaluate photoprotective materials. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.6, p.228-233, 1989.

BONINA, F.; PUGLIA, C.; AVOGADRO, M.; BARANELLI, E. CRAVOTTO, G. The topical protective effect of soybean-germ oil against UVB-induced cutaneous erythema: an *in vivo* evaluation. **Arch Pharm.**, v.338, p.598-601, 2005.

BONINA, F.; PUGLIA, C.; TOMAINO, A.; SAIJA, A.; MULINACCI, N.; ROMANI, A.; VINCIERI, F.F. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. **J Pharm Pharmacol.**, v.52, n.10, p.1279-1285, 2000.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.**, v.186, p.343-355, 1990.

BOUDRY, I.; BLANCK, O.; CRUZ, C. ; BLANCK, M.; VALLET, V.; BAZIRE, A.; CAPT, A.; JOSSE, D.; LALLEMENT, G. Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models *in vitro* and human skin grafted onto nude mouse skin model *in vivo*. **J Appl Toxicol.**, DOI: 10.1002/jat.1317, 2007.

BRASH, D.E. Sunlight and the onset of skin cancer. **Trends Genet.**, v.13, p. 410-414, 1997.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos – Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm> Acesso em 21 de setembro de 2006.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2003. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf> . Acesso em 17 de janeiro de 2006.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, maio de 2004. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>> . Acesso em 22 de janeiro de 2005.

BRÉGÉGÈRE, F.; SOROKA, Y.; BISMUTH, J.; FRIGUET, B.; MILNER, Y. Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load. **Exp Gerontol.**, v.38, n.6, p.619-629, 2003.

BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochem J.**, v.330, p.1173-1178, 1998.

BUSHAN, M.; CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J.; ANDREW, S.M.; KIMBER, I.; GRIFFITHS, C.E. Tumor necrosis factor-alpha-induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. **Br J Dermatol.**, v.146, n.1, p.32-40, 2002.

CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; LÓPEZ, M.C. Determination of tea components with antioxidant activity. **J Agric Food Chem.**, v.51, n.15, p.4427-4435, 2003.

CAPORAL-GAUTIER, J. ; NIVET, J.M. ; ALGRANTI, P. ; GUILLOTEAU, M. ; HISTE, M. ; LALLIER, M. ; NGUYEN-HUU, J.J. ; RUSSOTTO, R. Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP – I. Méthodologie. **STP Pharma Pratiques**, v.2, n.4, 205-226, 1992.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR, W.A.; JABOR, J.R. SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech.**, v.7, n.1, p.E10, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.; FONSECA, M.J. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **Int J Pharm.**, v.328, n.2, p.183-190, 2007.

CHEN, F.; WU, A.; SHIEH, P.; KUO, D.; HSIEH, C. Evaluation of the antioxidant activity of Ruellia tuberosa. **Food Chem.**, v.94, p.14-18, 2006.

CHEN, J.X.; ZENG, H.; CHEN, X.; SU, C.Y.; LAI, C.C. Induction of heme oxygenase-1 by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage. **Pharmacol Res.**, v.43, p. 63-69, 2001.

CHEN, L.; LEE, M.; LI, H.; YANG, C.S. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metab Dispos.**, v.25, p.1045–1050, 1997.

CHENG, Z.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W. Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. **Anal Bioanal Chem.**, v.375, p.376-380, 2003.

CHIU, A.E.; CHAN, J.L.; KERN, D.G.; KOHLER, S.; REHMUS, W.E.; KIMBALL, A.B. Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. **Dermatol Surg.**, v.31, n.7, p.855-60, 2005.

CHIU, A.E.; KIMBALL, A.B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. **Br J Dermatol.**, v.149, n.4, p.681-691, 2003.

CHUNG, J.H.; HAN, J.H.; HWANG, E.J.; SEO, J.Y.; CHO, K.H.; KIM, K.H.; YOUN, J.I.; EUN, H.C. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. **FASEB J.**, v.17, n.13, p.1913-1915, 2003.

CHUNG, J.H.; SEO, J.Y.; CHOI, H.R.; LEE, M.K.; YOUN, C.S.; RHIE, G.E. et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*. **J Invest Dermatol.**, v.117, p.1218-1224, 2001.

CLÉMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. **J Control Release**, v. 66, p. 243-254, 2000.

CORAZZA, S.; BARRETO, D.W.; GOUVEA, M.C.; BARRETO, R.C.R. Algas marinhas em sabonetes. **Cosm Toil. (edição em português)**, v.7, mar/abr, p.56-60, 1995.

DAL'BELO, S.E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Res Technol.**, v.12, p.241-246, 2006.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation

of organic sunscreens after UVA irradiation. **J Photochem Photobiol B.**, v.82, p.204-213, 2006.

DARR, D.; DUNSTON, S.; FAUST, H.; PINNELL, S. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. **Acta Derm Venereol.**, v.76, p.264-268, 1996.

DE POLO, K. F. **A short textbook of cosmetology**. ed.1, Verlag Fur Chemische Industrie, p.335-423, 1998.

DIAMOND, B.J.; SHIFLETT, S.C.; FEIWEL, N.; MATHEIS, R.J.; NOSKIN, O.; RICHARDS, J.A.; SCHOENBERGER, N.E. Ginkgo biloba Extract: Mechanisms and Clinical Indications. **Amh Phys Mad Rehabil.**,v.81, p.668-678, 2000.

DRAELOS, Z.D. Botanicals as topical agents. **Clin Dermatol.**, v.19, p.474-477, 2001.

DUBBER, M.J.; SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD G.S., KANFER, I. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in Ginkgo biloba oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.**, v.37, p.723–731, 2005.

EBERLEIN-KÖNIG; B.; PLACZEK, M.; PRZYBILLA, B. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E). **J Am Acad Dermatol.**, v.38, n.1, p.45-48, 1998.

ECKERT, R.L.; CRISH, J.F.; EFIMOVA, T.; BALASUBRAMANIAN, S. Opposing action of curcumin and green tea polyphenol in human keratinocytes. **Mol Nutr Food Res.**, v.50, n.2, p.123-129, 2006.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clin Dermatol.**, v.13, p.375-380, 1995.

EHLERS, C.; IVENS, U.I.; MØLLER, M.L.; SENDEROVITZ, T.; SERUP, J. Comparison of two pH meters used for skin surface pH measurement: the pH

meter 'pH900' from Courage & Khazaka versus the pH meter '1140' from Mettler Toledo. **Skin Res Technol.**, v.7, n.2, p.84-9, 2001.

EL-ABASERI, T.B; PUTTA, S.; HANSEN, L.A. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. **Carcinogenesis.**, v.27, p.225-231, 2006.

ELLNAIN-WOJTASZEK, M.; KRUCZYNSKI, Z.; KASPRZAK, J. Investigation of the free radical scavenging activity of Ginkgo biloba L. leaves. **Fitoterapia**, v.74, p.1–6, 2003.

ELMETS, C.A; SINGH, D.; TUBESING, K.; MATSUI, M.; KATIYAR, S.; MUKHTAR, H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. **J Am Acad Dermatol.**, v.44, n.3, p.425-432, 2001.

ENJELKE, M.; JENSEN, J. M.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; PROKSCH, E. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. **Br J Dermatol.**, v.137, p.219-225, 1997.

EUA - Department of Health and Human Services Food and Drug Administration - FDA. Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls: *In vitro* Release Testing and *In vivo* Bioequivalence Documentation. Maio de 1997. Disponível em: www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf . Site visitado em: 10 de janeiro de 2006.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.19, p.56-72, 2003.

FANG, J.Y.; HWANG, T.L.; HUANG, Y.L.; FANG, C.L. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. **Int J Pharm.**, v.9, n.310, p.131-138, 2006.

FANG, J.Y.; TSAI, T.H.; LIN, Y.Y.; WONG, W.W.; WANG, M.N.; Huang, J.F. Transdermal delivery of tea catechins and theophylline enhanced by terpenes: a mechanistic study. **Biol Pharm Bull.**, v.30, n.2, p.343-349, 2007.

FAZEKAS, Z.; GAO, D.; SALADI, R.N.; LU, Y.; LEBWOHL, M.; WEI, H. Protective effects of lycopene against ultraviolet B-induced photodamage. **Nutr Cancer.**, v.47, n.2, p.181-187, 2003.

FERRUZZI, M.G.; GREEN, R.J. Analysis of catechins from milk–tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. **Food Chem.**, v.99, p. 484–491, 2006.

FISCHER, A. **Contact Dermatitis**, 2nd ed., Philadelphia, 1995.

FISHER, G.J.; DATTA, S.; WANG, Z.Q.; LI, X.Y.; QUAN, T.H.; CHUNG, J.H.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. C-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by alltrans retinoic acid. **J Clin Invest.**, v.106, n.5, p.663-670, 2000.

FISHER, G.J.; DATTA, S.C.; TALWAR, H.S.; WANG, Z.Q.; VARANI, J.; KANG, S. VOORHEES, J.J. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. **Nature**, v.379, p.335-339, 1996.

FOX, C. Advances in cosmetics science and technology IV. Skin care and treatment (Review). **Cosm Toil.**, v.110, p.63, 1995.

FULLERTON, A.; FISCHER, T.; LAHTI, A.; WILHELM, K.P.; TAKIWAKI, H.; SERUP, J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema: a report from standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.35, p.1-10, 1996.

GABORIAU, F.; MORLIERE, P.; MARQUIS, I.; MOYSAN, A.; GEZE, M.; DUBERTRET, L. Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. **Photochem Photobiol.**, v.58, p.515-520, 1993.

GARDÈS-ALBERT, M.; FERRADINI, C.; SEKAKI, A.; DROY-LEFAIX, M.T. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202, In: FERRADINI, C.; DROY-LEFAIX, M.T.; CHRISTEN, Y. **Advances in Ginkgo biloba extract research**, v.2. Ginkgo biloba extract (EGb 761) as a free-radical scavenger, Paris: Elsevier, p.1-11, 1993.

GASPAR LR, CAMPOS PM. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **Int J Pharm.**, v.343, n.1-2, p.181-189, 2007.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the protective effect of alpha-tocopheryl acetate in a sunscreen, preventing erythema formation, transepidermal water loss and sunburn cell formation. **IFSCC Magazine**, v.6, n.3, p. 213-217, 2003.

GIACOMONI, P.U. Radiazione ultravioletta, invecchiamento e blebs. **G Gerontol.**, v.43, p.209-210, 1995.

GILLIS, G.; NORTON, S.J.; BISHOP. M. A Botanical anti-sagging / firming blend. **Cosm Toil**, v.11, p.65-68, 2002.

GOHIL, K.; MOY, R.K.; FARZIN, S.; MAGUIRE, J.J.; PACKER, L. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to Ginkgo biloba extract: induction of antioxidant response and the Golgi system. **Free Radic Res.**, v.33, p.831-849, 2000.

GOLD, P.E; CAHILL, L.; WENK, G.L. Ginkgo biloba: a cognitive enhancer? **Psychological Science in the public interest**. v.3, n.1, p.2-11, 2002.

GOLDSMITH, L.A. My organ is bigger than your organ. **Arch Dermatol.**, v.126, p.301-302, 1990.

GOMES, A. L.; LANGER, C.M.; OLIVEIRA, E. C.; VAIROLETTO, L. Diferentes tipos de pele: diferentes necessidades cosméticas. In: Congresso Nacional de Cosmetologia, 12, São Paulo, 1998. Anais. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, p.220-231, 1998.

GORDON, M.H.; ROEDIG-PENMAN, A. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. **Chem Phys Lipids.**, v.97, n.1, p.79-85, 1998.

GRANSTEIN, R.D. Photoimmunology. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.M.; AUSTEN, K.F. 4.ed. **Dermatology in General Medicine**. New York, McGraw-Hill, Inc., cap.132, p.1638-1650, 1993.

GREWE, M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. **Clin Exp Dermatol.**, v.26, n.7, p.608-612, 2001.

GUTIERREZ, L.E. Aula “Biotecnologia de alimentos e bebidas” da disciplina Biotecnologia de Alimentos e Bebidas. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/lan/biotec3/biotec3.htm> . Acesso em 18 de janeiro de 2007.

HADGRAFT, J. Skin deep. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.58, n.2, p.291-299, 2004.

HALL, P.A.; MCKEE, P.H.; MENAGE, H.P.; DOVER, R.; LANE, D.P. High photolevel of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. **Oncogene**, v.8, p.203-207, 1993.

HALLER, P.H. Aplicações de lipídeos e fosfolipídeos em cosméticos. **Cosm Toil.**, v.1, n.4, p.33-40, 1989.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr Rev.**, v.55 p.S49-52, 1997.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic Biol Med.**, v.16, n.6, p.845-850, 1994.

HANGAY, G.; KELEN, A. Improvement of skin condition by herb-extracts and their complexes. In: IFSCC Congress, 22, 2002, Edinburgh, Escócia. Anais, 2002, CD ROM.

HEINRICH, U.; NEUKAM, K.; TRONNIER, H.; SIES, H.; STAHL, W. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. **J Nutr.**, v.136, n.6, p.1565-1569, 2006.

HENNESSY, A.; OH, C.; REES, J.; DIFFEY, B. The photoadaptive response to ultraviolet exposure in human skin using ultraviolet spectrophotometry. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.21, n.5, p.229-233, 2005.

HERMANN, J.F.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PIÉRARD, G.E. Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview. **Int J Cosmet Sci.**, v.22, p.67-71, 2000.

HIBATALLAH, J.; CARDUNER, C.; POELMAN, M. In-vivo and in-vitro assessment of the free-radical-scavenger activity of ginkgo flavone glycosides at high concentration. **J Pharm Pharmacol.**, v.51, p.1435-1440, 1999.

HIGUCHI, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **J Pharm Sci.**, v.51, p.802-804, 1962.

HIYACHI, Y. Photoaging from an oxidative standpoint. **J Dermatol Sci.**, v.9, p.79-86, 1995.

HOLBROOK, K.A.; WOLFF, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLF, K. **Dermatology in general medicine**, 4th ed., New York: McGraw-Hill, 1993, cap.16, p.241-253.

HSU, S. Green tea and the skin. **J Am Acad Dermatol.**, v.52, n.6, p.1049-1059, 2005.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.J.; BOULANGER, B. ; CHAPUZET, E. ; CHIAP, P. ; COHEN, N. ; COMPAGNON, P.A. ; DEWE, W. ; FEINBERG, M. ; LALLIER, M. ; LAURENTIE, M. ; MERCIER, N. ; MUZARD, G. ; NIVET, C. ; VALAT, L. Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches. **STP Pharma Pratiques**, v.13, n.3, p.101-138, 2003.

IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosm Toil.**, v.108, n.2, p.79-94, 1993.

JI, Y.; XU, Q.; HU, Y.; HEYDEN, Y.V. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v.1066, p.97-104, 2005.

KAIDBEY, K.H.; KLIGMAN, A.M. The acute effects of long-wave ultraviolet radiation on human skin. **J Invest Dermatol.**, v.72, n.5, p.253-256, 1978.

KARTAL, M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. **J Pharm Biom Anal.**, v.26, p. 857 – 864, 2001.

KATİYAR, S.K.; AGARWAL, R.; MUKTAR, H. Inhibition of spontaneous and photo-enhanced lipid peroxidation in mouse epidermal microsomes by epicatechin derivatives from green tea. **Cancer Lett.**, v.79, p.61-66, 1994.

KATİYAR, S.K.; BERGAMO, B.M.; VYALIL, P.K.; ELMETS, C.A. Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. **J Photochem Photobiol B**, v.65, n.2-3, p.109-14, 2001.

KATİYAR, S.K.; CHALLA, A.; McCORMICK, T.S; COOPER, K.D.; MUKHTAR, H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. **Carcinogenesis**, v.20, p.2117-2124, 1999.

KATİYAR, S.K.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen presenting cells and oxidative stress. **J Leukoc Biol.**, v.69, p. 719–726, 2001.

KATİYAR, S.K.; PEREZ, H.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. **Clin Cancer Res.**, v.6, p.3864-3869, 2000.

KIELBASSA, C.; EPE, B. DNA damage induced by ultraviolet and visible light and its wavelength dependence. **Methods Enzymol.**, v.319, p.436-445, 2000.

KIM, S.J. Effect of biflavones of Ginkgo biloba against UVB-induced cytotoxicity *in vitro*. **J Dermatol.**, v.28, p.193-199, 2001.

KIM, S.J.; LIM, M.H.; CHUN, I.K.; WON, Y.H. Effects of flavonoids of Ginkgo biloba on proliferation of human skin fibroblast. **Skin Pharmacol.**, v.10, n.4, p.200-205, 1997.

KIM, Y.H.; YANG, H.E.; PARK, B.K.; HEO, M.Y.; JO, B.K.; KIM, H.P. The extract of the flowers of *Prunus persica*, a new cosmetic ingredient, protects against solar ultraviolet-induced skin damage *in vivo*. **J Cosmet Science**, v.53, n.1, p.27-34, 2002.

KLIGMAN, L.H., KLIGMAN, A.M. The nature of photoageing: its prevention and repair. **Photodermatology**, v.3, p.215–227, 1986.

KORKINA, L.G.; AFANAS'EV, I.B. In: SIES, H. **Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy**. San Diego: Academic Press, p.151-163, 1997.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANI, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **J Ethnopharmacol.**, v.41, p.121-126, 1994.

KWAK, W.J; HAN, C.K; SON, K.H; CHANG, H.W; KANG, S.S; PARK, B.K; KIM, H.P. Effects of Ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and *in vivo* skin inflammation. **Planta Med.**, v. 68, n.4, p.316-21, 2002.

LAFFORGUE, C.; MARTY, J.P. Percutaneous absorption. **Ann Dermatol Venereol.**, v.134, n.3, p.18-23, 2007.

LAHTI, A.; KOPOLA, H.; HARILA, R.; MYLLYLÄ, R.; HANNUKSELA. Assessment of skin erythema by eye, laser Doppler flowmeter, spectroradiometer, two-channel erythema meter and Minolta chroma meter. **Arch Dermatol Res.**, v.285, p.278-282, 1993.

LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.52, n.2, p.113-119, 2001.

LAVKER, R.M.; GERBERICK, F.; VERES, D.; IRWIN, C.J.; KAIDBEY, K.H. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. **J Am Acad Dermatol.**, v.32, n.1, p.52-62, 1995b.

LAVKER, R.M.; VERES, D.A.; IRWIN, C.J.; KAIDBEY, K.H. Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to

suberythemogenic doses of UVA in human skin. **Photochem Photobiol.**, v. 62, p. 348-352, 1995a.

LEE, J.H.; CHUNG, J.H.; CHO, K.H.J. The effects of epigallocatechin-3-gallate on extracellular matrix metabolism. **Dermatol Sci.**, v.40, n.3, p.195-204, 2005.

LEE, J.K.; KIM, J.H.; NAM, K.T; LEE SH. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. **J Dermatol Sci.**, v.32, n.3, p.171-179, 2003.

LIANG, H.; LIANG, Y.; DONG, J.; LU, J.; XU, H.; WANG, H,. Decaffeination of fresh green tea leaf (*Camellia sinensis*) by hot water treatment. **Food Chem.**, v.101 p.1451-1456, 2007.

LIANG, Y.; LU, J.; ZHANG, L. Comparative study of cream in infusions of black tea and green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. **Int J Food Sci Tech.**, v.37, p.627-634, 2002.

LIM, H.; SON, K.H.; CHANG, H.W; KANG, S.S.; KIM, H.P. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol Pharm Bull.**, v.29, n.5, p.1046-1049, 2006.

LIN, Q.; WANG, J.; QIN, D.; BJÖRN, B. Influence of amphiphilic structures on the stability of polyphenols with different hydrophobicity. **China Ser B-Chem.**, v.50, n.1, p.121-126, 2007.

LOCK-ANDERSEN, J.; THERKILDTSEN, P.; DE FINE, O. F.; GNIADECKI, M.; DAHLSTRØM, K.; POULSEN, T.; WULF, H.C. Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity. **Photoimmunol Photomed.**, v.13, p.153-158, 1997.

LOWE, N.J.; MEYERS, D.P.; WIEDER, J.M.; LUFTMAN, D.; BORGET, T.; LEHMAN, M.D., et al., Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. **J Invest Dermatol.**, v.105, p.739- 43, 1995.

LU, Y.; LOU, Y.; YEN, P.; MITCHELL, D.; HUANG, M.; CONNEY, A. Time course for early adaptive responses to Ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. **Cancer Res.**, v.59, p.4591-4602, 1999.

LUCISANO-VALIM YM, KABEYA LM, KANASHIRO A, RUSSO-CARBOLANTE EM, POLIZELLO AC, AZZOLINI AE, SILVA SC, LOPES JL, DE OLIVEIRA CA, MANTOVANI B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.47, n.1, p.53-58, 2002.

MACLENNAN, K.M.; DARLINGTON, C.L.; SMITH, P.F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. **Prog Neurobiol.**, v.67, n.3, p.235-257, 2002.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. **J Invest Dermatol.**, v.121,n.2, p.231-241, 2003.

MAHADY, G. B. **Ginkgo biloba**: A Review of Quality, Safety and Efficacy. Nutritional in Clinical Care, Washington, v.4, ed.3, p.140, 2001.

MAIA CAMPOS, G. G.M.C. Software versão 6.1 Desenvolvido no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, 1999.

MAIA CAMPOS, P.M.; GIANETI, M.; KANASHIRO, A.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; GASPAR, L.R. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. **Photochem Photobiol.**, v.82, n.3, p.683-688, 2006.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.V.L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol Cosmet.**, v.79, p.8-11, 1992.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; RICCI, G.; SILVA, G.M.; SANTOS, E.B.; LOPES, R.A.; SEMPRINI, M. Histopathological, morphometric and stereologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. **J Cosmet Sci.**, v.50, 1999.

MAITRA, I.; MARCOCCI, L.; DROY-LEFAIX, M.T.; PACKER, L. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. **Biochem Pharmacol.**, v.49, p.1649-1655, 1995.

MAJCHRZAK, D.; MITTER, S.; ELMADFA, I. The effect of ascorbic acid on total activity of black and green teas. **Food Chem.**, v.88, p.447-451, 2004.

MAJOR, R.T. The ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of Ginkgo biloba L. to pests accounts in part for the longevity of this species. **Science**, v.157, p.1270-1273, 1967.

MARCOCCI, L.; MAGUIRE, J.J.; DROY-LEFAIX, M.T.; PACKER, L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.201, p.748-755, 1994.

MARTINEZ-FLORES, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUNON, M.J. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. **Nutr Hosp.**, v.17, n.6, p.271-278, 2002.

MARTY, J.P. La penetration cutanee des toxiques, 26 Congrès National de Medicine du Travail, Lille - França, 6 a 9 junho, 2000. Disponível em: <<http://www3.univlille2.fr/medtrav2000/Lepointsurapprofondir/lepointsurapprofondir5.htm>> Acesso em 15 de março de 2006.

MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I. Contact allergy: predictive testing in man. **Contact Dermatitis**, v.2, p.1-17, 1976.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.195, p.298-308, 2004.

MCVEAN, M.; LIEBLER, D.C. Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied α -tocopherol. **Carcinogenesis**, v.18, n.8, p.1617-1622, 1997.

MEGURO, S.; ARAI, Y.; MASUKAWA, K.; UIE, K.; TOKIMITSU, I. Stratum corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin. **Photochem Photobiol.**, v.69, n.3, p.317-321, 1999.

MESBAH, M.K.; KHALIFA, S.I.; EL-GINDY, A.; TAWFIK, K.A. HPLC determination of certain flavonoids and terpene lactones in selected Ginkgo biloba L. phytopharmaceuticals. **II Farmaco**, v.60, p.583–590, 2005.

MILLER, CC; HALE, P; PENTLAND, A.P. Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. **J Biol Chem.**, v.269, p.3529-3533, 1994.

MUTHUMANI, T.; KUMAR, R.S.S. Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. **Food Chem.**, v.101, p.98-102, 2007.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food Chem Toxicol.**, v.40, n.12, p.1745-1750, 2002.

NWUHA, V.; NAKAJIMA, M.; TONG, J.; ICHIKAWA, S. Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils. **J Food Eng.**, v.40, p.161-165, 1999.

OLIVEIRA, L.C; BLOISE, M.I. Extratos e óleos naturais vegetais funcionais. **Cosm Toil. (edição em português)**, v.7, mar/abr, p.30-37, 1995.

OLIVEIRA, L.M. Benefícios Comprovados de Óleos Brasileiros. **Cosm Toil. (edição em português)**, v.15, n.5, p.50-55, 2003.

OMS (Organização Mundial da Saúde). KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUB, S.; MANGELSDORF, I. Dermal Absorption. WHO / IPCS Environmental Health Criteria, Fevereiro de 2005. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/methods/dermal_absorption/en/ . Acesso em 25 de janeiro de 2006.

OUHTIT, A.; MULLER, K.; DAVIS, D.W.; ULLRICH, S.E.; MCCONKEY, D.; ANANTHASWAMY, H.N. Temporal events in skin injury and early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **Am J Pathol.**, v.156, p.201-207, 2000.

OZKUR, M.K.; BOZKURT, M. S.; BALABANLI, B.; ARICIOGLU, A.; ILTER, N.; GÜRER, M. A.; INALÖZ, H.S. The effects of EGb 761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v. 18, n.3, p.117, 2002.

PAPADOPOULOS, K.; TRIANTIS, T.; YANNAKOPOULOU, E.; NIKOKAVOURA, A.; DIMOTIKALI, D. Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence. **Anal Chim Acta.**, v.494, p.41-47, 2003.

PATHAK, M.A.; FITZPATRICK, T.B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.M.; AUSTEN, K.F. 4. ed. **Dermatology in General Medicine**. New York, McGraw-Hill, Inc., 1993, cap.137, p.1689-1716.

PELILLO, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; GALLINA-TOSCHI, T.; VANZINI, M.; LERCKER, G. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. **Food Chem.**, v.78, p.369–374, 2002.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; OSVALDO, J.A.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Farmaco** v.53, n.6, p.421-424, 1998.

PIETSCHMANN, A; KUKLINSKI, B; OTTERSTEIN, A. Protection from uv-light-induced oxidative stress by nutritional radical scavengers. **Z. Gesante Inn Med.**, v.47, n.11, p.518-522, 1992.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod.**, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINCEMAIL, J.; DUPUIS, M.; NASR, C.; HANS, P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R.; DEBY, C. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. **Experientia**, v.45, p.708-712, 1989.

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

PODDA, M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clin Exp Dermatol.**, v.26, p.578-582, 2001.

PODDA, M.; TRABER, M.G.; WEBER, C.; YAN, L.J.; PACKER, L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. **Free Radic Biol Med.**, v.24, n.1, p.55-65, 1998.

POTARD, G.; LAUGEL, C.; BAILLET, A; SCHAEFER, H.; MARTY, J.P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during *in vitro* percutaneous penetration studies. **Int J Pharm.**, v.189, p.249-260, 1999.

PRONIUK, S.; LIEDERER, B.M.; BLANCHARD, J. Preformulation Study of Epigallocatechin Gallate, a Promising Antioxidant for Topical Skin Cancer Prevention. **J Pharm Sciences**, v.91, n.1, 2002.

RANGARAJAN, M.; ZATZ, J.L. Skin delivery of vitamin E. **J Cosmet Sci**, v.50, p.249-279, 1999.

REAGAN-SHAW, S.; AFAQ, F.; AZIZ, M.H.; AHMAD, N. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. **Oncogene**, v.23, n.30, p.5151-5160, 2004.

RICHERT, S.; SAUERMAN, G.; STEINHARDT, H.; HOPPE, U. Oxidative protein modification in human skin and their dependence on biological parameters. In: IFSCC CONGRESS, 19, 1996, Sydney, Anais, Sidney, 1996.

RIMBACH, G.; GOHIL, K.; MATSUGO, S. et al. Induction of glutathione synthesis in human keratinocytes by Ginkgo biloba extract (EGb 761). **Biofactors**, v.15, p.39-52, 2001.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **J Biochem Pharmacol.**, v.37, p.837-841, 1988.

ROGIERS, V. The potential use of non-invasive methods in the safety assessment of cosmetic products – The report and recommendations of ECVAM/EEMCO Workshop 36. **Altern Lab Anim**, n.27, p.515-537, 1996.

ROPKE, C.D.; MEIRELLES, R.R.; DA SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.; BARROS, S.B. Pothomorphe umbellata extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. **Photochem Photobiol.**, v.78, p.436-439, 2003.

ROTHWELL, J.A.; DAY, A.J.; MORGAN, M.R.A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **J Agric Food Chem.**, v.53, p.4355-4360, 2005.

ROW, K.H.; JIN, Y. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. **Bioresour Technol.**, v.97, n.5, p.790-793, 2006.

SAMS, M.; MORAGAS, A. Mathematical morphologic analysis of the aortic medial structure. Biochemical implications. **Anal Quant Cytol Histol.**, v.15, n.2, p.93-100, 1993.

SANDER, C.S.C. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. **J Invest Dermatol.**, v.118, p.618-625, 2002.

SCHOLTYSSSEK, H.; DAMERAU, W.; WESSEL, R.; SCHIMKE, I. Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. **Chem Biol Interact.**, v.106, n.3, p.183-190, 1997.

SEGGER, D.; AßMUS, U.; BROCK, M.; ERASMY, J.; FINKEL, P.; FITZNER, A.; HEUSS, H.; KORTEMEIER, U.; MUNKE, S.; RHEINLÄNDER, T.; SCHMIDT-LEWERKÜHNE, H.; SCHNEIDER, W.; WESER, G. Multicenter Study on Measurement of the Natural pH of the Skin Surface. **IFSCC Magazine**, v.10, n.2, p.107-110, 2007.

SEVIN, A.; OZTAŞ, P.; SENEN, D.; HAN, U.; KARAMAN, C.; TARIMCI, N.; KARTAL, M.; ERDOĞAN, B. Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: an experimental study on rats. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v.21, n.5, p.650-6, 2007.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US

Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J Chromatogr A**, v.987, p.57-66, 2003.

SHAH, V.; ELKINS, J.; WILLIAMS, R.L. Role of *in vitro* release measurement in semisolid dosage forms. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption: Drugs – Cosmetics – Mechanisms – Methodology**. 3ed, Nova Iorque: Marcel Dekker, 1999.

SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of Vitamins in Skin Care. **Nutrition**, v.17, n.10, p.839-844, 2001.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **J Invest Dermatol.**, v.100, n.3, p.260-265, 1993.

SILVA, C.R. Bioativos Tropicais com Eficácia Comprovada. **Cosm Toil. (edição em português)**, v.14, n.1, p.42-46, 2002.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS; P.M.B.G. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skin care formulation. **Int J Cosmet Sci.**, v.22, n.3, p.169-179, 2000.

SOTER, N.A. Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. **Semin Dermatol.**, v.9, n.1, p.11-15, 1990.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. *Science*, Washington, v.257, p.1220-1224, 1992.

STEENVOORDEN, D.P.; VAN-HENEGOUWEN, G.M. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **J Photochem Photobiol B**, v.41, n.1-2, 1997.

STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosm Toil. (edição em português)**, v. 7, p.29, 1995.

SYED, T.A.; WONG, W.H.; AHMAD, S.A.; ALY, R. Phase II, clinical evaluation of 2% polyphenone (green tea extract) in a hydrophilic gel to assess improvement in

damaged and premature aged facial skin: a placebo-controlled, double-blind study. **J Am Acad Dermatol.**, v.50, n.3, p.25, 2004.

TAVEIRA, S.T. Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo *in vitro* em cultura de células tumorais. 2007. 160f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

TÈRAN, E. Plantas de interesse da cosmetologia. **Cosm Toil. (edição em português)**, v.2, p.18-23, set/out, 1990.

THIELE, J.J.; TRABER, M.G.; PACKER, L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive *in vivo* marker of UV induced photo-oxidation. **J Invest Dermatol.**, v.110, p.756-761, 1998.

THIERS, S. ; TASSEAU, O. Les cosméceutiques: cosmétiques ou médicaments? **Le MiDiFABs**, v.3, p.47-56, 2005.

TREVITHICK, J.R.; XIONG, H.; LEE, S.; SHUM, D.T.; SANFORD, S.E.; KARLIK, S.J.; NORLEY, C.; DILWORTH, G.R. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. **Arch Biochem Biophys.**, v.296, n.2, p.575-582, 1992.

UCHIDA, S.; OZAKI, M.; SUZUKI, K.; SHIKITA, M. Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin 3-galatte (green tea tannin) in mice. **Life Sci.**, v.50, p.147-152, 1992.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; MORAZZONI, P.; ROVERI, A.; PIFFERI, G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Rad Biol Med.**, v.16, n.5, p.547-553, 1994.

VALFRÉ, H. Fitocosmética. **Cosm Toil. (edição em português)**, v.2, p.9-14, set/out, 1990.

VAN BEEK, T.A. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts, **Journal Chromatogr A**, v.967, p.21-55, 2002.

VAN DYKE, K.; MCCONNELL, P.; MARQUARDT, L. Green tea extract and its polyphenols markedly inhibit luminol-dependent chemiluminescence activated by peroxynitrite or SIN-1. **Luminescence**, v.15, n.1, p.37-43, 2000.

VARANI, J.; SPEARMAN, D.; PERONE, P.; FLIGIEL, S.E.G.; DATTA, S.C.; WANG, Z.Q. et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen *in vitro*. **Am J Pathol.**, v.158, p.931-942, 2001.

VAYALIL, P.K.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis**, v.24, p.927-936, 2003.

WAGNER, H. Multitarget therapy – The future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine*, v.13, p.122-129, 2006.

WEI, H.; ZHANG, X.; ZHAO, J.; WANG, Z.; BICKERS, D.; LEBWOHL, M. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green tea and black teas. **Free Rad Biol Med.**, v.26, n. 11-12, p.1427-1435, 1999.

WEI, H; BOWEN, R; ZHANG, X; LEBWOHL, M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis**, v.19, n.8, p.1509-1514, 1998.

WEI, H; WEI, L; FRENKEL, K; BOWEN, R.; BARNES, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. **Nutr Cancer**, v.20, n.1, p.1-12, 1993.

WEST, M.D. The cellular and molecular biology of skin aging. **Arch Dermatol.** v.130, n.1, p.87-95, 1994.

WIDYARINI, S; SPINKS, N; HUSBAND, A.J; Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation immune suppression induced UV radiation. **Photochem Photobiol.**, v.74, p.465-470, 2001.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POOR, I.; NADERI, L.; MA, W.; SCHNEIDER, L.A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHULLER, J.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **J Photochem Photobiol B**, v.63, p.41–51, 2001.

WORTEL, V.A.L.; WIECHERS, J. Skin sensory performance of individual personal care ingredients and market personal care products. **Food Quality and Preference**, v.11, p.121-127, 2000.

WULF, H.C.; SANDBY-MØLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v.35, p.185-191, 2004.

XIE, P.; CHEN, S.; LIANG, Y.; WANG, X.; TIAN, R.; UPTON, R. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. **J Chromatogr A**, v.1112, p.171–180, 2006.

YOUNG, A.R.; POTTEN, C.S.; NIKAIIDO, O.; PARSONS, P.G.; BOENDERS, J.; RAMSDEN, J.M.; CHADWICK, C.A. Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA *in vivo* show comparable levels of thymine dimers. **J Invest Dermatol.**, v.111, p. 936-940, 1998.

ZHAO, J.; JIN, X.; YAPING, E.; ZHENG, Z.S.; ZHANG, Y.J.; ATHAR, M.; DELEO, V.A.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R.; WANG, Z.Y. Photoprotective effect of black tea extracts against UVB-induced phototoxicity in skin. **Photochem Photobiol.**, v.70, n.4, p.637-644, 1999b.

ZHAO, J.F.; ZHANG, Y.J.; JIN, X.H.; ATHAR, M.; SANTELLA, R.M.; BICKERS, D.R.; WANG, Z.Y. Green tea protects against psoralen plus ultraviolet A-induced photochemical damage to skin. **J Invest Dermatol.**, v.113, n.6, p.1070-1075, 1999a.

ZIEGLER, A.; JONASON, A.S.; LEFFELL, D.J.; SIMON, J.A.; SHARMA, H.W.; KIMMELMAN, J., et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nature**, v.372, p.773-776, 1994.

Anexos

Anexo 1

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Via do Café, s/n° - Fone: (16) 602-4181
Fax: (16) 633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Of 13 CEP/FCFRP/09/03/05

Ribeirão Preto, 09 de março de 2005.

Prezada Professora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação dos efeitos de formulações dermocosméticas contendo Extratos de Ginko Biloba e Camellia Sinensis na proteção de danos causados pela radiação ultravioleta*" (Protocolo nº 42-CEP/FCFRP), apresentado por V.S^a foi devidamente apreciado pelo CEP, desta Faculdade, em sua 40^a reunião, realizada no dia 08 de março p.p.e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção,

Atenciosamente,

Profª Drª Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCFRP

Ilma. Sra.

Profª Drª Patrícia Maria B.G. Maia Campos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP

Anexo 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 04.1.945.53.1), intitulado: "Avaliação dos Efeitos de Formulações Dermocosméticas Contendo Extratos de *Ginkgo Biloba* e *Camellia Sinensis* na Proteção de Danos Causados pela Radiação Ultravioleta", de autoria de **Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 16.11.2004.

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2004

Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Secretária da CEUA
Maria Angélica S. Depiro

Anexo 3

FICHE DE COMITE ETHIQUE INTERNE N°521/06
Annexes-PLCEA3

DIVISION EVIC-IOEC AVIS DU COMITE INTERNE D'EVIC FRANCE PREALABLEMENT AU LANCEMENT D'UNE ETUDE CLINIQUE

Promoteur : USP São Paulo – Brésil – Susi Elaine Dal'Bele – Docteurante
579

Réf. de l'étude : Im

Titre de l'étude : Patch Test 48 h

Sous-traitant : Néant

Réf. Etude client : SNP

Dénomination du ou des produit(s) à tester, (référence(s), n° de lot) :

Trois formules expérimentales faites d'un véhicule de base classique mélangé avec 6% d'extrait
glycolique de *Camellia sinensis* (thé vert) ou de 6% d'extrait glycolique de *Ginkgo Biloba* ou de l'association
des deux extraits, chacun à raison de 6%

Informations disponibles : Etudes (/) :

1 - formule(s) ☒ X

6 - résultats Bio sur le(s) produit(s) ☐ à fournir
préalablement

2 - mode(s) d'emploi ☒ X

7 - résultats Tox sur le(s) produit(s)

3 - détail(s) de vente sans coût

8 - résultats Jec sur le(s) produit(s)

4 - protocole signé ☐ à retourner

9 - proposition écrite sans objet (apocryphe
[v])

5 - MISE(s) d'engagement du promoteur signée ☐ à retourner

10 - échantillons produits ☐ à fournir

Membres du Comité		Documents consultés										Avis F = Favorable D = défavorable (à motiver)	Date	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Comité restreint														
Responsable Sécurité produ- its	F. Méro ou suppléant	X	X	S O	AF	AF	AF	S O	S O	S O	AF	Favorable	26/06/06	
Personnel commercial	W	X	X	S O	AF	AF	AF	S O	S O	S O	AF	Favorable	26/06/06	
Comité exceptionnel														
Responsable Sécurité produ- its	F. Méro ou suppléant													
Médecin généraliste														
Médecin spécialiste														
Toxicologue pharmacologue														
Canaloe														
Personnel commercial														

Légende : X ou date = reçu

SO : sans coût

AF : à fournir

Conclusion : **Avis favorable**

Lancement de l'étude :

Acceptation

☒ [X]

Refus ☐ [ ]

motif du refus :

Décision du PDG : **Avis favorable**

Date et signature du PDG **26/06/06**

Anexo 4

Study: In 628 – Results

48, rue Jean Duvert – 33290 BLANQUEFORT – France – Tél. : + 33 5 56 95 59 95 – Fax : + 33 5 56 95 05 22
57, rue Ulysse Gayon – 33000 BORDEAUX – France – Tél. + 33 5 57 14 00 80 – Fax : + 33 5 56 48 72 49

Date : September 07th, 2007
From : Dr Andreea KÖLÖNTE - Division IDEC
N° Message : 07/642

Sponsor : USP Sao Paulo
To : Susi Elaine DAL'BELO
e-mail : susi@fcfrp.usp.br

Study: In 628 –RESULTS

TITLE OF THE STUDY: CHECKING IN HUMAN OF THE SKIN COMPATIBILITY OF SEVEN COSMETIC PRODUCTS AFTER SINGLE APPLICATION UNDER PATCH – Patch test under dermatological control.

AIM OF THE STUDY: Checking of the skin compatibility of seven products, after single application to the skin (back) under exaggerated experimental conditions (under occlusive patch, for 24 hours).

Clinical examination 15 minutes and 24 hours after patch removal.

DATES OF THE STUDY: from August 29th to 31st, 2007

NUMBER OF VOLUNTEERS whose data are exploitable: 8 men and 2 women.

RESULTS

Test products	Control times after patch removal	Number of reactive volunteers	Types of reaction	Mean daily irritation score Mdis	Maximal mean irritation score MaxMis	% of reactive volunteers	Skin compatibility
Cream with rutine	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	
Cream with quercétine	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	
Cream with épigallocatechine-3-gallate	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	
Véhicule	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	
Cream containing 6% of green tea extract and 6% of Ginkgo biloba extract	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	
Cream containing 6% of green tea extract	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	
Cream containing 6% of Ginkgo biloba extract	15 minutes	0	None	0	0	0%	Very good
	24 hours	0	None	0		0%	