UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

ALEXANDRA DE ALMEIDA HÜBNER

**Caracterização fitoquímica e eficácia fotoprotetora clínica de formulações
cosméticas contendo extrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon**

São Paulo
2017

ALEXANDRA DE ALMEIDA HÜBNER

**Caracterização fitoquímica e eficácia fotoprotetora clínica de formulações
cosméticas contendo extrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Co-orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

A879c Almeida Hübner, Alexandra
Caracterização fitoquímica e eficácia
fotoprotetora clínica de formulações cosméticas
contendo extrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon
/ Alexandra Almeida Hübner. - São Paulo, 2017.
161 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Marianne Bacchi, Elfriede
Coorientador: Rolim Baby, Andre

1. Vitis vinifera L.. 2. FPS. 3. Fator de
proteção UVA. 4. Teste de Contato Repetitivo em
Humanos. 5. Fotoestabilidade. I. T. II. Marianne
Bacchi, Elfriede, orientador. III. Rolim Baby,
Andre, coorientador.

HÜBNER, A. A. Caracterização fitoquímica e eficácia fotoprotetora clínica de formulações cosméticas contendo extrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon. 2017. 161f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Aprovado em: ____/____/ 2017

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus amados, pais ***Antonina*** (*in memorian*) e ***Alvino***, pelo amor, afeto, estímulo e valorização da educação. Muita saudade...

Ao meu amado, amante e companheiro marido ***Alexsander***, pelo amor, incentivo e força em todos os momentos. Imensa gratidão!

Aos meus queridos filhos ***Nicolas Alexsander*** e ***Nadine***, pela compreensão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, *Jesus Cristo* e ao *Divino Espírito Santo* por iluminar meus caminhos.

À minha *família*, por ser o esteio da minha vida e a *Rosa Maria* por todo seu zelo, carinho e dedicação à minha casa e família. À minha companheira leal de quatro patas, *Piti*, pelas alegrias, amor e carinho ilimitado.

Aos meus mestres imenso respeito e admiração. À minha querida orientadora e pesquisadora exemplar, *Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi*, pela paciência, confiança e ensinamentos científicos e de vida. Ao meu querido co-orientador e visionário pesquisador, *Prof. Dr. André Rolim Baby*, pela sugestão do objeto de estudo e pelos valiosos conhecimentos transmitidos e experiências compartilhadas. *Serei eternamente grata a vocês!*

Ao querido *Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço*, pela paciência, ajuda com as análises microbiológicas e suporte estatístico. À querida *Profa. Dra. Ingrid Elida Collantes Díaz* pela competência química, ensinamentos e parceria. As queridas funcionárias da Central Analítica - IQ/USP *Dra. Giovana C. de Freitas Lemeszenksi* e *Dra. Vânia A. B. Bueno Silva* pela elucidação dos espectros de massas.

Aos queridos professores doutores *Nilsa Sumie Yamashita Wadt*, *José Luiz Aiello Ritto*, *Felipe Rebello Lourenço*, *Camila Areias de Oliveira* e *Ismael Ivan Rockenbach* pelo aprendizado e conselhos durante exame de qualificação e a defesa da dissertação de mestrado. À querida *Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra* pela colaboração no desenvolvimento das formulações.

Aos queridos mentores, *Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato*, *Prof. Dr. Paulo Chanel Deodato de Freitas*, *Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer* e *Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo*, pelo exemplo de pessoas e profissionais, carinho e ensinamentos.

À querida amiga e colega **Flavia**, pela paciência, conselhos e o imenso apoio na execução e compreensão dos resultados experimentais. Aos parceiros de laboratório **Leandro** e **Alberto**, por toda a ajuda e ensinamentos.

Aos colegas acadêmicos **Kasia, Rodrigo, Eduardo, André, Michelle, Camila, Thamires, Mirela, Máira e Iván**, pelo convívio, auxílio, carinho e crescimento intelectual, em especial ao meu amigo Rodrigo pela ajuda nas ilustrações químicas e os nossos bate-papos.

Aos queridos amigos e técnicos dos laboratórios de farmacognosia, cosmetologia, análises clínicas e toxicologia, **Roberto de Jesus Honório, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto** e **Edgar Muniz Machado Junior** e **Cristina Moreno**, pela amizade e ajuda nos experimentos.

Ao Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências, em especial à **Profa. Dra. Déborah Yara Alves Cursino dos Santos** e à técnica de laboratório **Mourisa Maria de Sousa Ferreira**, pela ajuda e cuidado com o material vegetal. Ao Laboratório de Extração da Universidade Paulista, **Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini** e ao técnico de laboratório **Sergio Alexandre Frana** pela cooperação.

Aos funcionários **David Olimpio de Lima Filho, Alexandre Spitalere, Doralice Rita de Jesus Santos, Jorge Alves de Lima, Irineu Ruel de Oliveira** e, pelo apoio afetivo e Técnico-Administrativo.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, pela parceria nos ensaios clínicos, em especial à Gerente de Pesquisa Clínica **Fernanda Daud Sarruf**, pelos ensinamentos e ajuda nas correções do manuscrito.

À querida **Dra. Daniela Dal Molim Ghisleni** por todo apoio e ajuda.

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

A todos meu muito obrigada por me ajudarem a concluir mais essa etapa da minha vida!

“Eu sou uma das que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é também uma criança colocada ante fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie

RESUMO

HÜBNER, A. A. **Caracterização fitoquímica e eficácia fotoprotetora clínica de formulações cosméticas contendo extrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon**. 2017. 161f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Com o avanço no desenvolvimento industrial sustentável estão sendo exploradas novas aplicações de uso dos subprodutos agroindustriais. O bagaço de uva obtido a partir da vinificação ou produção de sucos mantém importantes quantidades de polifenóis em suas cascas, sementes e engaço após o processamento, úteis para proteção da pele contra os raios ultravioleta. Neste contexto, o objetivo do nosso estudo foi caracterizar quimicamente o extrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon e avaliar a sua segurança e eficácia clínica em fotoprotetor tópico. Nesta dissertação, o extrato hidroetanólico (70% v/v) do bagaço de uva total, incluindo cascas, sementes e engaços de *Vitis vinifera* L., foi obtido por percolação seguido de liofilização. Os ensaios divididos em duas etapas: **i) In vitro**: determinação dos fenólicos totais (FT) usando Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE); flavonoides por meio da reação com tricloreto de alumínio e expresso em quercetina; atividade antioxidante do extrato e das formulações através da desativação de radicais livres de DPPH[•] expressa em equivalentes de Trolox (TE); identificação dos principais compostos fenólicos do extrato bruto por espectrometria de massa (HPLC/ESI-MS/MS); desenvolvimento de nove formulações usando o delineamento experimental; medição dos valores de transmitância das formulações referentes ao fator de proteção solar (FPS), fotoestabilidade e fator de proteção UVA (FP-UVA) através do equipamento Labsphere UV-2000S[®] e **ii) Em seres humanos**, apenas duas formulações foram avaliadas clinicamente, **C** sem extrato e com filtros UVA e UVB: butilmetoxidibenzoilmetano, etil-hexilmetoxicinamato e etil-hexildimetil PABA (11,5% p/p) e **D** com extrato (bagaço de uva 10% p/p) e filtros UV. Inicialmente, a segurança dermatológica, irritabilidade e sensibilização; fototoxicidade e fotossensibilização foram avaliadas pelo Teste de Contato Repetitivo em Humanos (HRIPT). Posteriormente, a eficácia fotoprotetora clínica foi testada na pele de dez voluntários. O teor de FT encontrado no extrato de bagaço de uva foi de $141,11 \pm 3,38$ mg GAE.g⁻¹ e de flavonoides $3,01 \pm 0,14$ mg QE.g⁻¹. A eficácia antioxidante das soluções metanólicas com extrato e fotoprotetor na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em peso seco em pH 5 e 7 foram aproximadamente: 707 µmol TE.g⁻¹ e 520 µmol TE.g⁻¹, respectivamente. Isto significa uma queda em torno de 26,45% da capacidade antioxidante do extrato quando incorporado à formulação. Foram identificadas por espectrometria de massa dezenove substâncias fenólicas, entre elas dímeros e trímeros de procianidinas, di-hidroflavonol, flavonóis e antocianidinas. Os resultados demonstraram efeito sinérgico entre os filtros UV e extrato vegetal no FPS e efeito antagônico com a variação do tempo de irradiação sobre as respostas do FPS, atividade antioxidante, comprimento de onda crítico, proteção UVA, proteção UVB e razão UVA/UVB. A melhor combinação eficiência-resposta foi detectada na formulação D com um aumento do FPS *in vitro* em cerca de 210%. Os testes de segurança não induziram qualquer reação adversa. A eficácia fotoprotetora clínica de D foi 21% (10,20 - 12,30) superior em relação à formulação C, demonstrando maior eficiência na proteção UVA. Sendo assim, C e D foram consideradas seguras para uso tópico e D estatisticamente superior tanto na proteção UVA quanto UVB comparado à amostra só associada de filtros. Logo, o bagaço de uva é um promissor ingrediente sustentável multifuncional útil para o uso em protetor solar.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., FPS, Fator de proteção UVA, Teste de Contato Repetitivo em Humanos, Fotoestabilidade.

ABSTRACT

HÜBNER, A. A. **Phytochemical identification and clinical photoprotective efficacy of cosmetic formulations containing Cabernet Sauvignon grape pomace extract.** 2017. 161f. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

With the advance in sustainable industrial development, new applications of agro-industrial by-products are being explored. Grape pomace obtained from winemaking or juice production keeps important amounts of polyphenols in their skins, seeds and stalks after processing that are useful for protection of skin against ultraviolet rays. In this context, the objective of our study was to chemically characterize Cabernet Sauvignon pomace extract and to evaluate its safety and clinical efficacy in topical photoprotector. The hydroethanolic extract (70% v/v) of the *Vitis vinifera* L. whole grape pomace, including seeds, skins and stalks, was obtained by percolation after lyophilization. The tests were divided into two stages: **i) *In vitro***: total phenols (TF) using Folin-Ciocalteu and expressed in Gallic Acid Equivalent (GAE); flavonoids by reaction with aluminum trichloride and expressed as quercetin; antioxidant activity of the extract and formulations by inhibition by DPPH[•] expressed as Trolox equivalents (TE); identification of the main phenolic compounds of the crude extract by mass spectrometry (HPLC/ESI-MS/MS); development of nine formulations using experimental design and evaluated the SPF, photostability and UVA protection factor (UVA-PF) through the Labsphere UV-2000S[®] equipment; **ii) *In humans***, only two formulations were clinically evaluated, **C** without extract and with UVA and UVB filters: butylmetoxidibenzoilmetano, etil-hexilmetoxicinamato and etil-hexildimetil PABA (11.5% w/w) and **D** with extract (10% w/w grape pomace) and filters UV. Initially, the dermatological safety, irritability and sensitization; phototoxicity and photosensitization were evaluated by the Human Repeat Insult Patch Test (HRIPT). After, the clinical photoprotective efficacy was tested on the skin of ten volunteers. The FT content found in the dried extract was 141.11 ± 3.38 mg GAE.g⁻¹ and flavonoids 3.01 ± 0.14 mg QE.g⁻¹. The antioxidant potential of the methanolic solutions with extracts and photoprotectors at the concentration of 1 mg.ml⁻¹ in dry weight and at pH 5 and 7 were around: 707 μ mol TE.g⁻¹ and 520 μ mol TE.g⁻¹, respectively. This means a drop of about 26.45% of the antioxidant capacity of the extract when incorporated into the formulation. Mass spectrometry identified nineteen phenolic substances, among them procyanidins dimers and trimmers, di-hydroflavonol, flavonols and anthocyanin. The results showed a synergistic effect between the UV filters and the herbal extract in the SPF and the antagonistic effect with the variance of the irradiation time in the SPF responses, antioxidant activity, critical wavelength, UVA protection, UVB protection and UVA/UVB ratio. The best efficiency-response combination was detected in the D formulation with an *in vitro* SPF increase of about 210%. Safety tests did not induce any adverse reaction. The clinical efficiency of D photoprotection was 21% (10.20 - 12.30) higher than the C formulation, demonstrating high efficiency in UVA protection. Thus, C and D were considered safe for topical use and D statistically superior in both UVA and UVB protection to the only combined sample of filters. Therefore, grape pomace is a promising multifunctional sustainable ingredient qualified to be used in sunscreen industry.

Keywords: *Vitis vinifera* L., SPF, UVA protection factor, Human Repeat Insult Patch Test, Photostability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A. Bago ou fruto com semente; B. Cacho com bagos; C. Engaço da variedade de uva; C. Sauvignon <i>Vitis vinifera</i> L	23
Figura 2 -	Efeito de ressonância da molécula de fenol	23
Figura 3 -	Processo de vinificação em tinto	29
Figura 4 -	Sítios de ligação e substituintes de maior (em vermelho) e menor (em azul) potencial antioxidante na quercetina	32
Figura 5 -	Droga vegetal (A) usada para o preparo do extrato seco total do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (B)	39
Figura 6 -	Reação de complexação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente Folin-Ciocalteu	40
Figura 7 -	Reação de complexação do íon alumínio (Al^{3+}) com os oxigênios vicinais da molécula de quercetina	41
Figura 8 -	Reação de redução do radical DPPH• por uma molécula antioxidante DPPH-H e a consequente diminuição nos valores de absorbância	42
Figura 9 -	Representação esquemática do Delineamento Experimental	54
Figura 10 -	Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato seco de C. Sauvignon (<i>V. Vinifera</i> L.)	63
Figura 11 -	Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato seco de C. Sauvignon (<i>V. vinifera</i> L.)	65
Figura 12 -	Atividade antioxidante do bagaço da C. Sauvignon na concentração de 1 mg.mL ⁻¹ de extrato seco em dois valores de pH	67
Figura 13 -	Cromatograma do pico base (BPC) em modo positivo do extrato seco de <i>Vitis vinifera</i> L. com procianidinas (dímero e trímero) e flavonoides identificados	68
Figura 14 -	Atividade antioxidante de formulações contendo extrato de bagaço de C. Sauvignon em dois valores de pH diferentes	75
Figura 15 -	Fator de proteção solar <i>in vitro</i> das formulações (F1 - F6) contendo extrato de bagaço de C. Sauvignon em dois valores de pH diferentes	77
Figura 16 -	Valores de FPS <i>in vitro</i> das formulações contendo bagaço de uva após 1 e 2 horas de irradiação	79
Figura 17 -	Caracterização física e físico-química das formulações (A - H) após 24 horas de preparo	80
Figura 18 -	Formulações (A - H) com e sem bagaço de uva avaliadas após os testes de centrifugação (30 minutos) e estresse térmico (40 a 80 °C)	82

Figura 19 -	Superfície de resposta 3D da atividade antioxidante - DPPH (Y2) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1) e concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2)	84
Figura 20 -	Superfície de resposta 3D do fator de proteção solar (Y1) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)	87
Figura 21 -	Superfície de resposta do comprimento de onda crítico - nm (Y3) como função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)	88
Figura 22 -	Superfície de resposta 3D da proteção UVA (Y4) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)	89
Figura 23 -	Superfície de resposta 3D da proteção UVB (Y5) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)	90
Figura 24 -	Superfície de resposta 3D da razão UVA/UVB (Y6) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)	91
Figura 25 -	Avaliação da eficácia fotoprotetora das formulações C (sem bagaço de uva) e D (com bagaço de uva - 10% p/p)	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos compostos fenólicos da uva <i>Vitis vinifera</i> L	24
Tabela 2 -	Estruturas químicas das principais moléculas fenólicas encontradas na <i>V. vinifera</i> L	25
Tabela 3 -	Algumas atividades biológicas investigadas na espécie <i>Vitis vinifera</i> L	27
Tabela 4 -	Filtros solares utilizados nas formulações e algumas de suas propriedades	34
Tabela 5 -	Triagem fitoquímica para cada grupo de metabólito secundário	39
Tabela 6 -	Composição das formulações (F1 - F6) em dois valores de pH diferentes	47
Tabela 7 -	Composição de ingredientes ativos das formulações (A - H)	52
Tabela 8 -	Rendimento do extrato seco do bagaço de uva Cabernet Sauvignon	61
Tabela 9 -	Triagem fitoquímica do bagaço da uva <i>V. vinifera</i> L	62
Tabela 10 -	Teor de fenólicos totais no bagaço de uva Cabernet Sauvignon	63
Tabela 11 -	Teor de flavonoides no bagaço de uva Cabernet Sauvignon	65
Tabela 12 -	Avaliação microbiológica do extrato seco do bagaço de uva	66
Tabela 13 -	Dados do espectro de massa em modo positivo para compostos fenólicos identificados na <i>Vitis vinifera</i> L	71
Tabela 14 -	Características organolépticas (aspectos, cor e odor) e físico-químicas das formulações (F1 - F6) após 24 horas de preparo	73
Tabela 15 -	Valores do FPS <i>in vitro</i> e do comprimento de onda das formulações (F1 - F6) em dois valores diferentes de pH e tempos de irradiação	78
Tabela 16 -	Método Diffey de valores UVA/UVB	80
Tabela 17 -	Resultados de caracterização física e físico-química das formulações (A - H) após 24 horas de preparo	81
Tabela 18 -	Análise da estabilidade preliminar das formulações (A - H), com e sem bagaço de uva, por meio das características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valor de pH	82
Tabela 19 -	Avaliação microbiológica das formulações fotoprotetoras (C e D) utilizadas nos ensaios clínicos	83
Tabela 20 -	Atividade antioxidante das formulações (A - H) em % de inibição e em Trolox	86
Tabela 21 -	ANOVA para a regressão da superfície de resposta do fator de proteção solar (Y1), atividade antioxidante - DPPH (Y2), comprimento de onda crítico (Y3), proteção UVA (Y4), proteção UVB (Y5) e relação UVA/UVB (Y6) C da concentração de filtros solares (X1), concentração de extrato (X2) e tempo de irradiação (X3)	93

Tabela 22 -	Equação de regressão e coeficientes de determinação para a regressão da superfície de resposta do fator de proteção solar (Y1), atividade antioxidante (Y2), comprimento de onda crítico (Y3), proteção UVA (Y4), proteção UVB (Y5) e relação UVA/UVB (Y6) como funções da concentração de filtros solares (X1), concentração de extrato (X2) e tempo de irradiação (X3)	94
Tabela 23 -	Avaliação da proteção UVA das formulações C (sem extrato do bagaço de uva) e D (com extrato do bagaço de uva - 10% p/p)	95

LISTA DE SIGLAS

AAO	Atividade antioxidante
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
BFF	Fissão de benzofurano
BHT	Butil hidroxi tolueno
BMDM	Butilmetoxidibenzoilmetano
BU	Bagaço de uva
COX	Ciclooxigenase
DEM	Dose eritematosa mínima
DEM np	Dose eritematosa mínima em pele não protegida
DEM p	Dose eritematosa mínima em pele protegida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DoE	Delineamento experimental
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHDP	Etil-hexildimetil PABA
EHEL	Extrato hidroetanólico liofilizado
EHMC	Etil-hexilmetoxicinamato
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas com ionização por Eletrospray
FAO	Organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura
FDA	Food and drug administration
FPS	Fator de proteção solar
FT	Fenólicos totais
GAE	Equivalentes em ácido gálico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HRF	Fissão do anel heterocíclico
HRIPT	Teste de contato repetitivo em humanos
INCI	Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

MS	Espectro de massas
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PMMA	Polimetilmetacrilato
QE	Equivalentes em quercetina
QM	Clivagem de quinona metínica
RDA	Mecanismos retro-Diels-Alder
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RSM	Metodologia de superfície de resposta
SEBRAE	Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas
TE	Equivalentes em Trolox
BPC	Cromatograma do pico base
TP	Totais de fenólicos
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Espectroscopia no ultravioleta e/ou visível
FP-UVA	Fator de proteção UVA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Aspectos botânicos.....	22
2.2	Compostos fenólicos	23
2.3	Vinificação.....	28
2.4	Radiação solar	30
2.5	Atividade antioxidante no equilíbrio do estresse oxidativo	30
2.6	Fotoproteção	32
2.6.1	Filtros solares	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Material vegetal	38
4.1.1	Preparo do extrato seco do bagaço de uva.....	38
4.1.2	Análise fitoquímica	39
4.1.3	Determinação dos fenólicos totais.....	40
4.1.4	Determinação de flavonoides	41
4.1.5	Avaliação microbiológica.....	42
4.1.6	Atividade antioxidante do extrato seco	42
4.1.7	HPLC e ESI-MS/MS	44
4.2	Formulações	44
4.2.1	Formulações (F1 - F6).....	45
4.2.1.1	<i>Caracterização física e físico-química.....</i>	<i>48</i>
4.2.1.2	<i>Atividade antioxidante das formulações (F1 - F6).....</i>	<i>48</i>
4.2.1.3	<i>Fator de proteção solar e fotoestabilidade</i>	<i>48</i>
4.2.2	Formulações (A - H)	50
4.2.2.1	<i>Caracterização física e físico-química.....</i>	<i>53</i>
4.2.2.2	<i>Estudo de estabilidade preliminar</i>	<i>53</i>
4.2.2.3	<i>Avaliação microbiológica</i>	<i>53</i>
4.2.2.4	<i>Delineamento Experimental (DoE).....</i>	<i>54</i>
4.2.2.4.1	<i>Atividade antioxidante das formulações (A - H).....</i>	<i>55</i>
4.2.2.4.2	<i>Fator de proteção solar (FPS <i>in vitro</i>) e fotoestabilidade</i>	<i>55</i>
4.2.2.4.3	<i>Fator de Proteção UVA (FP-UVA).....</i>	<i>56</i>

4.3	Ensaio clínico	56
4.3.1	Sujeitos	56
4.3.2	Teste de irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização	57
4.3.3	Teste de fototoxicidade e fotossensibilização	58
4.3.4	Avaliação da Eficácia fotoprotetora	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	Rendimento do extrato seco do bagaço de uva	61
5.1.1	Análise fitoquímica	61
5.1.2	Fenólicos totais.....	62
5.1.3	Determinação de flavonoides	64
5.1.4	Avaliação microbiológica.....	66
5.1.5	Atividade antioxidante do extrato do bagaço de uva.....	66
5.1.6	HPLC e ESI - MS/MS	68
5.2	Formulações (F1 - F2)	72
5.2.1	Caracterização física e físico-química.....	72
5.2.2	Atividade antioxidante das formulações (F1 – F6)	75
5.2.3	Fator de proteção solar (FPS <i>in vitro</i>) e fotoestabilidade	76
5.3	Formulações (A - H).....	80
5.3.1	Caracterização física e físico-química.....	80
5.3.2	Estudo de estabilidade preliminar	81
5.3.3	Avaliação microbiológica.....	83
5.3.4	Delineamento Experimental (DoE)	84
5.3.4.1	<i>Atividade antioxidante das formulações (A - H).....</i>	<i>84</i>
5.3.4.2	<i>Fator de proteção solar (FPS in vitro) e Fotoestabilidade.....</i>	<i>86</i>
5.3.4.3	<i>Comprimento de onda crítico.....</i>	<i>88</i>
5.3.4.4	<i>Proteção UVA</i>	<i>89</i>
5.3.4.5	<i>Proteção UVB</i>	<i>90</i>
5.3.4.6	<i>Razão UVA/UVB</i>	<i>91</i>
5.3.5	Fator de Proteção UVA (FP -UVA)	94
5.4	Ensaio Clínico	95
5.4.1	Teste de irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização	95
5.4.2	Teste de fototoxicidade e fotossensibilização	96
5.4.3	Avaliação da eficácia fotoprotetora.....	97
6	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE	122
	ANEXOS	137

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A vinificação no Brasil foi introduzida no século 19 com a chegada de imigrantes italianos na Serra Gaúcha, sul do país, que tinham o hábito de cultivar uvas e produzir vinho para consumo próprio em sua terra natal. Esses costumes acabaram influenciando a cultura e o paladar dos brasileiros (CAVALCANTE, 2016). *Vitis vinifera* L. é uma das espécies mais cultivadas e agroeconomicamente interessantes para a produção de alimentos, produtos de beleza, vinificação e outras bebidas, devido as suas características químicas e de adaptabilidade (CAMARGO, 2010; GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014). Esta fruta milenar é rica em compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides e estilbenos que desempenham diversos efeitos biológicos tais como: anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, antimutagênico, antialergênico, anticarcinogênico, cardioprotetor, estimulante do crescimento do cabelo, antitrombótico, cicatrizante de feridas, fotoprotetor e antienvelhecimento com a estabilização da elastina e do colágeno (ATAK; ALTINDISLI; GOKSEL, 2011; BAXTER, 2008; DRAELOS, 2009; TEDESCHI et al., 2013; TEXEIRA et al., 2014). A atividade antioxidante dos extratos de uva é atribuída aos polifenóis (RENAUD; LORGERIL, 1992).

Geralmente, os polifenóis se apresentam na natureza como pigmentos coloridos em flores, vegetais e frutas, protegendo-as contra os efeitos deletérios do sol, mas quando incorporados a uma formulação tópica, como composto bioativo funcional, podem desempenhar vários papéis, entre eles, de filtros naturais de um amplo espectro de ondas ultravioleta (UVA, UVB e UVC) e/ou antioxidantes, capazes de sequestrar radicais livres fotoinduzidos (BABY et al., 2008; STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014). Além disso, é comprovado que o uso de proantocianidinas, resveratrol e silimarina reduz os efeitos induzidos pela radiação UV, melhorando as respostas inflamatórias, oxidativas e gênicas (NICHOLS; KATIYAR, 2010).

A melhor forma de prevenir o foto-envelhecimento, eritema, queimaduras e câncer de pele é usar regularmente e adequadamente protetores solares, mas só isso não é suficiente, pois interações fotoquímicas da radiação UV com filtros solares e moléculas fotossensíveis na pele podem gerar novos produtos reativos. Então, uma estratégia usada pelas indústrias cosméticas é acrescentar aos fotoprotetores antioxidantes naturais (DEUSCHLE et al., 2015), a fim de melhorar a eficácia fotoprotetora e/ou a estabilização de compostos fotoinstáveis. Evidências científicas mostram benefícios da aplicação tópica e o uso oral de certos polifenóis

contra a radiação UV (RADICE et al., 2016), como os presentes em *Theobroma cacao* L. (WILLIAMS; TAMBURIC; LALLY, 2009), *Vitis vinifera* L. (FIUME et al., 2014), *Camellia sinensis* L. (KOMES et al., 2010), *Silybum marianum* (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013), *Bauhinia microstachya* var. *Massambabensis* Vaz (MANSUR et al., 2016).

Os incentivos mundiais ao desenvolvimento industrial sustentável proporcionam oportunidade a um novo nicho de mercado na área de cosmetologia que é a reutilização de subprodutos agrícolas. Como o bagaço de uva preserva quantidades importantes de flavan-3-ol, antocianina (KY; TEISSEDRE, 2015) e resveratrol (BAXTER, 2008), torna-se uma fonte de antioxidante natural de custo relativamente baixo e de grande disponibilidade, podendo ser empregado como ingrediente multifuncional (TEXEIRA et al., 2014). Além de agregar valor aos resíduos vinícolas, reduz o impacto ambiental e colabora com a cadeia produtiva de insumos farmacêuticos renováveis de menor potencial alergênico e irritativo à pele de seres humanos. De acordo com a literatura, a variedade tinta Cabernet Sauvignon é uma das mais comuns à produção de vinhos finos (FAO, 2009) e com elevado teor de fenóis, comparado às castas branca e rosa, sendo esse o motivo da sua escolha para a presente pesquisa.

Neste trabalho, o grupo de pesquisa buscou investigar a segurança e a eficácia fotoprotetora clínica de protetor solar contendo extrato de bagaço de uva e uma mistura de três filtros orgânicos: etil-hexildimetil PABA, etil-hexilmetoxicinamato e butilmetoxidibenzoilmetano. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para o desenvolvimento das preparações cosméticas e otimização das variáveis. O fator de proteção solar *in vitro* (FPS), o fator de proteção UVA (FP-UVA) e a fotoestabilidade foram medidos por espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos botânicos

Vitis vinifera L. é a espécie de uva conhecida cientificamente como videira, parreira ou vinha, com sinonímia *Vitis sativa* L., pertence à ordem Vitales, família Vitaceae e gênero *Vitis*. O gênero *Vitis* abrange mais de 60 espécies de uvas, entre silvestres e viníferas (TERRAL et al., 2010; TROPICOS, 2016). Originária da Ásia menor, mas acabou se distribuindo pela América do Norte, Europa, Mediterrâneo e outras regiões (SEGURA; MARÍN; DELGADO, 2003). No Brasil, existem cerca de 70 variedades de uvas viníferas para processamento (CAMARGO, 2010).

Trepadeira com gavinhas, tronco lenhoso contorcido chamado de cepa, que se divide em ramos, podendo chegar até 30m de comprimento (PEREIRA; FERRO, 2008; SEGURA; MARÍN; DELGADO, 2003; TERRA; PIRES; NOGUEIRA, 1998). “As folhas são alternas pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados, glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior; as flores são pequenas e de cor branco esverdeada, dispostas em racimos. Os frutos são bagas reunidas em cachos, contendo cada uma 0-3 sementes, variando de cor de acordo com o tipo de uva” (SILVA, 2010).

Mitic et al. (2012), avaliando quatro variedades de uvas de mesa e três uvas para vinho, verificaram uma superioridade no teor de fenólicos totais, flavonoides e antocianinas na uva Cabernet Sauvignon (*V. vinifera* L.), bem como a capacidade antioxidante foi significativamente maior. Iacopini et al. (2008), estudando 10 clones de uvas de vinificação constaram alto teor de resveratrol e fenólicos do extrato da C. Sauvignon comparado às demais uvas.

Cabernet Sauvignon (**Figura 1**) é a variedade de uva mais importante para produção de vinhos tintos, sendo seu principal componente o resveratrol, antioxidante natural encontrado em elevada concentração, e responsável por inúmeros benefícios à saúde, inclusive na prevenção do fotoenvelhecimento (BAVARESCO et al., 2007; BAXTER, 2008).

Figura 1 - A. Bago ou fruto com semente; B. Cacho com bagos; C. Engaço da variedade de uva; C. Sauvignon *Vitis vinifera* L.

Fonte: Hübner, 2014.

2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem apresentar um ou mais grupos hidroxílicos e anel aromático, estar na forma livre ou glicosilada. Estão relacionados com a propriedade antioxidante de uma ampla variedade de plantas. O efeito de ressonância dos elétrons, como ilustra a **Figura 2** mostra como as duplas ligações conjugadas conferem aos substituintes da molécula de fenol maior capacidade em estabilizar os radicais livres e reforçar na absorção da radiação UVA (HAJJ et al., 2012; STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014).

Figura 2 - Efeito de ressonância da molécula de fenol

Fonte: Hajj et al., 2012.

Nas **Tabelas 1 e 2** estão demonstradas uma variedade de compostos fenólicos na uva *V. vinifera* L. Conforme a parte da uva, estes podem ser classificados em duas classes: flavonoídicos: taninos condensados e flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavanóis) e não-flavonoídicos: ácidos fenólicos e estilbenos.

Tabela 1 - Distribuição dos compostos fenólicos da uva *Vitis vinifera* L.

Fonte	Polifenóis
Polpa	≤ 10% de fenólicos totais e 78% do peso da uva. <i>Ácidos fenólicos</i> (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos).
Semente	60-70% de fenólicos totais e 4% do peso da uva. Alta concentração de <i>Taninos condensados</i> (procianidinas e proantocianidinas); <i>Ácidos fenólicos</i> (ácido gálico, ácido p-cumárico); <i>Flavonoides</i> : flavonas (canferol-3-O-glicosídeo; quercetina-3-O-glicosídeo; quercetina, miricetina) e catequinas (catequina, epicatequina; epicatequina-3-O-galato).
Casca	28-35% de fenólicos totais e 15% do peso da uva. <i>Taninos condensados</i> : (procianidinas); <i>Ácidos fenólicos</i> (ácido elágico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido siríngico); <i>Flavonoides</i> : flavonas (quercetina, quercitrina, canferol, miricetina-3-monoglicosídeo, quercetina-glicuronosídeo, astilbina, engeletina e mircetina); catequinas (catequina; epicatequina, galocatequina e epicatequina-galato); antocianinas (glicosídeos de delfinidina, petunidina, malvidina, cianidina, peonidina-3-monoglicosídeo; 3-acetilglicosídeo; 3-cumarilglicosídeo; 3,5-diglicosídeo; 3-acetil-5-diglicosídeo; 3-cumaroil-5-diglicosídeo; e 3-cafeoil-5-diglicosídeo de cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina) e <i>Estilbenos</i> (trans-resveratrol). Tecido vegetal onde se encontra maior quantidade de agentes antimutagênicos.

Fonte: adaptado de Draelos, 2009; Dwyer; Hosseinian; Rod, 2014; Fiume et al., 2012; Godevac et al., 2010; Hajj et al., 2012; Hornsey, 2007; Monrad et al., 2010.

Tabela 2 - Estruturas químicas das principais moléculas fenólicas encontradas na *V. vinifera* L.

Classe	Subclasse	Estrutura química			
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos
			R1	R2	
		Ácido p-hidroxibenzoico	H	H	
		Ácido protocatecuico	OH	H	
		Ácido vanílico	OCH3	H	
		Ácido siringico	OCH3	OCH3	
	Ácidos hidroxicinâmicos
			R1	R2	
		Ácido p-cumárico	H	H	
		Ácido cafeico	OH	H	
	Ácido ferúlico	OCH3	H		
Flavonoides	Flavanóis (Flavan-3-ols)
			R1	R2	R3
		Procianidinas			
		(+) - Catequina	OH	H	H
		(-) - Epicatequina	H	OH	H
		Prodelphinidinas			
		(+) - Galocatequina	OH	H	OH
		(-) - Epigalocatequina	H	OH	OH
	Flavonóis
				R1	R2
		Canferol		H	H
		Quercetina		OH	H
		Miricetina		OH	OH
	Antocianinas
				R1	R2
	Cianidina-3-glicosídeo		OH	H	
	Delfinidina-3-glicosídeo		OH	OH	
	Peonidina-3-glicosídeo		OCH3	H	
	Petunidina-3-glicosídeo		OH	OCH3	
	Malvidina-3-glicosídeo		OCH3	OCH3	

Continua

Conclusão

Estilbenos	Trans-resveratrol
Taninos	Condensados (proantocianidinas)
			R1
		Procianidina	H
		Prodelfinidina	OH

Fonte: adaptado de Angelo; Jorge, 2007; Costa et al., 2008; Fiume et al., 2012; Rim, 2013.

Em 1992, Renaud e Lorgeril correlacionaram a redução de doenças cardiovasculares e circulatórias ao consumo diário e sistemático de vinho tinto dos franceses, fenômeno conceituado como “Paradoxo Francês”. Mais tarde, foi verificado que além do álcool contido no vinho, o resveratrol, presente em uvas e vinhos tintos, seria o responsável pela ação cardioprotetora, devido às suas atividades antioxidante e anticoagulante (BONTEMPO, 2012; JEANDET et al., 1995). Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram diminuição de patologias cardiovasculares em grupos onde é elevada a ingestão de fenólicos (TEXEIRA et al., 2014).

O resveratrol é um antioxidante natural encontrado em elevada concentração em derivados deste fruto, atuando no sistema cardiovascular, na redução das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), na inibição da ciclooxygenase (COX), como anticancerígeno, antimicrobiano, na ativação da sirtuína, substância provavelmente envolvida na restrição calórica da longevidade e na prevenção do fotoenvelhecimento (BAXTER, 2008). O uso tópico de resveratrol em ratos sem pêlos, antes da exposição à radiação UVB, resultou em inibição significativa dos efeitos inflamatórios (NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Teixeira et al., (2014), atribuíram atividades biológicas encontradas em uvas e bagaços aos taninos e flavonoides. A atividade antioxidante na casca do fruto se deve em 90% às antocianinas e proantocianidinas e 10% aos flavonóis, flavan-3-óis e ácidos fenólicos. Já estudos *in vivo* e *in vitro* com sementes de uva atribuem a ação antioxidante aos flavonoides (YILMAZ; TOLEDO, 2004). A **Tabela 3** apresenta alguns estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* relatados pela espécie de uva vinífera.

Tabela 3 - Algumas atividades biológicas investigadas na espécie *Vitis vinifera* L.

Ensaio	Material vegetal	Atividades biológicas	Referência
<i>In vitro</i>	Broto	Atividade antioxidante mais significativo do que as vitaminas C e E.	CRONIN; DRAELOS, 2010; KATIYAR, 2008
	Bagaço	Teste de irritação dérmica em epiderme humana artificial (<i>Episkin</i>) não causou irritação.	SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015
	Bagaço	Atividade antioxidante e pró-oxidante sobre crescimento micelial do fungo <i>Botrytis cinerea</i> .	COTORAS et al., 2014
	Bagaço	Atividade antioxidante dependente da linhagem celular muscular (C2C12) e endotelial (EA.hy926).	GOUTZOURELAS et al., 2014
	Bagaço	Atividade antioxidante das sementes de Carignan e Syrah foi superior as cascas de Carignan e Alicante.	KY; TEISSEDRE, 2015
	Casca	Fotomutagenicidade, teste de Ames, não houve significativo aumento de mutações após 30 minutos de irradiação com 1,25 J/cm ² UVA (280-320nm).	UNITED STATES, 2012
	Fruto	Teste de irritação dérmica com extrato aquoso (3% e 10%), não constatou reação irritante em pele humana.	UNITED STATES, 2012
	Semente	Prevenção da imunossupressão fotoinduzida pela radiação UVB.	KATIYAR, 2015; MUDIT et al., 2013
<i>Ex vivo</i>	Casca	Atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em tecido hepático de cabra.	SINGHA; DAS, 2015
<i>In vivo</i>	Bagaço	Atividade antioxidante da suplementação com bagaço foi igualmente eficaz à da vitamina E.	BRENES et al., 2008
	Semente	Atividade fotoprotetora tópica de grupos pré-tratados com extrato tiveram significativa proteção celular contra apoptose após exposição UVB.	FILIP et al., 2011
		Atividade fotoprotetora tópica reduziu efeitos da queimadura sobre a pele após radiação UVB.	MUDIT et al., 2013
		Teste de toxicidade cutânea aguda do extrato não causou morte, mas foi observada ligeira descamação nos animais.	FIUME et al. , 2014

2.3 Vinificação

No Brasil, a safra de uva de 2015 atingiu 1.499.353 toneladas de uvas, dessas, 781.412 toneladas destinadas à elaboração de vinhos, sucos e derivados, conforme dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2014). Apesar do crescente consumo de vinho pelos brasileiros, o volume anual é muito baixo, 2,2 litros por pessoa por ano comparado com a França que é de 45,7 litros por pessoa por ano (SEBRAE, 2014).

Após a fermentação, cada 1 kg de uva processada gera cerca de 700 mL de vinho (FAO, 2009) e cerca de 20% de resíduos orgânicos. Estima-se que o principal subproduto do processamento da fruta, o bagaço de uva, corresponda a 16% (EMBRAPA, 2014); sendo constituído em média por 58% de cascas, 20% de engaços, 22% de sementes e 55 a 72% de água em base úmida (DWYER; HOSSEINIAN; ROD, 2014).

A incompleta extração de compostos bioativos durante a vinificação retém no bagaço de uva aproximadamente, 70% dos polifenóis iniciais como flavan-3-ol, antocianina (KY; TEISSEDRE, 2015) e resveratrol (BAXTER, 2008); destes, 20-30% nas cascas e 60-70% nas sementes (MONRAD et al., 2010; DWYER; HOSSEINIAN; ROD, 2014).

O processamento do vinho tinto é subdividido em nove etapas, como ilustra simplificadaamente a **Figura 3**.

1. Colheita das uvas;
2. Recepção e Classificação, seleção das uvas quanto à variedade, integridade, grau de maturação e teor de açúcar;
3. Desengace, remoção da ráquis e o Esmagamento da uva, formação do mosto;
4. Chaptalização, correção do açúcar no mosto;
5. Maceração e Fermentação alcoólica do mosto, transformação de açúcares fermentescíveis em álcool sob a ação de leveduras selecionadas secas e ativas e a extração alcoólica dos pigmentos escuros das cascas; Remontagem, transferência do líquido da parte inferior para a superior do tonel. Essa etapa tem duração de 2 a 5 dias;
6. Descuba, separação do mosto (parte líquida) da fermentação do bagaço (resíduo sólido); Prensagem e Trasega 1, separação do vinho de seus sedimentos, movendo-o de um recipiente para outro;
7. Fermentação malolática, transformação do ácido málico (mais tânico, adstringente) em ácido láctico (menos intenso, agradável), os ácidos no vinho são importantes para a conservação do produto, o processo tem duração de 20 a 40 dias e trasega 2;

8. Clarificação e Filtração: precipitação e remoção de compostos instáveis em suspensão, conferindo limpidez ao vinho e Estabilização da cor e aroma com anidrido sulfuroso;
9. Envelhecimento, o vinho permanece em repouso por um período de 6 meses a 5 anos, preferencialmente em barris de carvalho;
10. Envase e Rotulagem que deve atender os requisitos de identidade e qualidade de padrões oficiais, e estar em conformidade com a legislação nacional.

Figura 3 - Processo de vinificação em tinto

Fonte: adaptado de Academia do Vinho, 2010; Lazarini; Falcão, 1999; Rizzon; Dall’Agnol, 2007.

Apesar da conscientização global dos três Rs da sustentabilidade (Reduzir, Reutilizar e Reciclar), apenas uma pequena parte do bagaço de uva é aproveitado em alimentação animal, fertilizantes e produção de biomassa, normalmente sem nenhuma gestão prévia dos subprodutos, sendo assim, um desafio, o desenvolvimento de novas estratégias de valorização desse recurso natural abundante em compostos antioxidantes úteis à área da saúde como farmacologia e cosmetologia (FALGUERA; IBARZ, 2014; FERREIRA et al., 2012; TEXEIRA et al., 2014).

O bagaço de *V. vinifera* L. possui quantidades significativas de flavonoides (flavanóis, flavonóis e antocianinas), ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e estilbenos (resveratrol) (KAMMERER et al., 2004; 2005). O bagaço e as sementes de uva apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*,

Bacillus coagulans, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Botrytis cinerea* (TEXEIRA et al., 2014).

2.4 Radiação solar

A exposição moderada da pele à luz solar proporciona benefícios físicos, favorecendo a síntese de vitamina D₃ e melanina, porém, o excesso pode causar alterações na pele como redução na espessura e elasticidade, desidratação, ressecamento, rugas e alterações vasculares (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; VELASCO et al., 2008).

Na pele, a radiação UVA (320-400nm; UVA II: 320-340nm UVA I: 340-400nm) causa degradação da matriz extracelular das fibras de colágeno e elastina na derme, favorecendo o aparecimento de linhas de expressão finas e rugas profundas e imunossupressão sistêmica. A radiação UVB (290-320nm) está envolvida em efeitos diretos do DNA e indução da expressão da metaloproteinase da matriz, causando eritema na pele exposta e alterações carcinogênicas (COSMETICS EUROPE, 2006; LUCAS et al., 2015; VELASCO et al., 2008).

A exposição excessiva e cumulativa à radiação UV acelera em aproximadamente 90% os efeitos do fotoenvelhecimento, inibindo a síntese e induzindo a fotodegradação do colágeno e a fotocarcinogênese (CHOUDHARY et al., 2010).

2.5 Atividade antioxidante no equilíbrio do estresse oxidativo

Ao longo do tempo, mudanças funcionais e morfológicas na pele são inevitáveis, como aumento na susceptibilidade de infecções virais, processos cancerígenos (BRENNER; HEARING, 2008) e a hiperpigmentação (ZHOU; FENGGB; RUAN, 2017). A eficiência dos antioxidantes endógenos diminui e as espécies reativas induzem danos em todo o corpo (GRAGNANI et al., 2014).

A pele está constantemente exposta a inúmeros *agentes exógenos*: químicos, físicos (Radiação UV) e biológicos e a *agentes endógenos*: enzimáticos e fisiológicos, que induzem à formação de espécies reativas ou pró-oxidantes como: “radicais hidroxila (HO[•]) e superóxido (O₂[•]), radicais peroxil e alcoxil (RO₂[•] e RO[•]), oxigênio singlete (¹O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), peróxidos orgânicos (ROOH) e radical de óxido nítrico (•NO)” (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; SCOTTI et al., 2007). Quando a proporção de pró-

oxidantes for superior à capacidade antioxidante de remoção ou reparação, ocorre um desequilíbrio redox e a ativação do Estresse oxidativo, levando a alterações na estrutura das proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e a processos patológicos, tais como: doenças inflamatórias, neurodegenerativas, cardiovasculares, neoplasias e envelhecimento (BESSADA, 2015).

Fatores ambientais podem acelerar o envelhecimento natural da pele e a proliferação celular, como é o caso da exposição crônica à radiação UV. A radiação UVA torna os fibroblastos menos ativos, favorecendo o aparecimento de linhas finas e rugas profundas. A radiação UVB está envolvida nos efeitos diretos de DNA e indução de expressão de metaloproteinase de matriz, causando eritema na pele exposta. (LUCAS et al., 2015).

Cromóforos localizados na pele, como melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano e outros, absorvem o feixe UVA, tornam-se moléculas reativas (instáveis) que ao retornarem ao estado fundamental, liberam energia em forma de elétron para a molécula de O₂, dando início à cascata oxidativa (LIN et al., 2005; BALOGH et al., 2011). Radicais livres fotoinduzidos pela radiação UVB podem causar efeito direto na molécula de DNA e a radiação UVA efeitos indiretos com desencadeamento de mutações e câncer (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLA, 2007; CHEN; LIU; FAHR, 2010).

A fim de retardar os danos cumulativos da radiação UV, o organismo humano apresenta defesas biológicas de proteção, antioxidantes enzimáticos (glutathione peroxidase; catalase, metionina-redutase e superóxido-dismutase) e não enzimáticos (vitaminas, minerais, cofator e polifenóis) (FRANÇA et al., 2013).

Atualmente, existe interesse em investigar compostos bioativos, especialmente com atividade antioxidante, pelo fato de serem capazes de interagir com radicais livres e impedir uma cascata de efeitos biológicos em proteínas, lipídios, DNA e RNA, incluindo: “modificações oxidativas de aminoácidos; clivagem peptídica; peroxidação lipídica e ligações cruzadas com outras macromoléculas; mutações; quebra de cadeias e rearranjos cromossômicos”. Os flavonoides e as vitaminas C e E agem desativando espécies reativas, principalmente de oxigênio (MELO et al., 2011; BESSADA, 2015).

Stevanato, Bertelle e Fabris, em 2014, estudando a atividade antioxidante de classes fenólicas, verificaram atividade antioxidante em ácidos fenólicos > estilbenos > flavonoides. No entanto, Cotoras et al. (2014) verificaram, *in vitro* e *in vivo*, tanto capacidade antioxidante como pró-oxidante nos bagaços de uva C. Sauvignon, Carménère e Syrah. O efeito anti-radicalar dos flavonoides depende dos sítios ativos de ligação e de seus substituintes (**Figura 4**).

Figura 4 - Sítios de ligação e substituintes de maior (em vermelho) e menor (em azul) potencial antioxidante na quercetina

Fonte: adaptado de Scotti et al, 2007; Minatel et al., 2017.

2.6 Fotoproteção

A prevenção e/ou minimização de fotodanos na pele humana requer prática regular de cuidados físicos e cosméticos concomitantemente. As medidas mais recomendadas pelos especialistas como forma de se proteger dos raios UV são: restringir a luz solar (tempo, horário de exposição), usar roupas, acessórios e protetores solares (BARON; KIRKLAND; DOMINGO, 2008; GONZÁLEZ; IORENTE; CALZADA, 2008; KRUTMANN et al., 2017; PALM; O'DONOGHUE, 2007). Análises microtopográficas da pele de voluntários na Austrália mostraram retardo de 24% no envelhecimento cutâneo no grupo que tinha uma rotina diária do uso de protetor solar de amplo espectro comparado aos usuários facultativos (HUGHES et al., 2013).

Segundo Flor, Davolos e Corrêa (2007) o fotoprotetor tópico é uma associação de filtros solares em um veículo (loções hidroalcoólicas ou emulsionadas, cremes e géis), podendo ter em sua composição substâncias naturais e sintéticas combinadas com habilidade de filtrar a radiação UV (BALOGH et al., 2011; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2012) e retardar danos cutâneos do fotoenvelhecimento e da fotocarcinogênese, causados pela exposição solar crônica (BALOGH et al., 2011; JAIN; JAIN, 2010). É considerado um bom agente de proteção solar o produto que consegue absorver um amplo espectro de ondas UVA e UVB, de maneira eficiente e segura, a fim de proteger, prevenir e reparar possíveis danos celulares e genéticos (REYES e VITALE, 2013). Os flavonoides e os ácidos hidroxicínâmicos encontram-se na linha de frente dos antioxidantes naturais, capazes de absorver a radiação UV (KOLB et al., 2003). Sendo assim, compostos fenólicos extraídos da *V. vinifera* L. podem ser uma estratégia interessante na otimização do fator de proteção solar (JAIN; JAIN, 2010).

2.6.1 Filtros solares

Os filtros solares ou filtros UV são substâncias capazes de proteger a pele da radiação UV (ANVISA, 2006; BALOGH et al., 2011). Os filtros inorgânicos são capazes de refletir ou dispersar as radiações (UVA e UVB): Dióxido de titânio e Óxido de zinco são os filtros físicos mais usados em protetores solares. São mais seguros, estáveis, porém, podem formar película esbranquiçada sobre a pele e favorecem o desenvolvimento de comedões. Os óxidos ficam em suspensão na formulação, por isso, o tamanho das partículas influencia na atividade fotoprotetora e no aspecto do produto. Inovações tecnológicas nesta área criaram formas micronizadas destes, melhorando sua transparência, diminuindo potencial irritativo e sensibilizante, fotodegradações e aumentando a proteção UVA (BARON; KIRKLAND; DOMINGO, 2008; FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; GONZÁLEZ; IORENTE; CALZADA, 2008; PALM; O'DONOGHUE, 2007).

Os filtros orgânicos interceptam a radiação UV, transformando-a em fótons de calor. Podem ser subdivididos em filtros UVA, UVB e amplo espectro (UVA e UVB) (BALOGH et al., 2008; FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; GONZÁLEZ; IORENTE; CALZADA, 2008): octil dimetil PABA (etil-hexildimetil PABA - UVA); metoxicinamato de octila (etil-hexilmetoxicinamato - UVB); avobenzona (butilmetoxidibenzoilmetano - UVA) e outros.

Normalmente, fotoprotetores apresentam combinados de dois ou mais filtros UV e um ou mais fotoestabilizadores, para tornar as formulações mais efetivas contra as radiações UVA e UVB por maior tempo (CRAIG, 2008). O uso de fotoestabilizadores tem por finalidade reduzir a fotoinstabilidade dos filtros solares e, assim, aumentar a segurança e eficácia dos protetores solares (BENEVENUTO et al., 2010). Alternativa também interessante é a associação de polifenóis, que conseguem absorver a radiação UV e atuar como filtros contra os raios UVB e parte do espectro UVC e UVA, quando aplicados topicamente, elevando o potencial do protetor solar (NICHOLS; KATTIYAR, 2010).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016) os filtros solares precisam ser usados corretamente e restritos a lista de 39 filtros UV. Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) tem aprovados somente 17 filtros UV. (BALOGH et al., 2011). A **Tabela 4** descreve algumas características dos filtros solares incorporados nas formulações deste trabalho.

Tabela 4 - Filtros solares utilizados nas formulações e algumas de suas propriedades

Filtro Solar	Nome INCI*	Estrutura química	Absorção UV	λ crítico**	Referência
Avobenzona	Butilmetoxidibenzoilmetano (BMDM)			400 – 320	SHAATH, 2010; SILVA et al., 2015
Octildimetil PABA	Etil-hexildimetil PABA (EHDP)			315 – 290	BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008; SILVA et al., 2015.
Metoxicinamato de octila	Etil-hexilmetoxicinamato (EHMC)			320 – 290	HERZOG; GIESINGER; SCHNYDER, 2013; BALOGH et al., 2011

* International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; ** Comprimento de onda crítico (nm)

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pretende-se no presente projeto desenvolver formulações fotoprotetoras contendo compostos ativos do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) e avaliar clinicamente a segurança e eficácia fotoprotetora.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato seco do bagaço de uva (*Vitis vinifera* L.);
- Quantificar os fenólicos totais e flavonoides no extrato;
- Caracterizar o extrato bruto por HPLC-ESI-MS/MS;
- Avaliar microbiologicamente as formulações fotoprotetoras testadas clinicamente;
- Desenvolver formulações dermocosméticas por meio de Delineamento Experimental (DoE);
- Avaliar as características organolépticas, físicas e físico-químicas das preparações;
- Determinar o fator de proteção solar *in vitro*, fotoestabilidade e fator de proteção UVA das formulações por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração;
- Testar a segurança e eficácia fotoprotetora clínica de protetores solares contendo extrato do bagaço de uva.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal foi constituído de bagaços de uva Cabernet Sauvignon (*V. vinifera* L.) formado de cascas, sementes e engaços (hastes laterais e pedicelos). Os frutos da safra de março de 2014, coletados por um viticultor da serra gaúcha, especificamente do interior da cidade de Caxias do Sul, RS e transportados apropriadamente até a vinícola Beraldo Di Cale, localizada no município de Jundiá, SP, fornecedora do bagaço de uva para a pesquisa. O coproduto foi recebido úmido e acondicionado em embalagem térmica e posteriormente levado para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, onde foi seco em estufa com circulação de ar (Fabbe[®]) a 40 °C durante cinco dias.

As exsicatas da planta nas fases de inflorescência e início da frutificação (fase chumbinho) foram depositadas no Herbário do Instituto de Biociências da USP/SP, com o número de identificação Hübner, A.1.

4.1.1 Preparo do extrato seco do bagaço de uva

Uma amostra de 3,2 kg do bagaço seco composta de 56,24% de cascas, 41,57% de sementes e 2,19% de engaços (hastes laterais e pedicelos), determinados experimentalmente por meio da amostragem de 150 g de droga (FARMACOPEIA, 2010) foi pulverizada em moinho de facas e martelos (Thomas[®]), passando por poros na peneira de 1 mm (85,50%) e o restante (14,50 %) com tamanho superior a 1 mm em moinho de bolas. Com a droga pulverizada foi elaborado o extrato hidroetanólico liofilizado (EHEL), de acordo com o método A da Farmacopeia Brasileira (1959). O pó permaneceu em contato com a solução EHEL 70% v/v pelo processo de maceração durante 18 horas e posteriormente, realizada a percolação. O percolado foi concentrado à pressão reduzida em evaporador de película ascendente (desenvolvimento acadêmico), depois homogeneizado e a solução aquosa remanescente liofilizada (liofilizador modelo Liotop[®] K202). O extrato seco do bagaço de uva foi usado para o desenvolvimento das formulações cosméticas e para os ensaios *in vitro* e em seres humanos (**Figura 5**).

Figura 5 - Droga vegetal (A) usada para o preparo do extrato seco total do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (B)

Fonte: Hübner, 2014.

4.1.2 Análise fitoquímica

A triagem fitoquímica preliminar qualitativa, visa a identificar a presença de grupos de princípios ativos naturais relevantes na droga vegetal pulverizada do bagaço de uva total (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Triagem fitoquímica para cada grupo de metabólito secundário

Metabólito secundário	Reação química	Referência
Alcaloides	Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer	SIMÕES et al., 2010
Antraquinonas	Borntraeger com hidróxido de sódio	COSTA, 2001
Cumarinas	Solução alcalina	SIMÕES et al., 2010
Flavonoides	Cloreto de alumínio, Cianidina (Shinoda) e hidróxido de sódio.	COSTA, 2001
Saponinas	Teste de espuma	COSTA, 2001
Taninos	Cloreto férrico, Acetato de chumbo, Acetato de cobre, alcaloides, proteína (gelatina), cloreto férrico	COSTA, 2001; SIMÕES et al., 2010

4.1.3 Determinação dos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos do extrato seco do bagaço de uva foi determinado empregando o reagente Folin-Ciocalteu, uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico e o ácido gálico como composto fenólico padrão. Na **Figura 6**, o ácido gálico em meio alcalino sofre desprotonação, formando ânions fenolatos que reagem com molibdênio presente no reativo de Folin em sua forma oxidada formando um complexo de coloração amarela, mas quando reduzido por fenólicos, forma complexos azuis de molibdênio-tungstênio (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 6 - Reação de complexação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente Folin-Ciocalteu

Fonte: Oliveira et al., 2009.

As amostras e as soluções padrão foram preparadas em 10% de etanol, concentração de $400 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para extrato bruto e $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para ácido gálico. Em placas de 96 poços foi adicionada uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ de amostra ou padrão em cada poço, depois $30 \mu\text{L}$ de água destilada, $100 \mu\text{L}$ de carbonato de sódio 700 mM e 50 mL de Folin-Ciocalteu. Após duas horas protegida da luz, foi realizada a determinação da absorbância de cada amostra em triplicata, em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Módulo Leitor de Microplacas Biotek®, usando um comprimento de onda de 765 nm (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007).

Cada valor foi comparado à equação de regressão linear da curva de calibração da solução padrão de ácido gálico (85 a $25 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$) e expressa em equivalentes de ácido gálico ($\text{mg GAE}.\text{g}^{-1}$ extrato). O resultado foi expresso como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

4.1.4 Determinação de flavonoides

O teor total de flavonoides no extrato seco de bagaço de uva foi determinado utilizando metodologia adaptada ao ensaio colorimétrico de Pozzi (2007) com tricloreto de alumínio (AlCl_3) e o padrão analítico quercetina (QE). A **Figura 7** mostra a complexação do íon alumínio (Al^{3+}) com os oxigênios vicinais da molécula de QE, formando um complexo estável de coloração amarela, causado por um deslocamento batocrômico das bandas de absorção do flavonoide (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

Figura 7 - Reação de complexação do íon alumínio (Al^{3+}) com os oxigênios vicinais da molécula de quercetina

Fonte: Peixoto Sobrinho et al., 2012.

As soluções foram preparadas em etanol (60% v/v), concentração de $17,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ para extrato de bagaço e diluições de quercetina padrão (50 a 200 µg.mL^{-1}). Em placa de 96 poços foi adicionado em cada poço 20 µL de amostra ou padrão, 20 µL de solução etanólica de tricloreto de alumínio (2%) e 210 µL de solução etanólica. Após 30 minutos protegida da luz, foi realizada a determinação da absorbância de cada amostra em triplicata, em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Módulo Leitor de Microplacas Biotek[®], usando um comprimento de onda de 427 nm.

O teor de flavonoides do extrato foi avaliado utilizando a equação de regressão linear da curva de calibração da quercetina (equivalente de mg QE.g^{-1} de extrato seco). O resultado foi expresso como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

4.1.5 Avaliação microbiológica

A qualidade microbiológica das amostras de extrato seco do bagaço de uva usadas nos ensaios em seres humanos foi verificada através da contagem total de bactérias aeróbias (ou viáveis) e fungos/leveduras, utilizando a técnica de semeadura em profundidade, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Utilizaram-se os meios de cultura ágar Caseína de Soja e ágar Sabouraud-dextrose. As amostras foram mantidas a $32,5 \pm 2,5$ °C durante 48 horas para bactérias e $22,5 \pm 2,5$ °C por sete dias para fungos e leveduras. Uma alíquota de 1g de extrato seco foi solubilizada em 9 mL de solução fisiológica estéril. A partir desta diluição inicial (10^{-1}) foram feitas diluições decimais seriadas com o mesmo solvente (10^{-2} e 10^{-3}). Em seguida, 1 mL de cada diluição foi colocado em placa petri e, posteriormente, acrescentados 10 mL de meio de cultura e a mistura homogeneizada. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g) foi calculado pela média aritmética das placas de cada amostra ($n = 3$).

4.1.6 Atividade antioxidante do extrato seco

O potencial antioxidante do extrato foi determinado utilizando 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) em metanol (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995), tendo como padrão-Trolox[®]. A solução metanólica com radical livre apresenta coloração violácea e absorvância máxima de 517 nm, mas quando é reduzida por agentes antioxidantes, muda a cor para amarelo e o valor da absorvância sofre uma queda como pode ser observado na **Figura 8** (OLIVEIRA, 2010).

Figura 8 - Reação de redução do radical DPPH[•] por uma molécula antioxidante DPPH-H e a consequente diminuição nos valores de absorvância

Continua...

Conclusão

Fonte: adaptado de Oliveira, 2010.

O extrato seco foi solubilizado em metanol na concentração de 1 mg.mL^{-1} e submetido ao ultrassom durante 20 minutos, depois a solução foi ajustada em dois valores de pH (5 e 7). Aliquotas de 0,1 mL de cada amostra foram transferidas em 3,9 mL de solução metanólica de DPPH $70 \text{ }\mu\text{M}$, homogeneizadas e mantidas em repouso à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e protegidas da luz por 30 minutos. Após este período, as amostras foram avaliadas por espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Evolution Scientifica® 600), comprimento de onda de 517 nm, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de comprimento de percurso óptico.

Atividade antioxidante (AAO) foi expressa por meio da porcentagem de inibição do $\text{DPPH}^{\bullet}$ pelas amostras, de acordo com a **Equação 1** (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e em equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). A análise de regressão linear ($R^2 = 0,9941$) foi no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

$$\% \text{ AAO} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: Abs controle é a absorbância da solução DPPH[•] preparada com o controle negativo (metanol); Abs amostra é a absorbância da solução de DPPH[•] preparada com a amostra em teste.

4.1.7 HPLC e ESI-MS/MS

A análise do conteúdo fenólico no bagaço de uva total (cascas, sementes e engaços) seguiu a metodologia de Rubilar et al. (2007). O extrato seco foi solubilizado em metanol P.A. Synth[®] na concentração de 10 mg.mL⁻¹ em ultrassom, filtrado através de um filtro de nylon de 0,45 µm, e injetado no HPLC (5 µL) em um fluxo de 0,7 mL.min⁻¹ à temperatura ambiente.

Os polifenóis foram separados em HPLC com coluna de fase reversa C18 Shim-pack VP-ODS (250×4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm), com controladora de sistema CBM-20A (Shimadzu[®]) conectado às bombas binárias LC-20AD (Shimadzu[®]), detector UV/VIS SPD-20A (Shimadzu[®]), forno CTO-20A (Shimadzu[®]) e auto-injetor SIL 20AC (Shimadzu[®]). O sistema solvente usado para eluir os compostos foi: A - solução de água (Mili-Q[®]) e ácido acético a 0,1% e B – metanol; e como condições de gradiente: 0-10 min (95A/5B); 10-60 min (50A/50B); 60-80 min (30A/70B); 80-90 min (95A/5B). Um perfil cromatográfico do extrato foi obtido no comprimento de onda de 254 nm.

A detecção e identificação dos compostos presentes no bagaço de uva foi realizada em equipamento Amazon ETD (Bruker Daltonics[®]), espectrometria de massas em modo positivo e com os seguintes parâmetros experimentais: fluxo do gás de secagem (N₂) de 9 L.min⁻¹, à temperatura de 300 °C, pressão do nebulizador 27 psi e tensão no capilar de 4500 V.

4.2 Formulações

O presente estudo contemplou o desenvolvido de duas formulações base: a) Formulações (F1 - F6) empregada somente nos ensaios *in vitro* preliminares, com o mínimo de ingredientes e em diferentes valores de pH com o intuito de avaliar os ingredientes ativos da composição na resposta do FPS e na fotoestabilidade; b) Formulações (A - H) planejada e executada de acordo o Delineamento Experimental (DoE), em três blocos, visando a investigar o impacto das interações entre as variáveis, tais como: ativos naturais, os filtros

solares e a radiação UV nas respostas da atividade antioxidante, FPS *in vitro*, comprimento de ondas, proteção UVA e UVB e razão UVA/UVB. As amostras com os melhores resultados foram analisadas quanto à segurança na pele de seres humanos, e posteriormente realizada análise da eficácia fotoprotetora clínica.

4.2.1 Formulações (F1 - F6)

Preliminarmente foram preparadas doze formulações com o copolímero acriloldimetiltaurato de amônio e vinilpirrolidona (Aristoflex[®] 2,0% p/p) em pH 3, 5, 7 e 10, como pode ser observado no Apêndice B (**Tabela 1**), a fim de avaliar a interação do meio com os componentes da formulação nas respostas biológicas. Destas, seis formulações foram selecionadas pelo critério de estabilidade (**F1, F2, F3, F4, F5 e F6**) e divididas em três grupos (I, II e III). Cada grupo foi ajustado em dois valores de pH 5 e 7 e, as concentrações dos filtros químicos seguiram a legislação e diretrizes internacionais (CHISVERT; SALVADOR, 2007; COSMETICS EUROPE, 2006; JAPAN, 2000).

Os filtros UV empregados nas preparações foram: BMDM (butilmetoxidibenzoilmetano 5,0% p/p), EHMC (etil-hexilmetoxicinamato 10,0% p/v) e EHDP (etil-hexildimetil PABA 10,0% p/v), bem como o extrato seco do bagaço de uva (10% p/p) e outros adjuvantes farmacêuticos quali e quantitativos (% p/p) descritos na **Tabela 6**. Foram desenvolvidos 100 g de cada formulação e as análises realizadas em triplicata (BABY et al., 2007).

Fase Aquosa (FA) - Pesou-se 10 g do extrato de *V. vinifera* L., posteriormente foi solubilizado em água purificada e mantido em banho de ultrassom (Unique[®] UltraCleaner 1600[®]) durante 30 minutos. Aristoflex[®] (2% p/p) foi pulverizado sobre a solução aquosa, a mistura homogeneizada, mantida em repouso à temperatura ambiente e protegida da luz por 15 minutos, a fim de hidratar o copolímero, em seguida, a mistura permaneceu em banho-maria até a temperatura de 50 °C (Termômetro digital JProLab[®]).

Fase Oleosa (FO) - Os três filtros orgânicos BMDM, EHMC e EHD-PABA foram aquecidos até 70 °C, com o objetivo de solubilizar a fase oleosa, em seguida, a solução oleosa foi resfriada à temperatura ambiente, não havendo formação de nenhum precipitado.

Por fim, a **FO** foi vertida lentamente em agitação constante na **FA**, assim como o sistema conservante (Phenochem[®] 0,1%). As formulações contendo bagaço de uva foram

homogeneizadas em equipamento digital Ultra-Turrax[®] (marca IKA, modelo T25) a 16.000 rpm durante 5 minutos. As formulações foram ajustadas com hidróxido de sódio para os valores pH selecionados e armazenadas por 24 horas em geladeira à temperatura de 8 °C, protegidas com papel alumínio.

Tabela 6 - Composição das formulações (F1 - F6) em dois valores de pH diferentes

Substância química (INCI*)	Concentração (% p/p)					
	I		II		III	
	F1 - pH 5	F2 - pH 7	F3 - pH 5	F4 - pH7	F5 - pH 5	F6 - pH7
Fase Aquosa						
Ammonium acryloyldimethyltaurate vinylpyrrolidone	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Bagaço de uva	-	-	10,00	10,00	10,00	10,00
Água purificada	72,90	72,90	87,90	87,90	62,90	62,90
Fase Oleosa						
Ethylhexyl Methoxycinnamate	10,00	10,00	-	-	10,00	10,00
Ethylhexyl dimethyl PABA	10,00	10,00	-	-	10,00	10,00
Butyl methoxydibenzoyl methane	5,00	5,00	-	-	5,00	5,00
Mistura de fenoxietanol e ésteres de parabeno**	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Legenda: * INCI: Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; **Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno,e Isobutilparabeno; **I** - Base + filtros UVA e UVB (25%); **II** - Base + bagaço de uva (BU 10%); **III** - Base + filtros UV (25%) + BU (10%); Hidróxido de sódio (quantidade suficiente) foi utilizado para a obtenção dos valores de pH 5 e 7.

4.2.1.1 Caracterização física e físico-química

As formulações (F1 - F6) foram caracterizadas através do teste físico-químico (valor de pH) com o auxílio do peagâmetro Quimis®, modelo G400 e as propriedades organolépticas foram determinadas subjetivamente por meio do aspecto, cor e odor (ANVISA, 2004).

4.2.1.2 Atividade antioxidante das formulações (F1 - F6)

A atividade antioxidante das formulações (F1 - F6) foi mensurada por meio da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de acordo com o método descrito no item 4.1.6 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX, 2004; PERES et al., 2017; SHARMA; BHAT, 2009).

Alíquotas de 1% (p/p) das formulações foram solubilizadas em metanol e sonicadas durante 20 minutos, em seguida as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 20 minutos e os sobrenadantes utilizados nas análises espectrofotométricas. A concentração de bagaço de uva nas soluções metanólicas foi de 1,0 mg.mL⁻¹ de extrato seco e o pH ajustado em dois valores (5 e 7). 100 µL da formulação diluída foram adicionados a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH• 70 µM e homogeneizadas.

A capacidade antioxidante foi expressa em equivalente Trolox (µmol TE/g), através da construção de uma curva padrão nas seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200 µg.mL⁻¹ (R² = 0,9978), média ± desvio padrão das amostras em triplicata.

4.2.1.3 Fator de proteção solar e fotoestabilidade

Fator de proteção solar (FPS *in vitro*) das formulações (F1 - F6) foram determinados em espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere UV-2000S® Transmittance Analyzer) e o método realizado de acordo com Baby et al. (2008), Peres et al. (2017) e Velasco et al. (2008).

As amostras, pesadas em balança analítica (Shimadzu® AUY220), foram uniformemente aplicadas em placas de polimetilmetacrilato - PMMA (HelioScreen® Helioplate HD 6) na proporção de 0,75 mg.cm⁻² e mantidas em repouso à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C) e protegidas da luz por 15 minutos. Posteriormente, leituras da absorbância das formulações fotoprotetoras foram realizadas em intervalo de comprimento de

onda de 290 a 400 nm em triplicata, no mínimo em sete pontos diferentes por placa de cada amostra. Os valores médios de absorvância espectral obtidos para as três repetições foram utilizados para calcular FPS (**Equação 2**), comprimento de onda crítico (**Equação 3**) e taxa UVB/UVA das formulações.

Os resultados do FPS *in vitro* foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$) e nível de significância $< 0,05$. A análise estatística utilizada foi (ANOVA) seguida do teste de Tukey, para determinar diferenças inter e intragrupos.

$$FPS_{in vitro} = \frac{\int_{290 nm}^{400 nm} E\lambda \cdot S\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290 nm}^{400 nm} E\lambda \cdot S\lambda \cdot T\lambda \cdot d\lambda} \quad (2)$$

$$R = \frac{\int_{290 nm}^{\lambda} A\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290 nm}^{400 nm} A\lambda \cdot d\lambda} \quad (3)$$

Onde:

FPS é um fator de proteção solar;

R é um comprimento de onda crítico;

E λ é o espectro de eficiência do eritema UVB (290 - 320 nm);

S λ é o espectro de irradiação UVA (300 - 400 nm);

T λ é o espectro de transmissão da amostra (290 - 400 nm);

A λ é $\log(T\lambda)$;

λ é a absorvância espectral do comprimento de onda da formulação (nm).

O teste de fotoestabilidade foi realizado pelo analisador de transmitância ultravioleta (Labsphere® UV-2000 S), a fim de prever possíveis degradações decorrentes da radiação emitida pela câmara de fotoestabilidade. Cada amostra foi pesada 0,0187 g em balança analítica (Shimadzu® AUY 220), aplicada em proporção de 0,75 mg.cm⁻² em placas de PMMA (HelioScreen® Helioplate HD 6), em triplicata. A absorvância das formulações foi medida em 250-450 nm antes e depois de 1 e 2 horas sob o simulador de irradiação UV (Atlas Suntest® CPS+), provido com uma lâmpada de xenônio, dose de irradiação a 500 W.m⁻² e temperatura a 35 °C (COSMETICS EUROPE, 2011; DIFFEY et al., 2000; UNITED STATES, 2011).

Os resultados de fotoestabilidade das formulações (F1 - F2) foram analisados por análise de variância (ANOVA) em réplica de três e nível de significância $< 0,05$, seguida do teste de Tukey, para determinar diferenças inter e intragrupos e a fotoestabilidade das formulações **III**, F5 e F6 seguiram o teste estatístico ANOVA two-way (3 réplicas, $n = 18$), pH (p-valor $< 0,001$), concentração (p-valor $< 0,001$) e interação (p-valor $< 0,001$). Teste post hoc da Sidak.

4.2.2 Formulações (A - H)

Totais de onze formulações foram desenvolvidas por meio do Delineamento experimental (DoE), no entanto, apenas oito seguiram nos estudos *in vitro* (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G** e **H**) e duas (**C** e **D**) foram avaliadas quanto à sua segurança e eficácia fotoprotetora em seres humanos, como pode ser observado na **Tabela 7**.

O copolímero Aristoflex[®], os três filtros UV e o extrato vegetal foram os mesmos empregados nas preparações do **item 4.2.1**, porém em concentrações distintas e com um doador de viscosidade e emulsificante adicional, o ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer, trilaureth-4 phosphate, rapeseed oil sorbitol esters, mineral oil and isopropyl palmitate (Hostacerin[®] SAF 2,0% p/v), a fim de fornecer maior estabilidade às formulações, inclusive em pH ácidos. A concentração dos filtros foi de acordo com as legislações e diretrizes brasileiras e internacionais vigentes (ANVISA, 2016; CHISVERT; SALVADOR, 2007; COSMETICS EUROPE, 2006). Cada formulação foi preparada para 100 g e analisada em triplicata.

Fase Aquosa (FA) - Diferentes concentrações do extrato seco de *V. vinifera* L. foram solubilizadas em álcool etílico com o quelante de metais EDTA dissódico, propilenoglicol e água purificada. As soluções contendo bagaço de uva foram homogeneizadas em equipamento digital Ultra-Turrax[®] (marca IKA, modelo T25) a 9000 rpm em 4 ciclos de 5 minutos. Aristoflex[®] 0,5% foi pulverizado sobre as soluções, homogeneizado, mantido em repouso à temperatura ambiente protegido da luz por aproximadamente 15 minutos, a fim de hidratar o copolímero e evitar degradações do extrato, em seguida, permaneceram em banho-maria até a temperatura de 50 °C (Termômetro digital JProLab[®]), após as amostras permaneceram em repouso até atingirem à temperatura ambiente.

Fase Oleosa (FO) – Misturas dos três filtros orgânicos UVA e UVB (EHMC, BMDM e EHDP) foram aquecidas até 65 °C juntamente com o antioxidante butil hidroxitolueno (BHT), com o objetivo de solubilizar a fase oleosa, em seguida, as soluções oleosas foram resfriadas à temperatura ambiente, não sendo observada a formação de nenhum precipitado.

Finalmente, **FO** foi vertida lentamente em agitação constante na **FA**, assim como, o sistema conservante (Phenochem[®] 0,75% p/v). As formulações acabadas foram ajustadas com hidróxido de sódio para o valor de pH 5 e armazenadas por 24 horas em geladeira à temperatura de 8 °C e protegidas com papel alumínio para evitar fotodegradações. A análise das amostras foi realizada em triplicata (BABY et al., 2007).

Tabela 7 - Composição de ingredientes ativos das formulações (A - H)

Substância química (INCI ^a)	Concentração (% p/p)							
	A*	B*	C ^{*/**}	D ^{*/**}	E*	F*	G*	H*
Fase aquosa								
Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer, Trilaureth-4 Phosphate, Rapeseed Oil Sorbitol esters, Mineral Oil and Isopropyl Palmitate	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Ammonium acryloyldimethyltaurate vinylpyrrolidone	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Propylene Glycol	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Ethyl alcohol	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Disodium EDTA	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Bagaco de uva	1,46	8,54	0,00	10,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Água purificada	78,85	71,78	64,05	54,05	82,05	59,05	59,05	59,05
Fase oleosa								
Butyl methoxydibenzoyl methane i	0,73	0,73	2,50	2,50	0,00	2,50	2,50	2,50
Ethylhexyl Methoxycinnamate ⁱⁱ	1,46	1,46	5,00	5,00	0,00	5,00	5,00	5,00
Ethylhexyl dimethyl PABA ⁱⁱ	1,17	1,17	4,00	4,00	0,00	4,00	4,00	4,00
Butyl hydroxy toluene	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Mistura de fenoxietanol e ésteres de parabenos ⁱⁱⁱ	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

Legenda: ^a INCI: Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; ⁱ filtro UVA (BMDM: 320-400 nm), ⁱⁱ filtros UVB (EHMC e EHDP: 290-320 nm), ⁱⁱⁱ Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, e Isobutilparabeno, Corretor de pH – quantidade suficiente q.s: Hidróxido de sódio.

* Estudos *in vitro* e ** Testes clínicos

4.2.2.1 Caracterização física e físico-química

A propriedade organoléptica das formulações (A - H) foram avaliadas por meio do aspecto, cor e odor. A caracterização físico-química, como o valor de pH, foi obtida a partir das dispersões das amostras em água destilada (1:10). A análise das amostras ($n = 3$) foi feita em peagâmetro Quimis[®], modelo G400 (ANVISA, 2004; BABY et al., 2008).

4.2.2.2 Estudo de estabilidade preliminar

A estabilidade preliminar das formulações (A - H) seguiu a metodologia descrita por Baby et al. (2008), por meio dos testes de centrifugação, seguido do estresse térmico. As análises organolépticas e macroscópicas das amostras foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), conforme a classificação pré-definida: N: normal, M: modificada e LM: levemente modificada.

Teste de centrifugação - Em tubos de ensaios plásticos foi adicionado 5,0 g de formulações, em seguida colocados em centrífuga Hitachi[®] RX2 durante 30 minutos, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e velocidade de rotação de 3.000 rpm ou 210 G.

Teste do estresse térmico - Alíquotas de 5,0 g de cada formulação foram pesadas em tubos de ensaio individuais e, depois mantidas em banho-maria termostatizado Nova Ética[®] N480 por 30 minutos em cada temperatura (40, 50, 60, 70 e 80 °C).

4.2.2.3 Avaliação microbiológica

As formulações fotoprotetoras C e D usadas nos testes em seres humanos foram previamente avaliadas microbiologicamente através da contagem total de bactérias aeróbias e fungos/leveduras conforme a metodologia empregada no item 4.1.5. O sistema conservante das formulações foi inativado com polissorbato 80 (0,5 % p/v) e lecitina (4,0 % p/v). Alíquota de 1 g de cada formulação foi solubilizada em 9 mL de solução fisiológica estéril. A partir desta diluição inicial (10^{-1}) foram feitas diluições decimais seriadas com o mesmo solvente (10^{-2} e 10^{-3}). Em seguida, 1 mL de cada diluição foi colocado em placas petri e, posteriormente, acrescentados 10 mL de meio de cultura e homogeneizadas. As UFC.g-1 de

cada amostra foram calculadas pela média aritmética das placas de cada amostra analisada em triplicata (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.2.4 Delineamento Experimental (DoE)

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi utilizada para avaliar o efeito das variáveis independentes, como a concentração de filtros solares, a concentração de extrato e o tempo de irradiação na resposta dependente do FPS *in vitro*, atividade antioxidante, comprimento de onda crítico, proteção UVA e UVB e razão UVA/UVB. O planejamento de compósito central (CCD) incluiu 3 pontos centrais (em verde), 4 pontos fatoriais (em vermelho) e 4 pontos axiais (em azul) como mostra a **Figura 9**. A análise estatística seguiu o teste ANOVA ($p < 0,05$), usando o software Minitab, versão 17.

Figura 9 - Representação esquemática do Delineamento Experimental

Legenda: (X; Y) - X corresponde a concentração total de extrato em % p/p e Y a concentração total de filtros UV em % p/p).

4.2.2.4.1 Atividade antioxidante das formulações (A - H)

A atividade antioxidante das formulações (A - H) foram mensuradas conforme a metodologia do **item 4.2.1.2** (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995; MOLYNEUX, 2004; PERES et al., 2017; SHARMA; BHAT, 2009) e avaliada por meio da MSR, concomitantemente com os parâmetros FPS, comprimento de onda crítico, proteção UVA e UVB e razão UVA/UVB, com o objetivo de investigar interações entre as variações (extrato, filtros UV e tempo de irradiação).

Alíquotas das formulações (1% p/p) foram solubilizadas em metanol e sonicadas durante 20 minutos, em seguida, as amostras foram ajustadas a valores próximos de pH 5. Em tubos de ensaio, um volume de 1 mL de cada formulação diluída foi adicionado a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH• 70 µM e a mistura homogeneizada. Em seguida, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente.

A capacidade antioxidante foi expressa em equivalentes de Trolox (µmol TE.g⁻¹), através da construção de uma curva padrão nas seguintes concentrações 3,12; 25; 50; 100; 125; 150; 200 e 250 µg.mL⁻¹ (R² = 0,9986) e porcentagem de inibição do DPPH, média ± desvio padrão das amostras em triplicata.

4.2.2.4.2 Fator de proteção solar (FPS *in vitro*) e fotoestabilidade

FPS *in vitro* e o teste de fotoestabilidade das formulações (A - H) foram determinados por espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere UV-2000S[®]) e simulador de irradiação UV (Suntest CPS, Atlas Linsengericht, Alemanha) conforme os parâmetros descritos no **item 4.2.1.3** e de acordo com Baby et al. (2008), Peres et al. (2017) e Velasco et al. (2008). Os valores médios de absorbância das triplicatas foram usados para calcular FPS, comprimento de onda crítico, proteção UVA, proteção UVB, taxa UVB/UVA das formulações.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n = 3). As respostas de superfície das formulações foram determinadas pelo coeficiente de regressão linear, quadrático, interações e equação de regressão através do teste ANOVA one-way (p < 0,05).

4.2.2.4.3 Fator de Proteção UVA (FP-UVA)

A avaliação do FP-UVA *in vitro* dos protetores solares **C** e **D** seguiu as especificações do Teste Internacional de Fator de Proteção Solar (COSMETICS EUROPE, 2011) utilizando espectrofotômetro de refletância difusa com esfera integradora (Labsphere® UV-2000S) e os valores de eficácia fotoprotetora clínica. Cada amostra foi aplicada nas três placas de PMMA (HelioScreen® Helioplate HD 6) na proporção de 1,30 mg.cm⁻² e mantida em ambiente escuro durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, cada placa foi avaliada em intervalos de comprimento de onda 250-450 nm, em triplicata e pelo menos 7 pontos diferentes. Um simulador artificial de luz solar (Suntest CPS, Atlas Linsengericht, Alemanha), dose de irradiação UV de 580,08 W.m⁻² foi aplicado nas amostras em triplicata, após 25 minutos, período determinado experimentalmente (UNITED STATES, 2011). Os valores médios da absorbância espectral obtidos pré e pós-irradiação foram utilizados para calcular FP-UVA. Para a análise estatística utilizou-se o teste t-Student (uni-caudal) e p = 0,003 usando o software Minitab, versão 17.

4.3 Ensaio clínico

Duas formulações fotoprotetoras, sem e com extrato vegetal (10% p/p) e com a mesma concentração dos demais insumos farmacêuticos foram selecionados para os ensaios clínicos de segurança através dos testes de irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização; fototoxicidade e fotossensibilização e para avaliação da eficácia fotoprotetora em seres humanos.

4.3.1 Sujeitos

Os ensaios clínicos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, seguindo as regras da Declaração de Helsinque e todos eles foram conduzidos pelo IPclin, Jundiaí/SP, Brasil (BRASIL, 2012). Alguns critérios de exclusão dos sujeitos no painel clínico foram: gravidez ou aleitamento, história de reação alérgica e câncer de pele ou problemas dermatológicos na área de teste.

Os critérios de inclusão dos sujeitos foram: feminino ou masculino, fototipo de pele de I a IV (FITZPATRICK, 1975), idade entre 18 a 65 anos, apresentando pele saudável na área do dorso. Como a ausência de risco não é nula, a aplicação tópica de ingredientes ativos como parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno), filtros (butoxi-hidibenzoilmetano, etil-hexil metoxicinamato e etil-hexilmetil PABA) e exposição à irradiação UV podem envolver sensibilização da pele, contato e dermatite alérgica, com intensidades variáveis e graves. Por essas razões, os voluntários foram acompanhados diretamente em todas as etapas do estudo, incluindo um mês após os testes, pela dermatologista e também pelos pesquisadores ligados à universidade.

Durante os testes, eles tiveram que evitar a exposição intensa ao sol; remover ou molhar a fita adesiva hipoalergênica; tomar imunizações ou usar roupas apertadas. Os participantes foram restringidos a tomar medicação fotossensibilizante, sistêmica ou tópica, dose contínua de anti-inflamatório, vitamina A e ácidos, e impossibilitados de submeter-se a tratamentos cosméticos (COSMETICS EUROPE, 2006; UNITED STATES, 2007; 2011).

4.3.2 Teste de irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização

No teste primário de irritabilidade dérmica acumulada e sensibilização foram admitidos sessenta indivíduos do sexo masculino e feminino de 18 a 64 anos e fototipo de pele I a IV (FITZPATRICK, 1975). Irritação é um estímulo provocado por agentes irritativos acima do limiar fisiológico normal da pele, resultando em um processo inflamatório local ou sistêmico, leve a severo, caracterizado pelos sinais clínicos: hiperemia, formação de vesículas e edemas. Sensibilização é uma reação que ocorre no local de aplicação do produto, pele ou membrana mucosa (FISHER; RIETSCHEL; FOWLER, 1995; UNITED STATES, 1959).

O estudo durou 6 semanas e foi dividido em três etapas: I - Indução da 1ª à 3ª semana: nos três dias da semana intercalados foram aplicadas a fita adesiva hipoalergênica (*Patch Test*- teste epicutâneo ou teste de contato) com as amostras teste e controle aleatoriamente no dorso do voluntário. Sinais clínicos e desconfortos foram relatados ao dermatologista e os produtos foram reaplicados na mesma área; II - Descanso da 4ª à 5ª semana: nenhum produto foi aplicado na pele; III - Desafio 6ª semana: as amostras permaneceram em contato com a pele por 48 horas. A fita adesiva foi removida da pele e após 30 minutos, as áreas tratadas foram avaliadas clinicamente (ANVISA, 2012; COSMETICS EUROPE, 2004).

4.3.3 Teste de fototoxicidade e fotossensibilização

No teste de fototoxicidade e fotossensibilização foram submetidos trinta indivíduos do sexo masculino e feminino de 18 a 64 anos e fototipo de pele I a IV (FITZPATRICK, 1975). Fototoxicidade: A resposta eritematosa da pele sem base imunológica pode ocorrer com um período de latência de horas ou dias após a radiação UV. Fotossensibilização: A resposta cutânea com base imunológica pode ocorrer em indivíduos previamente sensibilizados por drogas e após radiação UV (BIRCHER et al., 1994; PINNAGODA; TUPKER; AGNER, 1990; VICIOLLE; CASTILHO; ROSADO, 2012).

O estudo durou 5 semanas e foi dividido em três etapas: I - Indução da 1ª à 2ª semana: a fita adesiva hipoalergênica (*Patch Test*) foi mantida na pele durante 48 horas com as amostras de teste controladas aleatoriamente no dorso e as áreas expostas à radiação UVA e UVB por 6min40s. Os sinais clínicos foram relatados ao dermatologista e os produtos reaplicados na mesma área; II - Descanso da 3ª à 4ª semana: nenhum produto foi aplicado na pele; III - Desafio 5ª semana: as amostras ficaram em contato com a pele por 48 horas, após esse tempo a fita adesiva foi removida da pele e as áreas novamente irradiadas. A avaliação clínica foi realizada após 30 minutos de irradiação. Foi utilizado um simulador solar artificial UVA (ProLumina® Mini, Phillip) a 100 Watts, com controle digital do tempo de irradiação. A radiação foi tratada por um medidor de radiação UV (Solarmeter®). A intensidade da lâmpada medida foi de 10 mW.cm^{-2} (ANVISA, 2012, COSMETICS EUROPE, 2004).

4.3.4 Avaliação da Eficácia fotoprotetora

A eficácia fotoprotetora foi avaliada de acordo com o Método Internacional do Teste de Fator de Proteção Solar (COSMETICS EUROPE, 2006). O FPS foi calculado de acordo com a proporção de Dose Eritematosa Mínima em pele humana protegida (DEM p) e em pele não protegida (DEM np). DEM é a menor dose de radiação UV a produzir eritema com bordas definidas visíveis.

Dez indivíduos de 37 a 61 anos, fototipo de pele II e III (FITZPATRICK, 1975) foram admitidos para participar da pesquisa. No primeiro dia, os voluntários foram avaliados dermatologicamente e três amostras teste C, D e produto de referência P2 (SPF 16) foram aplicados uniformemente a $2,0 \text{ mg.cm}^{-2}$ em posições aleatórias na região dorsal entre a escápula e a linha do quadril, previamente demarcadas em 35 cm^2 , em cada voluntário. Após

15 minutos de secagem, as áreas de aplicação foram irradiadas com um simulador solar artificial (Solar Light, Multiport[®] 601) com emissões nas bandas UVA e UVB, com dose de acordo com o valor do FPS das amostras e a DEM de cada participante e local de aplicação obtida de exposição UV em progressão geométrica, com aumento de 12% entre elas. Posteriormente, 20 ± 4 horas foram medidos DEM p e DEM np e calculados os valores de SPF das amostras (ANVISA, 2012).

A eficácia fotoprotetora de cada amostra foi expressa pela média aritmética dos valores de FPS dos 10 voluntários avaliados, em um intervalo de confiança de 95%, utilizando o teste t-Student pareado (p-valor = 0,002) e o software Minitab, versão 17.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do extrato seco do bagaço de uva

O rendimento da extração hidroetanólica (70% v/v) do coproduto previamente seco e pulverizado seguido de concentração e liofilização foi de 12,85% (**Tabela 8**). A liofilização ou secagem da amostra minimizou a contaminação por micro-organismos e padronizou a concentração de substâncias ativas nas formulações dermocosméticas.

Tabela 8 - Rendimento do extrato seco do bagaço de uva Cabernet Sauvignon

Coleta	Droga vegetal (g)	Extrato seco (g)	Rendimento (%)
Março (2014)	3200	411,25	12,85

5.1.1 Análise fitoquímica

O resultado da triagem fotoquímica do extrato seco (**Tabela 9**) foi obtido por meio de reações químicas de precipitação, colorimétricas e de formação de espuma, com o objetivo de identificar os principais grupos de substâncias ativas que compõem o bagaço de uva.

Nos resíduos orgânicos da vinificação foram identificados ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, proantocianidinas, flavonas, flavonóis, antocianinas e resveratrol (BRAHIM; GAMBIER; BROSSE, 2014; GARRIDO; BORGES, 2013; GHARRAS, 2009; KAMMERER et al., 2004;2005; TEXEIRA et al., 2014).

Além disso, bagaço de uva contém alta concentração de taninos condensados (21% a 52% p/p) como os dímeros de procianidinas que inibem enzimas catalisadoras de espécies reativas de oxigênio: “(-)-epicatequina-(4-8)-(+)-catequina; (-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina; (+)-catequina-(4-8)-(+)-catequina; (+)-catequina-(4-8)-(-)-epicatequina; procianidina (-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina e (-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina-(4-8)-(+)-catequina” (RONDEAU et al., 2013).

Tabela 9 - Triagem fitoquímica do bagaço da uva *V. vinifera* L.

Metabólitos secundários	Reações químicas	Resultados
Alcaloides	Bertrand	(-)
	Bouchardat	(-)
	Dragendorff	(-)
	Mayer	(-)
Antraquinonas	Bornträger	(-)
Cumarinas	Solução alcalina	(-)
Flavonoides	Cloreto de alumínio	(+)
	Shinoda	(+)
	Hidróxidos alcalinos	(+)
Saponinas	Espuma	(+)
Taninos	Sais de ferro	(+)
	Acetato de chumbo	(+)
	Acetato de cobre	(+)
	Alcalóides	(+)
	Gelatina	(+)

Legenda: (+) presença (-) ausência

5.1.2 Fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais no extrato do bagaço de uva *V. vinifera* L. foi realizada com o ácido gálico como padrão analítico para a construção da curva de calibração (**Figura 10**) e o teor expresso em mg GAE.g⁻¹ (equivalente de ácido gálico por grama de extrato) como está representado (**Tabela 10**).

Figura 10 - Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato seco de *C. Sauvignon* (*V. Vinifera* L.)

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 10 - Teor de fenólicos totais no bagaço de uva Cabernet Sauvignon

Amostra	Fenólicos Totais (mg GAE.g^{-1} extrato)
Extrato seco	$141,11 \pm 3,38$

Legenda: Resultado expressos em desvio padrão ($n = 3$).

Rockenbach et al. (2011) encontraram um teor de compostos fenólicos de $74,75 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ no bagaço de uva *C. Sauvignon*, uma expressiva redução no conteúdo de fenóis comparado ao presente estudo. Esse menor valor pode ter sido devido às condições de cultivo como edafoclimáticos, vinificação e processos extrativos pós vinificação. Esses fatores podem alterar as características químicas e físicas do coproduto.

Ky et al. (2014) trabalhando com cascas e sementes de uvas *V. vinifera* L. Grenache, Syrah, Carignan e Alicante constataram diferenças significativas de fenólicos totais (TP) entre as cultivares, nas cascas de $17,14$ a $31,59 \text{ mg TP.g}^{-1}$ e nas sementes de $33,01$ a $44,53 \text{ mg TP.g}^{-1}$ de extrato seco. Contudo, na pesquisa de Melo et al. (2011) encontraram valores inferiores de fenóis nos extratos de etanol 80% de uva Isabel (uva vermelha) e Verdejo (uva branca) $16,57 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ e $20,94 \text{ mg GAE.g}^{-1}$, respectivamente. Isso comprova a relevância da escolha da espécie de uva para a vinificação.

Rockenbach et al. (2008), avaliando a influência dos solventes na extração de compostos fenólicos verificaram baixos teores desses compostos extraídos com acetona 50 e 70% (v/v) nos bagaços de uvas Ancelota e Tannat, variando entre 7,95 a 7,56 g de GAE.100⁻¹ g e 6,59 a 6,90 g de GAE.100⁻¹ g de extrato seco, respectivamente. Outro estudo observou valores ainda menores de polifenóis das cascas de uvas Isabel e Niagara com solvente acetona 75% (v/v) de 1026,69 mg GAE.100⁻¹ g a 1242,78 mg GAE.100⁻¹ g em peso seco (SOARES et al., 2008).

Sulc et al. (2005) verificou nas sementes de uva vermelha Saint Laurent um alto teor de fenólicos totais de 579,5 mg.g⁻¹. Assim como, Tounsi et al. (2009) observaram altas concentrações desses compostos nas sementes de uvas Muscat d'Italie, Syrah e Carignan, de 121,94 a 440,97 mg de peso GAE. g⁻¹. Damian et al. (2015) detectaram uma variação de fenóis entre os extratos de uvas: Babeasca (vermelho), Fraguta (rosé) e Tamaioasa (branco) de 134,88 a 413,88 mg de GAE. g⁻¹, sendo evidenciada a taxa mais elevada dessas substâncias na variedade vermelha, justificando a escolha da uva tinta Cabernet Sauvignon para a pesquisa.

Como previsto, o conteúdo de fenólicos no bagaço de uva pode ser influenciado pelas condições de viticultura: genética da vinha, estágio de maturação, fatores edafoclimáticos, exposição a fungos; parâmetros de enologia: tempo e temperatura de armazenamento das amostras pós-colheita, desengace, maceração, prensagem, tipo e tempo de fermentação; bem como o processo de extração: tipo da amostra, secagem, sistema solvente, volume, tempo, moagem, temperatura, valor do pH, íons metálicos, exposição à luz e ao oxigênio e a escolha método extrativo (RIMAC-BRNCICL et al., 2015; ROCKENBACH et al., 2008).

5.1.3 Determinação de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides no extrato seco do bagaço de uva *V. vinifera* L. foi realizada com a quercetina como padrão analítico para a construção da curva de calibração (**Figura 11**) e o teor expresso em mg QE.g⁻¹ (equivalente de quercetina por grama de extrato) como está representado (**Tabela 11**). Resultado semelhante ao obtido por Wang et al. (2010) que estudaram o extrato de bagaço de Muscadine após processamento de suco e encontraram 3,0 ± 0,30 mg QE.g⁻¹, apesar deste teste ter sido realizado com 10% de nitrato de alumínio e tempo de reação mais longo comparado ao nosso ensaio. O estudo de Adisakwattana et al. (2010) também encontrou um teor de flavonoides de 2,78 ± 0,20 mg QE.g⁻¹ em AlCl₃ (10%) em sementes de uva, próximo ao que obtivemos.

Figura 11 - Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato seco de C. Sauvignon (*V. vinifera* L.)

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 11 - Teor de flavonoides no bagaço de uva Cabernet Sauvignon

Amostra	Flavonoides (mg QE.g ⁻¹ extrato)
Extrato seco	3,01 ± 0,14

Legenda: Resultado expresso em desvio padrão (n = 3).

Felhi et al. (2016) observaram uma diferença significativa na quantidade de flavonoides totais em semente de uva (*Vitis vinifera* L.) conforme a mudança do solvente, hexano $131,82 \pm 1,20$ mg QE.g⁻¹, diclorometano $256,16 \pm 1,60$ mg QE.g⁻¹, acetato de etila $103,4 \pm 2,40$ mg QE.g⁻¹, acetona $50,59 \pm 3,50$ mg QE.g⁻¹, etanol $44,55 \pm 1,45$ mg QE.g⁻¹ e água $11,53 \pm 1,90$ mg QE.g⁻¹. Os solventes apolares tiveram melhor desempenho extrativo frente às demais polaridades. Extratos de sementes de uva Fetească Neagră (vermelho) e Fetească Regală (branco) avaliados através do sistema reagente Nitrito de sódio (NaNO₂), Nitrato de alumínio Al(NO₃)₃ e Hidróxido de sódio (NaOH) apresentaram valores variando entre 23,38 a 15,27 mg QE.g⁻¹. Assim, diferentes técnicas de quantificação tornam difícil comparar amostras e resultados (POP et al., 2015).

5.1.4 Avaliação microbiológica

Na análise de qualidade microbiológica do bagaço de uva (**Tabela 12**) foram detectadas baixíssimas cargas microbiológicas, portanto, o insumo natural foi considerado seguro do ponto de vista microbiológico e apto ao uso tópico em seres humanos (FARMACOPEIA, 2010). No entanto, é importante salientar a necessidade de futuramente quantificar o teor de resíduos de pesticidas, metais pesados e outras substâncias químicas nocivas que possam estar presentes nas amostras, visto que é uma fruta cultivada e suscetível ao ataque de pragas.

Tabela 12 - Avaliação microbiológica do extrato seco do bagaço de uva

Análise microbiológica	Especificações	Resultado
Contagem total de bactérias aeróbicas	$< 100 \text{ UFC.g}^{-1}$	$< 10 \text{ UFC.g}^{-1}$ extrato seco
Contagem total de fungos e leveduras	$< 10 \text{ UFC.g}^{-1}$	$< 10 \text{ UFC.g}^{-1}$ extrato seco

5.1.5 Atividade antioxidante do extrato do bagaço de uva.

A atividade antioxidante da solução metanólica do extrato hidroetanólico do bagaço de C. Sauvignon mostra na **Figura 12** diferenças significativas, conforme o meio em que se encontra a amostra de 1 mg.mL^{-1} de extrato seco ($707 \pm 0,03$ a $1098 \pm 0,01 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$). De acordo com Souza e Ferreira (2010), a solubilidade dos polifenóis pode variar dependendo do pH do meio. Desta forma, a atividade antioxidante do extrato seco na concentração de 1 mg.mL^{-1} de extrato seco e nos valores de pH 5 e 7 foi avaliada para verificar se há influência desse fator na resposta antioxidante.

De acordo com Amendola; De Faveri; Spigno (2010) os fenólicos presentes no bagaço de uva reduziram com maior facilidade o DPPH em valores de pH 7 e 9, possivelmente em decorrência a modificações no perfil de ionização. Fawole e Opara (2016) investigando a digestão *in vitro* constataram um aumento na quantidade de polifenóis após a passagem no estômago (pH ácido) e uma diminuição após duodeno (pH alcalino). Isso pode ser explicado por cátions de flavilium em pH ácido mudando em chalcona em pH alcalino e/ou hidrólise

ácida de glicosídeos em agliconas. Eles também notaram que outros autores relataram o mesmo com a concentração de antocianinas.

Figura 12 - Atividade antioxidante do bagaço da C. Sauvignon na concentração de 1 mg.mL^{-1} de extrato seco em dois valores de pH

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Teste t-Student (3 réplicas, $n = 6$): p-valor $< 0,001$ e análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). ** = muito significativo.

Abe et al. (2007) correlacionaram alto poder antioxidante das uvas vermelhas às antocianinas. Burin et al. (2014) associaram ao conteúdo fenólico de C. Sauvignon a elevada resposta antioxidante. Nossos resultados com o bagaço de uva também corroboram esses achados. Xu et al. (2010) avaliando a atividade antioxidante da uva C. Sauvignon encontraram $324,62 \pm 10,30 \mu\text{m de TE.g}^{-1}$ nas sementes e $152,56 \pm 4,87 \mu\text{m de TE.g}^{-1}$ nas cascas.

Diferenças na concentração de polifenóis foi verificado com a uva Carignan (*V. vinifera* L.) antes e pós a primeira fermentação, $135,17$ e $87,13 \mu\text{m TE.g}^{-1}$ (SALAZAR et al., 2014). No presente estudo o resíduo foi obtido após a primeira fermentação e não houve prensagem, o que pode ter beneficiado a retenção dos antioxidantes naturais no bagaço de uva analisado. Ky e Teissedre (2015) obtiveram valores superiores para extratos hidroetanólicos 70% (v/v) das sementes e cascas de uva, $277,59$ a $1685,87 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ e $833,28 \pm 26,37$ a $1749,31 \pm 112,65 \mu\text{m TE.g}^{-1}$, respectivamente. Em outro estudo, os extratos EHEL do bagaço de uva

Vitis vinifera L. também foram significativos contra o radical DPPH, 0,52 a 1,09 $\mu\text{m TE.g}^{-1}$ (TOURNOUR et al., 2015).

5.1.6 HPLC e ESI - MS/MS

O conteúdo de fenólicos majoritários foi identificado por espectrometria de massa (ESI-MS/MS) no modo positivo, no qual detectou dímeros e trímeros de procianidinas (Tr 29-41,5 minutos), como pode ser observado no Apêndice A (**Figura 1 a 13**) e treze compostos de três grupos fenólicos, designadamente um di-hidroflavonol - Apêndice A (**Figura 14 e 13**), cinco flavonóis - Apêndice A (**Figura 16 e 24 a 27**) e sete antocianinas - Apêndice A (**Figura 22, 23 e 28 a 39**) como mostramos no cromatograma de íons (**Figura 13 e Tabela 13**).

Figura 13 - Cromatograma do pico base (BPC) em modo positivo do extrato seco de *Vitis vinifera* L. com procianidinas (dímero e trímero) e flavonoides identificados

Fonte: elaborado pela autora.

O espectro de massa dos picos entre 29,9-41,5 minutos mostra os *dímeros de procianidinas* dos tipos B (com íon molecular em m/z 579), o *trímero* (com íon molecular em m/z 867,38) e os íons fragmentos com padrões de fragmentação MS^1 e MS^2 bem conhecidos pelos Mecanismos retro-Diels-Alder (RDA), fissão do anel heterocíclico (HRF), fissão de benzofurano (BFF) e clivagem de quinona metínica (QM) (FLAMINI, 2013; GU et al., 2003; LI; DEINZER, 2007).

A análise do espectro (+)-ESI-MS do pico em 55,8 minutos mostra o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 451 (*di-hidroquercetina-O-ramnose*), sugerindo que o peso molecular é 450. MS^2 no íon m/z 451,1 produziu vários íons fragmentados em m/z 415,19 e 305,6. O íon fragmento em m/z 415,19 foi formado pelas perdas de duas moléculas de água $[M+H-2H_2O]^+$ e o íon m/z 305,06 foi produzido pela perda de uma porção neutra da ramnose $[M+H-Rham]^+$ (XU, et al., 2011; ZHENG et al., 2013).

O pico em 55,9 minutos mostra o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 479,20 (*quercetina-O-glicuronídeo*), sugerindo que o peso molecular é 478. Espectro MS^2 do íon m/z 479,20 produziu íon fragmento em m/z 303,10. O íon fragmento em m/z 303,10 foi formado pela perda da molécula de ácido glucurônico $[M+H-Gluc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 59,3 minutos mostra o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 611,28 (*rutina*), sugerindo que o peso molecular é 610. Espectro MS^2 do íon m/z 611,28 produziu dois íons fragmentos em m/z 465,25 e 303,10. O íon fragmento em m/z 465,25 foi formado pela perda de molécula neutra de ramnose $[M+H-Rham]^+$ e o íon m/z 303,10 foi produzido pela perda dos açúcares neutros ramnose e glicose $[M+H-Rham-Glc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 59,6 minutos mostra o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 465,21 (*quercetina-3-glicosídeo*), sugerindo que o peso molecular é 464. Espectro MS^2 do íon m/z 465,21 produziu íon fragmento em m/z 303,7 (*quercetina-3-glicosídeo*). O íon fragmento em m/z 303,7 foi formado pela perda da molécula neutra de glicose $[M+H-Glc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010; FLAMINI, 2013).

O pico em 59,7 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 561,14 (*malvidina-3-O-glicosídeo piruvato*), sugerindo que o peso molecular é de 560. O espectro MS^2 do íon m/z 561,14 produziu o íon fragmento em m/z 399,21. O íon fragmento em m/z 399,21 foi formado pela perda de uma molécula neutra de glicose $[M+H-Glc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 61,2 minutos mostra o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 463,25 (*Canferol-3-glicuronídeo*), sugerindo que o peso molecular é 452. Espectro MS^2 do íon m/z 463,25 produziu íon fragmento em m/z 287,09. O íon fragmento em m/z 287,09 foi formado pela perda de uma molécula neutra do ácido glucurônico $[M+H-Gluc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010; FLAMINI, 2013).

O pico 63,4 minutos mostra o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 303,15 (*quercetina*), sugerindo que o peso molecular é 302. O espectro MS^2 do íon m/z 303,15 produziu o íon fragmento em m/z 257,03. O íon fragmento em m/z 257,03 foi formado pelas perdas de

duas moléculas neutras de água e monóxido de carbono $[M+H-H_2O-CO]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010; FLAMINI, 2013).

O pico em 64,4 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 479,22 (*petunidina-3-O-glicosídeo*), sugerindo que o peso molecular é 378. Espectro MS^2 do íon m/z 479,22 produziu íon fragmento em m/z 317,15. O íon fragmento em m/z 317,15 foi formado pela perda de uma molécula neutra de glicose $[M+H-Glc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 64,6 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 531,18 (*peonidina-3-O-glicosídeo piruvato*), sugerindo que o peso molecular é 530. Espectro MS^2 do íon m/z 531,18 produziu íon fragmento em m/z 369,15 (*peonidina-3-O-glucosídeo piruvato*). O íon fragmento em m/z 369,15 foi formado pela perda de uma molécula neutra de glicose $[M+H-Glc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 65,3 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 493,22 (*malvidina-3-O-glicosídeo*), sugerindo que o peso molecular é 492. Espectro MS^2 do íon m/z 493,22 produziu íon fragmento em m/z 331,16 (*malvidina-3-O-glicosídeo*). O íon fragmento em m/z 331,16 foi formado pela perda de uma molécula neutra de glicose $[M+H-Glc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 67 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 679,33 (*ácido delfinidina-3-O-(6''-O-p-cumaril) glicosídeo-pirúvico*), sugerindo que o peso molecular é 678. Espectro MS^2 do m/z 679,33 produziu dois íons de fragmentos em m/z 661,19 e 585,31 (*ácido delfinidina-3-O-(6''-O-cumaril) glicosídeo-pirúvico*). O íon fragmento em m/z 661,19 foi formado pela perda de uma molécula neutra de água $[M + H-H_2O]^+$ e o íon m/z 585,31 foi produzido pela perda de uma molécula neutra de fenol $[M+H-C_6H_6O]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 76,1 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 535,27 (*malvidina-3-(6''-O-acetilglicosídeo)*), sugerindo que o peso molecular é 534. O espectro MS^2 do íon m/z 535,27 produziu dois fragmentos de íons em m/z 517,42 e 331,18 (*malvidina-3-(6''-O-acetilglicosídeo)*). O íon fragmento em m/z 517,42 foi formado pelas perdas de duas moléculas de água $[M + H-2H_2O]^+$ e o íon m/z 331,18 foi produzido pela perda de uma porção neutra do acetil-glicose $[M+H-AcetilGlc]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

O pico em 81,1 minutos mostra o íon molecular $[M]^+$ em m/z 655,32 (*malvidina-3-(6''-O-cafeoilglicosídeo)*), sugerindo que o peso molecular é 654. Espectro MS^2 do íon m/z 655,32 produziu dois fragmentos de íons em m/z 636,75 e 331,17 (*malvidin-3-(6''-O-cafeoilglicosídeo)*). O íon fragmento em m/z 636,75 foi formado pela perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$ e o íon m/z 331,17 foi produzido pela perda de

uma fração neutra de ácido cafeico glicosilado $[M+H\text{-cafeicoGlc}]^+$ (FLAMINI; TRALDI, 2010).

Tabela 13 - Dados do espectro de massa em modo positivo para compostos fenólicos identificados na *Vitis vinifera* L.

Pico	R _T (min)	[M+H] ⁺	MS ²	Fórmula	Pico Identificado
1	29,9	579,26	561,34, 427,23, 291,10, 247,05	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidinas diméricas
2	31,6	579,26	543,33, 291,10, 200,88		
3	33,7	579,25	561,19, 291,11, 246,98		
4	37,9	579,28	561,35, 427,22, 291,14		
5	41,5	579,30	561,33, 409,23, 247,02, 164,98		
6		867,38	697,34, 409,25, 289,15	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Procianidinas triméricas
7	55,8	451	415,19, 305,06	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	Di-hidroquercetina- <i>O</i> -rhamnose
8	55,9	479,20	303,10	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Quercetina- <i>O</i> -glicuronídeo
9	59,3	611,28	465,25, 303,10	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina
10	59,6	465,21	303,07	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo
11	59,7	561,14	399,21	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₄	Malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo piruvato
12	61,2	463,25	287,09	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Canferol-3- <i>O</i> -glicuronídeo
13	63,4	303,15	303,08, 257,03	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina
14	64,4	479,22	317,15	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	Petunidina-3- <i>O</i> -glicosídeo
15	64,6	531,18	369,15	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃	Peonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo piruvato
16	65,3	493,22	331,16	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	Malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo
17	67	679,33	661,69, 585,31	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -p-cumaril)glicosídeo piruvato
18	76,1	535,27	517,42, 331,18	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	Malvidina-3-(6''- <i>O</i> -acetilglicosídeo)
19	81,1	655,32	636,75, 331,17	C ₃₃ H ₂₇ O ₁₆	Malvidina-3-(6''- <i>O</i> -cafeoilglicosídeo)

R_T : Tempo de retenção.

5.2 Formulações (F1 - F2)

5.2.1 Caracterização física e físico-química

Seis formulações foram analisadas de um total de doze por apresentarem melhor desempenho de estabilidade. A avaliação das características organolépticas (cor, odor e aspecto) (**Tabela 14**) foi realizada 24 horas após preparo, a fim de detectar separação de fases, precipitação, homogeneidade e solubilidade do extrato seco. Adicionalmente, as características físico-químicas das formulações contendo bagaço de uva foram monitoradas pelo valor do pH (ANVISA, 2004).

F1 e **F2** se comportaram aparentemente estáveis, com aspecto homogêneo e odor característico dos filtros solares utilizados. Todas as amostras apresentaram coloração amarelo claro, sendo atribuído à presença do filtro solar avobenzona. **F3** e **F4** apresentaram-se macroscopicamente estáveis, com aspecto homogêneo e odor característico de uva. A coloração observada foi vinho, se intensificando com a diminuição do valor de pH, possivelmente devido à maior estabilidade das antocianinas presentes no bagaço em meio mais ácido (GARRIDO; BORGES, 2013; MONTEALEGRE et al., 2006; TEXEIRA et al., 2014). Amendola; De Faveri; Spigno (2010) também observaram melhora na estabilidade dos extratos do bagaço de uva em meio ácido. Em outro estudo, a intensificação do avermelhado em pH 1 e 2 foi pela influência do núcleo cátion flavínico (OLDONI, 2011). **F5** foi aparentemente estável, com aspecto homogêneo e odor característico de uva. A cor verificada nessas formulações foi roxa, intensificando com a redução de valor do pH. Houve aumento na consistência das amostras, parâmetro geralmente relacionado à estabilidade física do sistema (ANVISA, 2004). Em virtude das alterações organolépticas leve a moderado observadas na superfície da amostra **F6**, sugerindo sinal de separação de fases ou indícios de instabilidade, possivelmente a concentração do copolímero foi insuficiente e/ou teor de NaOH acima do aceitável para manutenção da estabilidade físico-química dos componentes (PRESTES et al., 2009)

As formulações com extrato do bagaço de uva em meio levemente ácido, pH entre 5,08 e 5,40, apresentaram maior compatibilidade e estabilidade com o copolímero e demais adjuvantes da composição comparado às formulações levemente alcalinas, pH entre 7,04 e 7,58. Portanto, dada a estabilidade das amostras, a biocompatibilidade da pele ser por volta de 5,4 e as atividades antioxidante e fotoprotetora das formulações terem sido superiores em pH 5, selecionou-se trabalhar neste valor de pH nas formulações do DoE, por conseguinte, nos fotoprotetores testados em seres humanos.

Tabela 14 - Características organolépticas (aspectos, cor e odor) e físico-químicas das formulações (F1 - F6) após 24 horas de preparo

Formulação		Características organolépticas			Valor do pH
		Aspecto	Cor	Odor	
I		Homogênea e consistência normal	Amarelo	Característico	5,08
	Homogênea e consistência normal	Amarelo	Característico	7,58
II		Homogênea e consistência normal	Vinho	Característico	5,20
	Homogênea e consistência levemente diminuída	Roxo escuro	Característico	7,04

Continua

					Conclusão
Formulação	Características organolépticas			Valor do pH	do
	Aspecto	Cor	Odor		
III	<div>F5</div>	Homogênea e consistência levemente aumentada	Roxo	Característico	5,40
	<div>F6</div>	Heterogênea e consistência normal	Roxo amarronzado	Característico	7,20

Legenda: I - Base + filtros UVA e UVB (25%); II - Base + bagaço de uva (BU 10%); III - Base + filtros UV (25%) + BU (10%).

5.2.2 Atividade antioxidante das formulações (F1 – F6)

As formulações apresentaram diferenças no potencial antioxidante intra e inter amostras, como ilustra a **Figura 14**. De acordo com Souza e Ferreira (2010), flavonoides e antocianinas contribuem para uma melhor capacidade antioxidante. Esta afirmação foi confirmada pelos fenólicos identificados por espectrometria de massas (ESI-MS/MS), o teor de fenólicos totais e de flavonoides quantificados por espectrofotometria UV/VIS e os valores da atividade antioxidante em equivalente de Trolox[®] (TE), encontrados nas preparações contendo bagaço de uva em pH 5 e 7, respectivamente: **II** - $590,12 \pm 0,01 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ e $424,51 \pm 0,32 \mu\text{mg TE.g}^{-1}$; **III** - $550,88 \pm 0,00 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ e $429,66 \pm 0,10 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$.

Figura 14 - Atividade antioxidante de formulações contendo extrato de bagaço de C. Sauvignon em dois valores de pH diferentes

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: **I** - Base + filtros UVA e UVB (BMDM: butilmetoxidibenzoilmetano 5% p/p; EHMC: etil-hexilmetoxicinamato 10% p/v e EHDP: etil-hexildimetil PABA 10% p/v); **II** - Base + extracto (bagaço de uva – BU, 10% p/p); **III** - Base + filtros UV três (25% p/p) + BU (10% p/p). Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA 2-fatores (3 réplicas, n = 18): pH (p-valor < 0,001), concentração (p-valor < 0,0001), e interação (p-valor < 0,0001). Teste post hoc Sidak.

** = muito significante, e ns = não significante.

Rockenbach et al. (2007; 2011) encontraram um alto poder antioxidante nas amostras de bagaço *Vitis vinifera* L. como o Pinot Noir $450,00 \pm 14 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$, Regente $439,00 \pm 18 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$, Cabernet Sauvignon $505,52 \pm 4,62 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ e Merlot $328,39 \pm 3,15 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo com extrato seco do bagaço de uva C. Sauvignon em formulações cosméticas. Por outro lado, os bagaços de uvas Couderc 13

(híbridos americanos) e Pinot gris (*V. vinifera* L.) provenientes da produção de vinho branco revelaram diferenças significativas de $116,02 \pm 3,23$ a $220,44 \pm 4,03 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ e $369,23 \pm 4,21$ a $483,31 \pm 4,65 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$, respectivamente. Essa disparidade no poder antioxidante entre as espécies pode estar relacionada ao alto teor de fenólicos das viníferas (CATANEO et al., 2008), como a presença de antocianinas no exocarpo da cultivar vermelha (NEGRI et al., 2015).

5.2.3 Fator de proteção solar (FPS *in vitro*) e fotoestabilidade

A combinação de filtros é a estratégia farmacotécnica escolhida para a obtenção de um espectro de proteção maior e/ou fotoestabilização da formulação. Como é o caso dos filtros UV butilmetoxidibenzoilmetano que fornece proteção UVA (340-400 nm), porém é fotoinstável e pode sofrer degradação em cerca de 50 - 90% após 60 minutos de exposição UV, etil-hexilmetoxicinamato e etil-hexildimetil PABA que atuam contra a radiação UVB (BALOGH et al., 2011; KAIMAL; ABRAHAM, 2011).

Fotoprotetores são divididos em níveis de proteção UV conforme o valor do FPS: baixa proteção (6,0 - 14,9), moderada proteção (15,0 - 29,9), alta proteção (30,0 - 50,0) e elevadíssima ($\geq 50 < 100$). Um protetor solar de amplo espectro, que protege contra as radiações UVA e UVB apresenta FPS ≥ 15 e o comprimento de onda ≥ 370 nm (ANVISA, 2012).

A resposta do FPS das formulações (F1 - F6) com e sem extrato em diferentes valores de pH e suas correlações é demonstrado na **Figura 15**. Formulações I com a presença de filtros UV e sem extrato obtiveram valores de FPS condizentes com o simulador da Basf que foi 15 (FPS 14,0 e 16,0). F2 foi designada de média proteção e a amostra com melhor capacidade de filtragem da radiação UVA.

No entanto, as formulações II somente com o extrato vegetal não apresentaram resposta mínima de FPS preconizado por órgão regulamentador no Brasil que é 6,0, e, também, os comprimentos de onda das amostras ficaram abaixo do mínimo estabelecido 370 nm. Diferentemente das constatações sugeridas por Stevanato e colaboradores (2014) em que os polifenóis, tais como: resveratrol, quercetina, canferol e ácido cafeico e seus derivados poderiam ser usados em formulações como ingredientes fotoprotetores, não foi o que observamos com o extrato do bagaço em que foram identificadas algumas dessas moléculas. Talvez, a quantidade de fenólicos com capacidade fotoprotetora esteja reduzida na amostra.

No entanto, a dedução que a associação dos compostos fenólicos poderia favorecer o FPS foi confirmada.

As formulações III combinada de filtros e extrato foram mais efetivas na atenuação da radiação UVA e UVB comparado às demais, atingindo FPS superior a 76,0 e comprimento de onda de 380 nm, em meio ácido. Estes resultados são comprovados pelos valores obtidos de fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*. O sinergismo entre as moléculas fenólicas do bagaço de uva e os filtros químicos favoreceu positivamente a potencialização da fotoproteção, corroborando com as premissas feitas por Martincigh e Ollengo (2016).

Figura 15 - Fator de proteção solar *in vitro* das formulações (F1 - F6) contendo extrato de bagaço de C. Sauvignon em dois valores de pH diferentes

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: ANOVA 2-fatores (3 réplicas, n = 18): pH (p-valor < 0,001), concentração (p-valor < 0,001), e interação (p-valor < 0,001). Teste post hoc Sidak. Formulações: I - Base + filtros UVA e UVB (25%); II - Base + bagaço de uva (BU 10%); III - Base + filtros UV (25%) + BU (10%).

** = muito significativo, * = significativo, e ns = não significativo

Por meio dos valores apresentados na **Tabela 15**, foi observado um comportamento FPS dependente de filtros, visto que nas formulações II, sem filtros, mas com extrato, o valor máximo do FPS foi 2,0, sendo o mínimo aceitável FPS 6,0 para atuar como filtro UV em protetores solares. Complementando os dados acima, os comprimentos de onda foram ≤ 370 nm, significando que extrato seco incorporado em gel não protege contra as radiações UVA e UVB.

Tabela 15 - Valores do FPS *in vitro* e do comprimento de onda das formulações (F1 – F6) em dois valores diferentes de pH e tempos de irradiação

Formulações		pH	FPS*			λ onda **		
			T 0	T 1	T 2	T 0	T 1	T 2
I	F1	5,0	14,00 ± 1,70 ^{HI}	7,67 ± 1,53 ^{JKLMN}	6,67 ± 1,53 ^{LMNO}	381,67± 0,60 ^{AB}	380,33 ± 0,58 ^{AB}	380,00 ± 1,00 ^{AB}
	F2	7,6	16,00 ± 1,70 ^{GHI}	7,67 ± 0,58 ^{JKLMN}	6,00 ± 0,00 ^{LMNO}	381,33± 0,60 ^{AB}	379,67 ± 0,58 ^{AB}	379,33 ± 0,58 ^{AB}
II	F3	5,2	1,67 ± 0,58 ^O	1,67 ± 0,58 ^O	1,67 ± 0,58 ^O	360,33± 1,50 ^D	364,67 ± 2,08 ^{CD}	366,00 ± 1,73 ^{CD}
	F4	7,0	2,00 ± 0,00 ^O	2,00 ± 0,00 ^O	2,00 ± 0,00 ^O	365,33± 2,10 ^{CD}	368,67 ± 2,08 ^C	369,00 ± 2,65 ^C
III	F5	5,4	76,67 ± 3,21 ^B	26,33 ± 1,53 ^E	17,33 ± 0,58 ^{FGH}	380,00± 0,00 ^{AB}	377,67 ± 0,58 ^{AB}	376,67 ± 0,58 ^{AB}
	F6	7,2	39,33 ± 2,08 ^D	16,67 ± 1,15 ^{GH}	12,33 ± 0,58 ^{HIJ}	380,33± 0,60 ^{AB}	377,67 ± 0,58 ^{AB}	376,00 ± 1,00 ^B

Legenda: * Fator de proteção solar estimado; ** comprimento de onda (nm); T - tempo de irradiação (horas); I - Base + filtros UVA e UVB (25%); II - Base + bagaço de uva (BU 10%); III - Base + filtros UV (25%) + BU (10%). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n = 3) e de acordo com o teste estatístico ANOVA one-way seguido por Tukey para comparação entre grupos (nível de significância = 0,05).

As formulações **III** associadas de compostos naturais e sintéticos apresentaram os valores mais altos do FPS pré-irradiação (T 0), mas após irradiação UV sofreram considerável fotodegradação, e, conseqüentemente, perda da atividade fotoprotetora (**Figura 16**). No entanto, esses valores permaneceram superiores em F5 - pH 5 (61,51%) e F6 - pH 7 (48,66%) depois de 120 minutos de exposição à radiação comparada às formulações I, somente com filtros.

Figura 16 - Valores de FPS *in vitro* das formulações contendo bagaço de uva após 1 e 2 horas de irradiação

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Formulações III - Base + filtros UV (25% p/p) + bagaço de uva (BU 10% p/p) a pH 5 e pH 7 foram de acordo com o teste estatístico ANOVA two-way (3 réplicas, n = 18), pH (p-valor < 0,001), concentração (p-valor < 0,001) e interação (p-valor < 0,001). Teste post hoc da Sidak.

Ademais, F5 não apresentou diferença nos comprimentos de ondas durante o estudo de fotoestabilidade em relação a F1 e F2. Por estes motivos, o meio levemente ácido e fotoprotetores com e sem extrato do bagaço de uva foram selecionados a seguirem para os protocolos clínicos.

De acordo com o método Diffey (**Tabela 16**), a razão UVA/UVB prediz o nível de proteção contra a radiação UVA *in vitro*. Formulações II foram consideradas de baixa proteção (0,30) frente às formulações I de boa proteção (0,70). As formulações III pré-irradiação alcançaram boa proteção (0,62), mas, após as irradiações, passaram a moderada proteção (0,50 - 0,60) (BABY et al., 2009; VELASCO et al., 2008).

Tabela 16 - Método Diffey de valores UVA/UVB

Razão UVA/UVB	Proteção UVA
0,00 - 0,20	Desconsiderável
0,21 - 0,40	Baixa
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,90	Alta
Acima 0,91	Elevadíssima

Fonte: adaptado de Diffey et al., 2000.

5.3 Formulações (A - H)

5.3.1 Caracterização física e físico-química

Devido a problemas de estabilidade, separação de fase, três pontos do DoE (2 fatoriais C e D; 1 axial H) não puderam ser estudados. Na **Figura 17** as formulações (A - H) foram analisadas conforme o **item 4.2.2.1**, com o objetivo de obter formulações macroscopicamente homogêneas, com sensorial adequado, de acordo com o pesquisador, e biocompatíveis com a pele (ANVISA, 2004).

Figura 17 - Caracterização física e físico-química das formulações (A - H) após 24 horas de preparo

Fonte: imagem arquivo da autora.

Na **Tabela 17** não foram observadas modificações organolépticas em sete formulações. A aparência foi homogênea e os odores característicos dos filtros solares e do bagaço de uva. As colorações das amostras variaram do amarelo claro, cor original da avobenzona, ao vinho, cor intensa relacionada aos pigmentos naturais de antocianinas da casca das uvas tinta de viníferas em meio ácido (MONTEALEGRE et al., 2006; GARRIDO; BORGES, 2013; TEXEIRA et al., 2014). Verificou-se aumento na consistência da formulação D, característica física ligada à estabilidade do sistema emulsionado levemente ácido (AMENDOLA et al., 2010; ANVISA, 2004).

Tabela 17 - Resultados de caracterização física e físico-química das formulações (A - H) após 24 horas de preparo

Formulação	Concentração total (% p/p)		Características organolépticas			
	Filtros UV*	BU**	Aspecto***	Cor	Odor	pH
A	3,37	1,46	N	Roxo claro	Característico	5,40
B	3,37	8,54	N	Vinho	Característico	5,46
C	11,50	0,00	N	Amarelo	Característico	5,40
D	11,50	10,00	LA	Roxo escuro	Característico	5,49
E	0,00	5,00	N	Vinho	Característico	5,46
F	11,50	5,00	N	Roxo	Característico	5,51
G	11,50	5,00	N	Roxo	Característico	5,45
H	11,50	5,00	N	Roxo	Característico	5,38

Legenda: *etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano; ** Bagaço de uva; ***N: Homogênea e Consistência normal e LA: Homogênea e consistência levemente aumentada.

5.3.2 Estudo de estabilidade preliminar

Instabilidades físicas e físico-químicas das formulações foram avaliadas por meio do Teste de Centrifugação, seguido pelo Teste de Estresse Térmico (**Figura 18** e **Tabela 18**), após 24 horas de preparo.

Figura 18 - Formulações (A - H) com e sem bagaço de uva avaliadas após os testes de centrifugação (30 minutos) e estresse térmico (40 a 80 °C)

Fonte: imagem arquivo da autora.

Aparentemente as formulações se mostraram estáveis durante o estudo de estabilidade preliminar, não apresentando sinais de formação de precipitados, separação de fases, mudança de cor e odor. No entanto, houve instabilidade físico-química entre os componentes naturais e sintéticos das formulações com aumento do valor de pH (A) e redução desse parâmetro (B - H).

Tabela 18 - Análise da estabilidade preliminar das formulações (A - H), com e sem bagaço de uva, por meio das características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valor de pH

Formulação	Concentração total (% p/p)		Estabilidade preliminar		pH
	Filtros UV*	Extrato seco	Centrifugação	Estresse térmico	
A	3,37	1,46	Normal	Normal	5,47 ± 0,09
B	3,37	8,54	Normal	Normal	5,25 ± 0,59
C	11,50	0,00	Normal	Normal	5,08 ± 0,57
D	11,50	10,00	Normal	Normal	4,87 ± 0,08
E	0,00	5,00	Normal	Normal	5,22 ± 0,03
F	11,50	5,00	Normal	Normal	5,13 ± 0,05
G	11,50	5,00	Normal	Normal	5,20 ± 0,04
H	11,50	5,00	Normal	Normal	5,12 ± 0,13

Legenda: * etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano.

O aquecimento acelera modificações na cor das antocianinas, podendo torná-las amarronzadas ou de coloração menos intensa dependendo das reações químicas, incluindo deglicosilação, abertura do cátion flavilium, deslocamento para a forma chalcona e formação de fragmentos de C6-C3-C6. O tratamento térmico adequado pode facilitar a polimerização das antocininas e aumentar a manutenção da cor (RIMAC-BRNCICL et al., 2015). A estabilidade das formulações contendo extrato do bagaço de uva pode ser explicada pelas diferentes moléculas de antocianinas e açúcares identificados, bem como o meio levemente ácido e a presença do antioxidante sintético BHT (LOPES et al., 2007). Porém, um período insuficiente de exposição ao calor das antocianinas pode não ter evidenciado degradações das antocianinas.

Estudo com extratos do bagaço de uva Isabel (5 e 10%) incorporados a emulsões, assim como sementes (10%) acondicionadas em gel, não apresentaram alterações na cor e no odor após o preparo das amostras, mas a partir de 15 dias de armazenamento o gel sofreu leve modificação do odor, sugerindo desestabilização do sistema polimérico (SOUZA; FERREIRA, 2010).

5.3.3 Avaliação microbiológica

A análise microbiológica das formulações fotoprotetoras C e D (**Tabela 19**) detectou baixíssima carga microbiológica nas amostras e, portanto, seguras para serem aplicados topicamente na pele de voluntários.

Tabela 19 - Avaliação microbiológica das formulações fotoprotetoras (C e D) utilizadas nos ensaios clínicos

Análise microbiológica	Especificações	Resultados	
		C	D
Contagem total de bactérias aeróbicas	< 100 UFC.g ⁻¹	< 10 UFC.g ⁻¹	< 10 UFC.g ⁻¹
Contagem total de fungos e leveduras	< 10 UFC.g ⁻¹	< 10 UFC.g ⁻¹	< 10 UFC.g ⁻¹

5.3.4 Delineamento Experimental (DoE)

Os modelos de regressão ajustados permitiram prever a influência de variáveis independentes: concentração de filtros solares (X1), concentração de extrato (X2) e o tempo de irradiação (X3) nas curvas de superfície de respostas do Fator de proteção solar (Y1), Atividade antioxidante (Y2), Comprimento de onda crítico (Y3), Proteção UVA (Y4), Proteção UVB (Y5) e Razão UVA/UVB (Y6). Três pontos do desenho fatorial foram excluídos do estudo devido à problemas de estabilidade (2 fatoriais e 1 axial).

5.3.4.1 Atividade antioxidante das formulações (A - H)

Resposta de superfície da atividade antioxidante mostrou relação inversamente proporcional entre as concentrações de filtros e extratos (p-valor 0,128). O aumento na concentração de extrato potencializou o efeito antioxidante das formulações (p-valor 0,010); no entanto, um aumento na concentração de filtros totais resultou em diminuição deste parâmetro (p-valor 0,021) (**Figura 19**).

Figura 19- Superfície de resposta 3D da atividade antioxidante - DPPH (Y2) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1) e concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2)

Fonte: elaborado pela autora.

Para a atividade antioxidante das formulações usando o padrão Trolox e o coeficiente de regressão ($R^2 = 0,9986$) indicaram que os melhores resultados de inibição do DPPH foram observados nas formulações B ($545,53 \pm 0,01 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ extrato) e D ($519,92 \pm 0,00 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ extrato) com mais altos teores de extrato do bagaço de uva 8,54% e 10,0%, respectivamente. O poder antioxidante da formulação D foi 69,50% superior em comparação à amostra C ($64,92 \pm 0,00$), ausente de extrato vegetal e com a mesma concentração de filtros. Comparando a resposta antioxidante das formulações (F1 - F6) e (A - H) podemos inferir que a atividade antioxidante dos filtros UV é mínima, que a capacidade de reduzir DPPH está nos compostos bioativos do bagaço de uva e demais insumos farmacêuticos, principalmente no BHT.

Por estes motivos, antioxidantes naturais, como taninos, antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos presentes em extratos de plantas são muito utilizados como aditivos em alimentos, bebidas, medicamentos e cosméticos para sequestrar radicais livres e assim evitar a oxidação dos produtos (BAKHSHABADIA et al., 2017; BOUDET, 2007; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos depende de sua estrutura química (posição e número de grupos hidroxila (OH), grupos substituintes e anel fenil) para atuarem eficientemente na supressão do oxigênio singlete, quelantes de metais e inativação de biomoléculas (BAKHSHABADIA et al., 2017; XU et al., 2016). O flavonoide quercetina atua em sinergismo com antioxidantes da pele contra danos induzidos pelas radiações UVA e UVB (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013).

Napagoda et al. (2016), estudando diferentes extratos observaram relação entre propriedades antioxidantes de determinadas substâncias e os valores elevados de FPS. Em nosso trabalho, diferentemente, foi verificado aumento do fator de proteção em função da concentração dos filtros UV, haja vista que a formulação com maior atividade antioxidante foi a que obteve um dos menores valores de FPS, no entanto, a potencialização desse fator foi correlacionada com o aumento no teor de extrato. Contudo, foi verificada interação negativa entre o conteúdo fenólico do bagaço e os três filtros com redução de cerca 20% no valor da atividade antioxidante, quando os ativos sintéticos foram incorporados nas formulações com 5% de extrato, como descrito na **Tabela 20**.

Tabela 20 - Atividade antioxidante das formulações (A - H) em % de inibição e em Trolox®

Formulações	Concentração total (% p/p)		% inibição DPPH**	Trolox® µmol/g
	Filtros UV*	Bagaço de uva		
A	3,37	1,46	26,88 ± 0,02	306,76 ± 0,02
B	3,37	8,54	41,68 ± 0,01	545,53 ± 0,01
C	11,50	0,00	12,20 ± 0,00	64,92 ± 0,00
D	11,50	10,00	40,10 ± 0,00	519,92 ± 0,00
E	0,00	5,00	36,99 ± 0,00	469,30 ± 0,00
F	11,50	5,00	32,64 ± 0,00	398,22 ± 0,00
G	11,50	5,00	30,79 ± 0,01	368,05 ± 0,01
H	11,50	5,00	30,02 ± 0,01	355,59 ± 0,01

Legenda: *etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano; **Atividade antioxidante. Resultados da atividade antioxidante expressos como média ± desvio padrão (n = 3) e análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% (p < 0,05).

5.3.4.2 Fator de proteção solar (FPS *in vitro*) e Fotoestabilidade

Os resultados de superfície de resposta representados na **Figura 20** evidenciam aumento no valor do FPS *in vitro* com elevação das concentrações de filtros solares e extrato (p-valor 0,000 e 0,005, respectivamente), enquanto que o tempo de exposição à radiação UV proporcionou redução nesta resposta (p-valor 0,000), provavelmente, devido à fotodegradação dos compostos ativos presentes nas amostras.

O melhor valor de FPS foi observado na formulação D (FPS pré-irradiação 16,33) com 10% de extrato do bagaço de uva. As formulações A e B com 3,37% de filtros cada, mas com percentuais diferentes de extrato, 1,46% e a 8,54%, respectivamente, apresentaram a mesma capacidade fotoprotetora, significando redução de 82,90% de filtros sintéticos na formulação para a obtenção do mesmo nível de proteção.

Figura 20 - Superfície de resposta 3D do fator de proteção solar (Y1) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)

Fonte: elaborado pela autora.

A qualidade da proteção solar está associada à estabilidade do produto. Nesta pesquisa, observou-se alta fotoinstabilidade das formulações na presença de compostos fenólicos de bagaço de uva expostos por 2 horas à luz UV artificial. A eficácia das amostras pode ter sido comprometida pela formação de fotoprodutos a partir de interações da radiação UV com os filtros e/ou cromóforos presente na pele, estimulando a produção de espécies reativas (PARIS et al., 2009).

A estabilização da avobenzona, filtro UVA (PARIS et al., 2009), não ocorre linearmente e, depende da concentração do antioxidante. O tempo de irradiação UV interfere notoriamente na estabilidade das amostras, diminuindo o FPS (AFONSO et al., 2014). Antioxidantes naturais como o flavonoide rutina (quercetina-3-rutinosídeo) podem melhorar a estabilidade de filtros UVA (OLIVEIRA et al., 2015).

5.3.4.3 Comprimento de onda crítico

O parâmetro comprimento de onda crítico também é usado para medir a proteção UVA, e deve ser superior a 370 nm (COSMETICS EUROPE, 2011). Neste estudo, os valores críticos de comprimento de onda pré e pós-irradiação foram acima de 370 nm ($C_{0h} = 381$ nm e $C_{2h} = 375$ nm; $D_{0h} = 379$ nm e $D_{2h} = 376$ nm). Os gráficos de resposta de superfície na **Figura 21** mostraram que a concentração de extratos, protetores solares e tempo de radiação teve impacto significativo no comprimento de onda crítico das formulações (p-valores 0,174; 0,000 e 0,0002, respectivamente).

Figura 21 - Superfície de resposta do comprimento de onda crítico - nm (Y3) como função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)

Fonte: elaborado pela autora.

Os filtros e o extrato mostraram diminuição no comprimento de onda à medida que a concentração dessas variáveis diminuiu (p-valor 0,035), no entanto, a proporção entre concentração de filtros e tempo de radiação não teve efeito significativo no comprimento de

onda. O modelo quadrático possibilitou incluir pontos centrais na construção da curvatura máxima de resposta em função da concentração de filtros. Além disso, o extrato em relação ao tempo de exposição foi inversamente proporcional, indicando diminuição na resposta à medida que o tempo aumentou (p-valor 0,048).

5.3.4.4 Proteção UVA

Por meio de gráficos de resposta de superfície, representados na **Figura 22**, observou-se diminuição na transmitância da radiação UV com aumentado da concentração de extrato, consequentemente, maior proteção UVA das amostras contendo composto bioativo (p-valores 0,009 e 0,000, respectivamente). Enquanto a resposta em função do tempo de exposição houve aumento na transmitância e diminuição na capacidade de absorver a radiação UVA.

Figura 22 - Superfície de resposta 3D da proteção UVA (Y4) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)

Fonte: elaborado pela autora.

Os menores percentuais de transmitância UVA (21,26 - 35,43%) foram constatados nas amostras com a concentração máxima de filtros solares (C, D, F, G e H) e as maiores

transmitâncias (42,04 - 95,59%) na ausência ou em concentrações baixas de filtros (G, B e A). Isto demonstrou que os filtros UV foram essenciais na proteção UVA, principalmente a atuação do filtro UVA butylmethoxydibenzoylmethane que absorve a radiação no intervalo de 320 – 400 nm (SHAATH, 2010; SILVA et al., 2015). Todavia, o uso de extrato intensificou a proteção UVA *in vitro* em 14,17%. Pesquisa com o princípio ativo isolado rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) mostrou queda na transmissão da radiação UVA (CHOQUENET et al., 2008).

5.3.4.5 Proteção UVB

A avaliação gráfica da **Figura 23** revela impacto positivo na resposta de proteção UVB com a associação de filtros e extrato seco (p-valores 0,000 e 0,014, respectivamente).

Figura 23 - Superfície de resposta 3D da proteção UVB (Y5) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1), concentração de extrato do bagaço de uva 0-10% p/p (X2) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)

Fonte: elaborado pela autora.

Uma concentração máxima de filtros e de bagaço de uva proporcionou a menor transmissão de radiação UVB através de formulações, devido à capacidade de absorção de filtros UVB etil-hexilmetoxicinamato na faixa de 320 a 290 nm (HERZOG; GIESINGER; SCHNYDER, 2013; BALOGH et al., 2011) e o etil-hexildimetil PABA no comprimento de onda 315 - 290 nm (BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008; SILVA et al., 2015). Além disso, ocorreu alta transmitância espectral de radiação UVB após a irradiação e com a redução da concentração de compostos naturais e sintéticos (p-valor 0,079), possivelmente devido às fotodegradações dos componentes filtrantes por espécies reativas.

Os filtros químicos foram fundamentais na proteção anti-UVB, entretanto, a adição do extrato vegetal melhorou o desempenho deste fator. A formulação D obteve a resposta mais significativa contra a radiação UVB *in vitro*, transmitância de 5,44%, comparado à formulação C sem extrato, 19,67% de transmitância, representando potencialização na absorção dos feixes de luz UVB de 14,23% quando extrato de bagaço de uva foi adicionado na composição.

5.3.4.6 Razão UVA/UVB

A superfície de resposta da **Figura 24** evidenciou diminuição da relação UVA/UVB com a redução da concentração de filtros UV (p-valor 0,000), bem como, a concentração do extrato não teve influência sobre este parâmetro. A formulação G comprovou a necessidade de usar filtros solares em protetores solares para alcançar valor de razão UVA/UVB preconizado pelas agências regulatórias em produtos cosméticos.

Figura 24 - Superfície de resposta 3D da razão UVA/UVB (Y6) em função da concentração de filtros solares: etil-hexilmetoxicinamato, etil-hexildimetil PABA e butilmetoxidibenzoilmetano 0-12% p/p (X1) e tempo de irradiação 1-2 horas (X3)

Fonte: elaborado pela autora.

Segundo o método Diffey (Tabela 16), as melhores respostas para razão UVA/UVB foram verificadas na formulação C (0,67), considerada de boa proteção, seguido das formulações com 5% extrato F, G e H (média de 0,65), também de boa proteção e 10% extrato D (0,59), moderada proteção pré-irradiação. No entanto, após 2 horas de exposição UV, a média das razões das formulações contendo 5% bagaço foram 5,26% superior à amostra C (0,54).

De acordo com os resultados da ANOVA para a equação de regressão (**Tabela 21** e **Tabela 22**), os modelos estatísticos selecionados foram ajustados para otimizar as variáveis independentes e confirmar a correlação entre os valores experimentais e os previstos através dos elevados valores de coeficientes de resposta (0,8295 a 0,9907).

Tabela 21 - ANOVA para a regressão da superfície de resposta do fator de proteção solar (Y1), atividade antioxidante - DPPH (Y2), comprimento de onda crítico (Y3), proteção UVA (Y4), proteção UVB (Y5) e relação UVA/UVB (Y6) C da concentração de filtros solares (X1), concentração de extrato (X2) e tempo de irradiação (X3)

Fonte	Y1			Y2			Y3			Y4			Y5			Y6		
	Df	SS	P	Df	SS	P	Df	SS	P	Df	SS	P	Df	SS	P	df	SS	P
Regressão Linear	6	10,26	0,000	4	599,9	0,002	6	6150	0,000	6	11710	0,000	7	8358	0,000	3	0,756	0,000
X1	1	0,89	0,000	1	36,7	0,021	1	3016	0,000	1	1645	0,000	1	1665	0,000	1	0,171	0,000
X2	1	0,32	0,005	1	65,2	0,010	1	15	0,174	1	380	0,009	1	209	0,014	1	0,050	0,000
X3	1	0,90	0,000				1	105	0,002	1	541	0,003	1	484	0,001			
Quadrática																		
X1*X1	1	0,39	0,002				1	2146	0,000	1	753	0,001	1	942	0,000	1	0,085	0,000
X2*X2	1	0,07	0,133	1	28,2	0,030				1	183	0,057	1	127	0,048			
X3*X3	1	0,17	0,029							1	103	0,144	1	82	0,106			
Interação																		
X1*X2				1	8,2	0,128	1	39	0,035									
X1*X3																		
X2*X3							1	34	0,048				1	98	0,079			
Erro	17	0,51		3	5,6		17	128		17	44		16	444		20	0,043	
Total	23	10,77		7	605,5		23	6278		23	12456		23	8802		23	0,799	

Legenda: Análise de variância, Df: Graus de liberdade; SS: Soma dos quadrados e P: p-valor

Tabela 22 - Equação de regressão e coeficientes de determinação para a regressão da superfície de resposta do fator de proteção solar (Y1), atividade antioxidante (Y2), comprimento de onda crítico (Y3), proteção UVA (Y4), proteção UVB (Y5) e relação UVA/UVB (Y6) como funções da concentração de filtros solares (X1), concentração de extrato (X2) e tempo de irradiação (X3)

Equação de regressão	R ²	R ² adj	R ² pred
$\ln(Y1) = 0,341 + 0,2817*X1 + 0,1258*X2 - 0,857*X3 - 0,01409*X1*X1 - 0,00579*X2*X2 + 0,1795*X3*X3$	0,9522	0,9354	0,8849
$Y2 = 24,35 - 1,017*X1 + 3,631*X2 - 0,1831*X2*X2 + 0,0861*X1*X2$	0,9907	0,9783	0,8295
$Y3 = 328,35 + 16,112*X1 + 0,722*X2 - 4,91*X3 - 0,9844*X1*X1 - 0,1092*X1*X2 + 0,477*X2*X3$	0,9796	0,9723	0,9361
$Y4 = 96,51 - 12,11*X1 - 4,31*X2 + 20,96*X3 + 0,617*X1*X1 + 0,285*X2*X2 - 4,39*X3*X3$	0,9401	0,9190	0,8581
$Y5 = 68,08 - 12,19*X1 - 3,41*X2 + 21,78*X3 + 0,691*X1*X1 + 0,238*X2*X2 - 3,91*X3*X3 - 0,808*X2*X3$	0,9495	0,9275	0,8681
$Y6 = 0,1409 + 0,1159*X1 - 0,0559*X3 - 0,006207*X1*X1$	0,9459	0,9378	0,9082

Legenda: R²: coeficiente de determinação; R²adj: coeficiente de determinação ajustado e R²pred: Coeficiente de determinação previsto.

5.3.5 Fator de Proteção UVA (FP -UVA)

A **Tabela 23** descreve os resultados obtidos do Fator de Proteção Solar *in vitro* das amostras avaliadas clinicamente. Os resultados do FP-UVA das duas amostras foram superiores a 1/3 à eficácia fotoprotetora declarada em humanos, como pode ser observado no **item 5.4.3**, C = 3,67 e D = 4,33, atestando a capacidade absorvedora da radiação UVA e forneceu uma correlação mais precisa com os resultados clínicos (COSMETICS EUROPE, 2011). Os flavonoides quercetina e canferol, presentes no extrato do bagaço de uva, podem ter contribuído na absorção da radiação na faixa UVA (STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014). Do ponto de vista químico, por se tratar de um extrato vegetal, uma combinação complexa de várias substâncias, não pode afirmar o papel de cada substância no efeito biológico, sem antes isolá-la e testá-la, além do mais, o sinergismo é bastante comum neste tipo de material.

Tabela 23 - Avaliação da proteção UVA das formulações C (sem extrato do bagaço de uva) e D (com extrato do bagaço de uva - 10% p/p)

Formulação	FP-UVA* (in vitro)	Coeficiente de variação	Comprimento de onda crítico (nm)
C	3,67 ± 0,58	0,97	380,52 ± 0,58
D	4,33 ± 0,58	0,80	379,22 ± 0,19

Legenda: *Fator de proteção UVA das formulações C e D foi analisado de acordo com o teste t de Student (uni-caudal) e p-valor = 0,03 (média ± SD, n = 3). Os resultados demonstram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras avaliadas.

5.4 Ensaio Clínico

As formulações fotoprotetoras C e D foram selecionadas a partir dos resultados obtidos do FPS *in vitro* a serem avaliadas clinicamente pelo Teste de Contato (*Patch Test*) quanto à segurança, por meio dos ensaios de irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização e fototoxicidade e fotossensibilização, usando a água como controle negativo e a avaliação da eficácia fotoprotetora, utilizando uma formulação referência da COLIPA como controle positivo.

5.4.1 Teste de irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização

O Teste de Contato Repetitivo em Humanos (*Human Repeat Insult Patch - HRIPT*) é usado para determinar o potencial de irritação e sensibilização de um produto tópico (Kligman; Wooding, 1967). Neste trabalho, os testes HRIPT realizados com as formulações fotoprotetoras contendo extrato hidroalcoólico e testadas em 60 voluntários, não induziram irritabilidade e sensibilização dérmica durante o estudo.

Estudo com o extrato aquoso de *Vitis Vinifera* L. (1%) testado em 108 indivíduos, não causou irritação nem sensibilização, corroborando com os resultados de outra pesquisa que avaliou extrato aquoso de uva (10%), na dose de 0,2 mL em 54 indivíduos e, também, não foi irritante ou sensibilizante. Formulações cosméticas contendo *V. vinifera* L. e avaliadas pelo teste de HRIPTs mostraram que 10% do fruto; 0,1% do suco; 0,5% do extrato do suco e 1% do extrato da semente, não foram irritantes ou sensibilizantes (ESTADOS UNIDOS, 2012).

Teste de contato oclusivo em pele da bochecha humana com emulsão água em óleo (A/O) contendo 2% de extrato de semente de uva *M. Hamburg V. vinifera* L. não provocou nenhum caso de hipersensibilidade (SHARIF et al., 2015). HRIPT com extrato do fruto de *V. vinifera* L. (3% e 6%) não causou irritação e sensibilização cutânea. Outra pesquisa constatou que formulação pós-barba contendo extrato de butilenoglicol e água de semente de uva *V. Vinifera* L. (0,15%), avaliado em 31 voluntários, não foi irritativa a pele (UNITED STATES, 2012).

Produtos contendo 3 - 10% de extratos do fruto de *V. vinifera* L. não desencadearam efeitos de irritação e sensibilização na pele de voluntários. Os cremes desenvolvidos a partir de extratos de semente de uva foram considerados seguros e não irritativos à pele no teste de Burchard (SOTO et al., 2015). Portanto, os estudos clínicos confirmaram a segurança do uso tópico do bagaço de uva C. Sauvignon.

5.4.2 Teste de fototoxicidade e fotossensibilização

O potencial de fotoirritante e fotossensibilizador de protetores solares foi avaliado pelo Teste de Contato Repetitivo em Humanos (*Human Repeat Insult Patch* - HRIPT). A fototoxicidade é um processo inflamatório da pele ativado por exposição à luz, sem base imunológica e sinais clínicos semelhantes às queimaduras solares. A fotossensibilização é um aumento na reatividade da luz UV e dos cromóforos existentes na pele, tem base imunológica e sinais clínicos de alergia, como urticária solar (LEHMANN; SCHWARZ, 2011). Neste ensaio, protetores solares contendo extrato de bagaço de uva não mostraram irritabilidade nem sensibilização dérmica.

Pele tratada com extrato de semente de uva antes da exposição UV mostrou menor quantidade de células p53 mutantes e mais células epidérmicas e Langerhans em comparação com a pele não tratada (YUAN et al., 2012), significando maior proteção do genoma humano contra o fotoenvelhecimento, mutações e câncer de pele (MONTAGNER; COSTA, 2009). Estudo realizado com 22 viticultores evidenciou reação positiva fraca em 6 indivíduos que trabalharam diretamente em parreiras de uva. No entanto, as reações não aumentaram com a irradiação UV e diminuíram em 96 horas (YAMASAKI et al., 1985).

5.4.3 Avaliação da eficácia fotoprotetora

A **Figura 25** descreve que a formulação **D** com extrato de bagaço de uva apresentou aumento de FPS em comparação com aquela sem extrato, de 12,30 a 10,20, respectivamente. As formulações foram consideradas fotoprotetores pelo fato de apresentarem FPS ≥ 6 , mas não de amplo espectro, uma vez que o FPS não foi ≥ 15 (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011).

Figura 25 - Avaliação da eficácia fotoprotetora das formulações C (sem bagaço de uva) e D (com bagaço de uva - 10% p/p)

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Formulação C: Base + filtros UV (11,50% p/p) e D: Base + filtros UV (11,50% p/p) + bagaço de uva (10% p/p). Teste t-Student pareado (n = 10): p-valor = 0,002. * = significativo.

Os flavonoides demonstraram proteger a pele contra os raios UV por meio de suas propriedades antioxidantes e de modulação das proteínas reparadas do DNA (MONTAGNER; COSTA, 2009; SAEWAN; JIMTAISONG, 2013). Os flavonóis quercetina e rutina incorporados combinados em protetores solares cremes na concentração de 10% cada, proporcionaram valores do SPF semelhantes ao homosalato, um filtro UV sintético e quando associados com dióxido de titânio também ofereceram proteção UVA (CHOQUENET et al., 2008). A deficiência eletrônica das antocianinas faz com que sejam eficientes moléculas sequestradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS). Cianidina-3-glicosídeo mostrou

atividade fotoprotetora contra a radiação UVA e UVB em queratinócitos humanos (HaCaT) (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013).

Portanto, tendo em vista a dificuldade de encontrar evidências clínicas de eficácia fotoprotetora do bagaço de uva total de Cabernet Sauvignon em protetor solar, tornou-se difícil estabelecer comparações. No entanto, os objetivos propostos de uso tópico do bagaço de uva em formulações foram alcançados em sua maioria com êxito nas respostas biológicas *in vitro* e clínicas, nos teores de compostos fenólicos, no poder antioxidante e na atividade fotoprotetora UVA e UVB, com exceção da manutenção da estabilidade das formulações frente à radiação UV, necessitando de maiores investigações.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos através da pesquisa leva às seguintes conclusões:

- As substâncias fenólicas identificadas no extrato de *Vitis vinifera* L., incluindo dímeros e trímeros de procianidinas, di-hidroflavonol, flavonóis e antocianinas por HPLC-ESI-MS/MS condizem com a literatura.
- Verificou-se alto teor de fenólicos totais ($141,11 \pm 3,38$ mg GAE.g⁻¹ extrato) no bagaço de uva, ao contrário, do conteúdo de flavonoides ($3,01 \pm 0,14$ mg QE⁻¹ extrato).

Formulações (F1 - F6)

- A alcalinidade do meio foi correlacionada com a diminuição do poder antioxidante e fotoprotetor das amostras e, o meio levemente ácido, ao aumento na consistência.
- **F5** (pH 5) obteve o melhor desempenho fotoprotetor *in vitro* e capacidade de inibição do DPPH, bem como, maior estabilidade do sistema emulsionado, porém não foi fotoestável. Houve potencialização do FPS pelo sinergismo entre os filtros UV e os fenólicos do bagaço de uva.

Formulações (A - H)

- Visualmente não foi observado alterações organolépticas nas formulações; no entanto, redução nos valores de pH foi verificada após o tratamento térmico.
- Constatou-se relação sinérgica entre os ativos da formulação e aumento do valor do FPS e, efeito negativo da irradiação sobre a atividade fotoprotetora.
- As formulações não foram estáveis durante o estudo de fotoestabilidade.
- A melhor combinação eficiência-resposta pelo delineamento experimental (SPF 16) e atividade antioxidante ($519,92 \pm 0,00$ µmol TE.g⁻¹ extrato) foi formulação D com a

associação do extrato hidroetanólico de bagaço de uva (10% p/p) e filtros UV (11,5% p/p), aumentando o valor do FPS *in vitro* em 206,37%.

- As amostras **C** (com extrato) e **D** (sem extrato), por obterem melhor desempenho nas atividades biológicas *in vitro*, também foram avaliadas em seres humanos. Mesmo não tendo comportamento fotoestável, a formulação D apresentou após 2 horas de irradiação UV um FPS 39,93% maior em relação à formulação C no mesmo período.
- Fator de proteção UVA das formulações C e D foram avaliados adequados. No entanto, a formulação D protegeu 15,24% mais contra a radiação UVA que C.
- Nos testes de segurança as formulações C e D foram aprovadas e consideradas seguras no uso tópico.
- A eficácia fotoprotetora clínica da formulação D com extrato seco foi 20,58% superior à formulação C sem extrato.

Em síntese, C e D foram consideradas seguras para uso tópico e D estatisticamente superior tanto na proteção UVA quanto UVB comparado à amostra somente com filtros químicos. Logo, conclui-se com base nos resultados apresentados que o bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*V. vinifera* L.) é um promissor ingrediente sustentável multifuncional útil para o uso em protetor solar. Consequentemente, abre-se um novo nicho no aproveitamento deste subproduto da uva em cosméticos, mercado este que não para de crescer tanto na área da pesquisa como também na área da produção industrial.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABE, L.T.; MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.394-400, 2007.

ACADEMIA DO VINHO. **Elaboração de vinhos tintos**. Disponível em: http://www.academiadovinho.com.br/_ela_tintos.php. Acesso em: 19 abr. 2014.

ADISAKWATTANA, S.; JIPHIMAI, P.; PRUTANOPAJAI, P.; CHANATHONG, B.; SAPWAROBOL, S.; ARIYAPITIPAN, T. Evaluation of alpha-glucosidase, alpha-amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 3, p.295-305, 2010.

AFONSO, S.; HORITA, K.; SILVA, J.P.S.; ALMEIDA, I.F.; AMARAL, M.H.; LOBÃO, P.A.; COSTA, P.C.; MIRANDA, M.S.; SILVA, J.C.G.E.; LOBO, J.M.S. Photodegradation of avobenzene: Stabilization effect of antioxidants. **Jornal Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 36-40, 2014.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução – RDC n. 47, de 16 de março de 2006**. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes. Brasília, 2006. Disponível em: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:07w52Q9Q0QoJ:www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/download/category/126-cosmeticos%3Fdownload%3D992:resolucao-rdc-n-47-2006-lista-de-filtros-ultravioleta-permitidos+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 7 mai. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012. p.34-37.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução – RDC n.69, de 23 de março de 2016**. Regulamento técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2863150/RDC_69_2016_COMP.pdf/5689ac91-e621-45b7-a122-b3163e4b3cc3 Acesso em jul. 2017.

- AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteau reagent. **Nature Protocols**, v.2, n.4, p.875-877, 2007.
- AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D.M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 384-392, 2010.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revistas do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- ATAK, A.; ALTINDISLI, A.; GOKSEL, Z. Phitochemical properties of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) hybrids. **American Journal of Food Technology**, v.6, n.9, p.843-850, 2011.
- BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benthham. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, p.405-412, 2007.
- BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.2, p.233-248, 2008.
- BABY, A.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. UVA I-protection effectiveness of bioactive compound and organic UV filters: an *in vitro* assessment. **Química Nova**, v.32, p.1321-1323, 2009.
- BAKHSHABADIA, H.; MIRZAEIA, H.; GHODSVALIB, A.; JAFARIA, S.M.; ZIAIFARA, A.M.; FARZANEHC, V. The effect of microwave pretreatment on some physic-chemical properties and bioactivity of Black cumin seeds' oil. **Industrial Crops and Products**, v.97, p.1-9, 2017.
- BALOGH, T.S.; VELASCO, M.V.R.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, p.732-742, 2011.
- BARON, E.D.; KIRKLAND, E.B.; DOMINGO, D.S. Advances in photoprotection. **Dermatology Nursing**, v.20, p.265-272, 2008.
- BAVARESCO, L.; PEZZUTTO, S.; GATTI, M.; MATTIVI, F. Role of the variety and same environmental factors on grape stilbenes. **Vitis**, v.46, n.2, p.57-61, 2007.

- BAXTER, R.A. Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.7, n.1, p.2-7, 2008.
- BENEVENUTO, C.G.; DI MATTEO, M.A.S.; CAMPOS, P.M.B.G.M.; GASPAR, L.R. Influence of the photostabilizer in the photoprotective effects of a formulation containing UV-filters and vitamin A. **Photochemistry and Photobiology**, v.86, n.6, p.1390-1396, 2010.
- BESSADA, S.M.F. **Caracterização química e bioatividade de *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: Incorporação em formulações dermocosméticas de baixa toxicidade**. Porto, 2015. 62p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade do Porto.
- BIRCHER, A.J.; DE BOER, E.M.; AGNER, T.; WAHLBERG, J.E. Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry: A report from the standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.30, p.65-72, 1994.
- BONTEMPO, M. **A saúde da água para o vinho**. [S.l.]: Thesaurus, 2012. p.80-82. Disponível em: <http://www.books.google.com.br/books?id=P8mLe1AJCe0C>. Acesso em: 13 abr. 2014.
- BOUDET, A.M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.68, n.22/24, p.2722–2735, 2007.
- BRAHIM, M.; GAMBIER, F.; BROSSE, N. Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. **Industrial Crops and Products**, v.52, p.18-22, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidative activity. **LWT - Food Science and Techonology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução n. 466, de 12 de dezembro de 2012**. A presente Resolução incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, referenciais da bioética, tais como, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, dentre outros, e visa a assegurar os direitos e deveres que dizem respeito aos participantes da pesquisa, à comunidade científica e ao Estado. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>. Acesso em: 18 out. 2016.
- BRENES, A.; VIVEROS, A.; GOÑI, I.; CENTENO, C.; SÁYAGO-AYERDY, S.G.; ARIJA, I.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. **Poultry Science**, v.87, p.307-316, 2008.
- BRENNER, M.; HEARING, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, n.3, p.539-549, 2008.

BROOKE, D.N.; BURNS, J.S.; CROOKES, M.J.E. **UV filters in cosmetics – prioritization for environmental assessment**. Almondsbury: Environment Agency, 2008. p.47. (Using science to create a better place). Disponível em: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/291007/scho1008bpay-e-e.pdf. Acesso em: 23 mai. 2015.

BURIN, V.M.; FERREIRA-LIMA, N.E.; PANCERI, C.P.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v.114, p.155-163, 2014.

CAMARGO, E.E.S. **Diagnóstico dos programas de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, visando subsidiar a distribuição no Sistema Único de Saúde**. Araraquara, 2010. 223p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

CATANEO, C.B.; CALIARI, V.; GONZALO, L.V.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, s/n, p.93-102, 2008.

CAVALCANTE, C.M. An institutional approach to the history of wine in Brazil. In: 39th World Congress of Vine and Wine, Bento Gonçalves, 2016. **BIO Web of Conferences**, v.7, n.3025, 2016.

CHEN, M.; LIU, X.; FAHR, A. Skin delivery of ferulic acid from different vesicular systems. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.6, n.5, p.577-585, 2010.

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

CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: Determination of efficacy by an *in vitro* method. **Journal of Natural Products**, v.71, n.6, p.1117-1118, 2008.

CHOUDHARY, S.; TANG, J.C.; LEIVA, A.; NOURI, K. Photodamage. Part 1. Pathophysiology, clinical manifestations, and photoprotection. **Cosmetic Dermatology**, v.23, n.10, p.460-466, 2010.

COSMETICS EUROPE. COLIPA. Guidelines for the assessment of skin tolerance of potentially irritant cosmetic ingredients. 2004.

COSMETICS EUROPE. COLIPA. Guidelines. **International sun protection factor (SPF) test method**. Auderghem: CTFA SA, JCIA, CTFA, 2006. p.46.

- COSMETICS EUROPE. COLIPA. Guidelines. *In vitro* method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products. 2011.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1117 p. (v.3: Farmacognosia experimental).
- COSTA, C.T; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.4, p.108-116, 2008.
- COTORAS, M.; VIVANCO, H.; MELO, R.; AGUIRRE, M.; SILVA, E.; MENDOZA, L. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. **Molecules**, v.19, n.12, p.21154-21167, 2014.
- CRAIG, B. Sunscreen vs. Photostabilizer. **Cosmetics & Toiletries: Science Applied**, 2008 Disponível em: <http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/category/suncare/10377137.html> Acesso em: 10 out. 2014.
- CRONIN, H.; DRAELOS, Z.D. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.9, n.3, p.218-225, 2010.
- DAMIAN, C.; OLTEANU, A.; OROIAN, M.; LEAHU, A.; ROPCIUC, S. Valorization of grape by-products. **American Journal of Environmental Protection**, v.4, n.3, p.134-138, 2015.
- DEUSCHLE, V.C.K.N.; DEUSCHLE, R.A.N.; BORTOLUZZI, M.R.; ATHAYDE, M.L. Physical chemistry evaluation of stability, spread ability, *in vitro* antioxidant, and photo-protective capacities of topical formulations containing *Calendula officinalis* L. leaf extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.51, n.1, p.63-75, 2015.
- DIFFEY, B.L.; TANNER, P.R.; MATTS, P.J.; NASH, J.F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal American Academy Dermatology**, v.43, n.6, p.1024-1035, 2000.
- DRAELOS, Z.D. **Cosmeceuticals**. 2.ed. [Philadelphia]: Saunders, 2009. cap.12. (Procedures in cosmetic dermatology series). Disponível em: <http://www.books.google.com.br/books?isbn....> Acesso em: 15 abr. 2014.
- DWYER, K.; HOSSEINIAN, F.; ROD, M. The market potential of grape waste alternatives. **Journal of Food Research**, v.3, n.2, p.91-106, 2014.
- EMBRAPA. **Bagaço de uva vira alimentos funcionais**. 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2235712/bagaco-de-uva-vira-alimentos-funcionais>. Acesso em: 12 nov. 2016.

- FALGUERA, V.; IBARZ, A., eds. **Juice processing**: quality, safety and value-added opportunities. [S.l.]: CRC Press, 2014. p.63. (Contemporary Food Engineering). Disponível em: <http://www.books.google.com.br/books?isbn+1466577339>. Acesso em 18 abr. 2014.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Grapes wine**. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/al176e/al176e.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2017.
- FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.448 (Código farmacêutico brasileiro, 2v).
- FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 5.ed. Brasília: Fiocruz, 2010. p.197, 242-252.
- FAWOLE, O.A.; OPARA, U.L. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to *in vitro* digestion. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.16, n.1, p.358, 2016.
- FELHI, S.; BACCOUCH, N.; SALAH, H.B.; SMAOUI, S.; ALLOUCHE, N.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A., Nutritional constituents, phytochemical profiles, *in vitro* antioxidant and antimicrobial properties, and gas chromatography-mass spectrometry analysis of various solvent extracts from grape seeds (*Vitis vinifera* L.). **Food Science and Biotechnology**, v.25, n.6, p.1537-1544, 2016.
- FERREIRA, L.F.D.; PIROZI, M.R.; RAMOS, A.M.; PEREIRA, J.A.M. Modelagem matemática da secagem em camada delgada de bagaço de uva fermentado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.6, p.855-862, 2012.
- FILIP, A.; DAICOVICIU, D.; CLICHICI, S.; MOCAN, T.; MURESAN, A.; POSTESCU, I.D. Photoprotective effects of two natural products on ultraviolet B-induced oxidative stress and apoptosis in SKH-1 mouse skin. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.7/8, p.761-766, 2011.
- FISHER, A.A.; RIETSCHER, R.L.; FOWLER, J.F., eds. **Fisher's contact dermatitis**. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
- FITZPATRICK, T.B. Soleil et peau [Sun and skin]. **Journal de Médecine Esthétique**, v.2, p.33-34, 1975.
- FIUME, M.M.; BERGFELD, W.F.; BELSITO, D.V.; HILL, R.A.; KLAASSEN, C.D.; LIEBLER, D.C.; MARKS, J.G.; SHANK, R.C.; SLAGA, T.J.; SNYDER, P.W.; ANDERSEN, F.A. Safety Assessment of *Vitis vinifera* (Grape) - derived ingredients as used in cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v.33, (suppl.3), p.48S-83S, 2012.
- FIUME, M.M.; BERGFELD, W.F.; BELSITO, D.V.; HILL, R.A.; KLAASSEN, C.D.; LIEBLER, D.C.; MARKS, J.G.; SHANK, R.C.; SLAGA, T.J.; SNYDER, P.W.;

- ANDERSEN, F.A. Safety assessment of *Vitis vinifera* (grape) - derived ingredients as used in cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v.33, (supl.3), p.48S-83S, 2014.
- FLAMINI, R.; TRALDI, P. Mass spectrometry in grape and wine chemistry: PART II: Applications of mass spectrometry in grape and wine chemistry: Grape and Wine Polyphenols. 349pp, cap.6, 2010.
- FLAMINI, R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. **International Scholarly Research Notices Spectroscopy**, v.2013, p.1-45, 2013.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORRÊA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.
- FRANÇA, B.K.; ALVES, M.R.M.; SOUTO, F.M.S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R.F.; GUIMARÃES, A.; JUNIOR, A.A. Peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v.20, n.5, 2013.
- GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols: A chemical perspective. **Food Research International**, v.54, p.1844-1858, 2013.
- GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**, v.6, n.1, p.391-415, 2014.
- GHARRAS, H.E. Polyphenols: food sources, properties and applications: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.2512-2518, 2009.
- GODEVAC, D.; TESEVIC, V.; VELICKOVIC, M.; VUJISIC, L.; VAJS, V.; MILOOSAVLJEVIC, S. Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.75, n.12, p.1641-1652, 2010.
- GONZÁLEZ, S.; IORENTE, M.F.; CALZADA, Y.G. The latest on skin photoprotection. **Clinical Dermatology**, v.26, n.6, p.614-626, 2008.
- GOUTZOURELAS, N.; STAGOS, D.; DEMERTZIS, N.; MAVRIDOU, P.; KARTEROLIOTI, H.; GEORGADAKIS, S.; KERASIOTI, E.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, L.; STATIRI, A.; TSIOUTSIOULITI, A.; TSATSAKIS, A.M.; HAYES, A.W.; KOURETAS, D. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. **Human & Experimental Toxicology**, v.33, n.11, p.1099-1112, 2014.
- GRAGNANI, A.; CORNICK, S.M.; CHOMINSKI, V.; NORONHA, S.M.R.; NORONHA, S.A.A.C.; FERREIRA, L.M. Review of major theories of skin aging. **Advances in Aging Research**, v.3, p.265-284, 2014.

GU, L.; KELM, M.A.; HAMMERSTONE, J.F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R.L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v.38, n.12, p.1272-1280, 2003.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M.; H.; G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: Uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, n.1, p.206-213, 2007.

HAJJ, Y.E.; LOUKA, N.; NGUYEN, C.; MAROUN, R.G. Low cost process for phenolic compounds extraction from Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by response surface methodology. **Food and Nutrition Sciences**, v.3, n.1, p.89-103, 2012.

HARIF, A.; AKHTAR, N.; KHAN, M.S.; MENAA, A.; MENAA, B.; KHAN, B.A.; MENAA, F. Formulation and evaluation on human skin of a water-in-oil emulsion containing Muscat Hamburg black grape seed extract. **International Journal of Cosmetic Science**, v.37, n.2, p.253-258, 2015.

HERZOG, B.; GIESINGER, J.; SCHNYDER, M. Solubility of UV absorbers for sunscreens is essential for the creation of light feel formulations. **BASF Care Creations**, 2013. Disponível em: <https://www.carecreations.basf.com/science-excellence/studies-articles/news-detail/2013/9/10/solubility-of-uv-absorbers-for-sunscreens-is-essential-for-the-creation-of-light-feel-formulations>. Acesso em: 24 jul. 2015.

HORNSEY, I.S. The vine. **The chemistry and biology of winemaking**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007. cap.2, p.65-113.

HUGHES, M.C.B.; WILLIAMS, G.M.; BAKER, P.; GREEN, A.C. Sunscreen and prevention of skin aging: a randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v.158, n.11, p.781-790, 2013.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition Analysis**, v.21, p.589-598, 2008.

JAIN, S.K.; JAIN, N.K. Multiparticulate carries for sun- screening agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v.32, n.2, p.89-98, 2010.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B.F.; MEUNIER, P.; PEYRON, D.; TROLLAT, P. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.316-319, 1995.

- JAPAN. Ministry of Health and Welfare. **Standards for cosmetics**. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2000. (Notification No.331). Disponível em: <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/0000032704.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2015.
- KAIMAL, S.; ABRAHAM, A. Sunscreens. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.77, n.2, p.238-243, 2011.
- KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and White grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.14, p.4360-4367, 2004.
- KAMMERER, D.; CLAUS, A.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. **Journal of Food Science**, v.70, n.2, p.C157-C163, 2005.
- KATYAR, S.K. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, (suppl.1), p.S71-76, 2008.
- KATYAR, S.K. Proanthocyanidins from grape seeds inhibit UV-radiation-induced immune suppression in mice: detection and analysis of molecular and cellular targets. **Photochemistry and Photobiology**, v.91, n.1, p.156-162, 2015.
- KLIGMAN, A.M.; WOODING, W.M. A method for the measurement and evaluation of irritants of human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.49, n.1, p.78-94, 1967.
- KOLB, C.A.; KOPECKY, J.; RIEDERER, M.; PFÜNDEL, E. E. UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Functional Plant Biology**, v.30, p.1177-1186, 2003.
- KOMES, D.; HORZIC, D.; BELSCAK, A.; GANIC, K.K.; VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v.43, n.1, p.167-176, 2010.
- KRUTMANN, J.; BOULOC, A.; SORE, G.; BERNARD, A.B.; PASSERON, T. The skin aging exposome. **Journal of Dermatological Science**, v.85, p.152-161, 2017.
- KY, I.; CROZIERB, A.; CROS, G.; TEISSEDREA, P.L. Polyphenols composition of wine and grape sub-products and potential effects on chronic diseases. **Nutrition and Aging**, v.2, n.2/3, p.165-177, 2014.
- KY, I.; TEISSEDRE, P.L. Characterization of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity. **Molecules**, v.20, n.2, p.2190-2207, 2015.

- LAZARINI, F.C.; FALCÃO, T. 1999. Fluxograma da vinificação em tinto. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/prfruta/vinhotin/biblio.htm> Acesso em: 23 abr. 2014.
- LEHMANN, P.; SCHWARZ, T. Photodermatoses: diagnosis and treatment. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, n. 9, p.135-141, 2011.
- LI, H.J.; DEINZER, M.L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. **Analytical Chemistry**, v.79, n.4, p.1739-1748, 2007.
- LIN, F.H.; LIN, J.Y.; GUPTA, R.D.; TOURNAS, J.A.; BURCH, J.A.; SELIM, M.A.; RIVIERE, N.A.M.; GRICHNIK, J.M.; ZIELINSKI, J.; PINNELL, S.R. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p.826-832, 2005.
- LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N., QUADRI, M.B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.3, p.291-297, 2007.
- LUCAS, R.M.; NORVAL, M.; NEALE, R.E.; YOUNG, A.R.; GRUJIL, F.R.; TAKIZAWAG, Y.; VAN DER LEUNI, J.C. The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. **Photochemical & Photobiological Science**, v.14, p.53-87, 2015.
- MANSUR, M.C.P.P.R.; LEITÃO, S.G.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.; VERMELHO, A.B.; SILVA, R.S.; PRESGRAVE, O.A.F.; LEITÃO, A.A.C.; LEITÃO, G.G.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E.P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, n.2, p.251-258, 2016.
- MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v.46, n.3, p.234-239, 1998.
- MARTINCIGH, B.S.; OLLENGO, M. A. The photostabilizing effect of grape seed extract on three common sunscreen Absorbers. **Photochemistry and Photobiology**, n.92, p.870-884, 2016.
- MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.
- MINATEL, I.O.; BORGES, C.V.; FERREIRA, M.I.; GOMEZ, H.A.G.; CHEN, C.Y.; LIMA, G.P.P. Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. In: SOTO-HERNÁNDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS, M.R., eds.

Phenolic compounds: biological activity. [S.l.]: InTech, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/phenolic-compounds-biological-activity/phenolic-compounds-functional-properties-impact-of-processing-and-bioavailability>. Acesso em: 20 jul. 2017.

MITIC, M.N.; SOUQUET, J.-M.; OBRADOVIC, M.V.; MITIC, S.S. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. **Food Science and Biotechnology**, v.21, n.6, p.1619-1626, 2012.

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

MONRAD, J.K.; HOWARD, L.R.; KING, J.W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.5, p.2862-2868, 2010.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.263-269, 2009.

MONTEALEGRE, P.R.; PECES, R.R.; VOZMEDIANO, J.L.C.; GASCUEÑA, J.M.; ROMERO, G.G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.687-693, 2006.

MUDIT, V.; TRIPTI, S.; RAM, P.; ELMETS, C.A.; CRAIG, A.; HUI, X.; SANTOSH, K. K. Bioactive grape proanthocyanidins enhance immune reactivity in UV - irradiated skin through functional activation of dendritic cells in mice. **Cancer Prevention Research**, v.6, n.3, p.242-252, 2013.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds: A review. **Pharmaceutics**, v.3, p.793-829, 2011.

NAPAGODA, M.T.; MALKANTHI, B.M.A.S.; ABAYAWARDANA, S.A.K.; QADER, M.M.; JAYASINGHE, L. Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.16, n.1, p.479, 2016.

NEGRI, A.S.; PRINSI, B.; FAILLA, O.; SCIENZA, A.; ESPEN, L. Proteomic and metabolic traits of grape exocarp to explain different anthocyanin concentrations of the cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.603, p.1-16, 2015.

NICHOLS, J.A., KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatology Research**, v.302, n.2, p.71-83, 2010.

OLDONI, T.L.C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. Piracicaba, 2011. 163p. Tese de Doutorado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, 2009.

OLIVEIRA, C.A.; PERES, D.D.A.; RUGNO, C.M.; KOJIMA, M.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; ROSADO, C.; MOTA, J.; VELASCO, M.V.R.; BABY, A.R. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.148, 154-159, 2015.

OLIVEIRA, D.A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. Florianópolis, 2010. 209p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

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

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.A. A blocked diketo form of avobenzone: Photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB- filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, n.1, p.178-184, 2009.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializadas em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.4, 2012.

PEREIRA, A.M.S.; FERRO, D. 10 plantas medicinais. In: 8º ENCONTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM PLANTAS MEDICINAIS, **Monografia**. Araxá, 2008. p.152. Disponível em:

<file:///C:/Users/pc/Documents/UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS DO C.pdf> Acesso em 21 mai. 2014.

PERES, D.D.; ARIEDE, M.B.; CANDIDO, T.M.; DE ALMEIDA, T.S.; LORENÇO, F.R.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.; BABY, A.R. Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the

development of multifunctional sunscreens. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.43, n.2, p.246-256, 2017.

PINNAGODA, J.; TUPKER, R.A.; AGNER, T. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: a report from the standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.22, p.164-172, 1990.

POP, C.; ROTAR, A.M.; SALANȚĂ, L.; SOCACI, S.; RANGA, F.; SOCACIU, C., Thermal stability study of the grape seeds extracts in the aqueous solutions. **Food Science and Technology**, v.72, n. 1, p.91-98, 2015.

POZZI, A. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do "Maracujá" (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*). São Carlos, 2007. 86p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Química Analítica - Universidade de São Paulo.

PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; CORRÊA, N.M.N.; LEONARDO, G.R. Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de ureia dispersada, ou não, em propilenoglicol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.1, p.47-53, 2009.

RADICE, M.; MANFREDINI, S.; ZIOSI, P.; DISSETTE, V.; BUSO, P.; FALLACARA, A.; VERTUANI, S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photoprotection alternatives to synthetic UV filters: A systematic review. **Fitoterapia**, v.114, p.144-162, 2016.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.339, n.8808, p.1523-1526, 1992.

REYES, E.; VITALE, M.A. Avances em fotoprotección: mecanismos moleculares implicados. **PIEL**, v.28, n.4, p.235-247, 2013.

RIM, C.R. **Possible health benefits of red wine: resveratrol basics**. Tucson: University of Arizona, College of Pharmacy, 2013. Disponível em: <https://informatics.pharmacy.arizona.edu/rim/practice/resveratrol/>. Acesso em: 27 jan. 2016.

RIMAC-BRNCICL, S.; SABOLOVICL, M.B.; SIC ŽLABUR, J.; JELOVECKIL, M. Colour stability and antioxidant activity of some berry extracts. **Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists**, v.11, n.3/4, p.115-119, 2015.

RIZZON, L.A.; DALL'AGNOL, I. **Vinho tinto**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 15-33p. (Coleção Agroindústria Familiar).

- ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, L.; GONZAGA, L.V.; FETT, R. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.2, p.158-163, 2007.
- ROCKENBACH, I.I. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). Florianópolis, 2008.p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.
- ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.238-244, 2008.
- ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.S.S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v.127, n.1, p.174-179, 2011.
- RONDEAU, P.; GAMBIER, F.; JOLIBERT, F.; BROSSE, N. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.251-254, 2013.
- RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M.J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: Almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.25, p.10101-10109, 2007.
- SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, n.9, p.129-141, 2013.
- SALAZAR, S.A.; L.A. JUÁREZ, M.; VALDEZ, H.S.; LÓPEZ, F.M.; MEZA, N.G. Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.20, p.208-213, 2014.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.153-166, 2007.
- SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Produção de vinhos e espumantes no Brasil**. 2014. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/producao-de-vinhos-e-espumantes-no-brasil/>. Acesso em: 27 jan. 2016.

SEGURA, M.A.M.; MARÍN, H.F.; DELGADO, S.E.B. Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* em patologias associadas al estrés oxidativo. **Revista de Fitoterapia**, v.3, n.2, p.135-144, 2003.

SHAAT, N.A. Ultraviolet filters. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, n.4, p.464-469, 2010.

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

SINGHA, I.; DAS, S.K. Free radical scavenging properties of skin and pulp extracts of different grape cultivars *in vitro* and attenuation of H₂O₂-induced oxidative stress in liver tissue *ex vivo*. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.30, n.3, p.305-312, 2015.

SILVA, D. C. Identificação e caracterização do perfil transcricional de genes durante o desenvolvimento inicial do fruto em videira sem sementes (*V. vinifera* L. Cv 'Sultanina'), 2010. 24p. Tese de Doutorado - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - Universidade Federal do Rio grande do Sul.

SILVA, R.R.; MACHADO, P.F.L.; ROCHA, R.J.; SILVA, S.C.F. A luz e os filtros solares: Uma temática sociocientífica. **Revista Virtual de Química**, v.7, n.1, p.218-241, 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010. 597-619p.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.59-64, 2008.

SOTO, M.L.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Review: Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. **Cosmetics**, v.2, p.259-276, 2015.

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v.31, n.3, p.217-222, 2010.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.69, n.1, p.71-77, 2014.

- ŠULC, M.; LACHMAN, J.; HEJTMÁNKOVÁ, A.; ORSÁK, M. Relationship between antiradical activity, polyphenolic antioxidants and free trans-resveratrol in grapes (*Vitis vinifera* L.). **Horticultural Science**, v.32, n.4, p.154-162, 2005.
- TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P.; NOGUEIRA, N.A.M. **Tecnologia para produção de uva Itália na região Noroeste do Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: CATI, 1998. 58p. (Documento Técnico, 97).
- TERRAL, J.F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J.B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; THIS, P. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera* L.) under domestication: New morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of Botany**, v.105, n.3, p.443-455, 2010.
- TEXEIRA, A.; BAENAS, N.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; BARROS, A.; ROSA, E.; MORENO, D.A.; GARCIA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.9, p.15638-15678, 2014.
- TEDESCHI, A.; WEST, L. E.; GUZZARDI, L.; BHATT, K. H.; REID, E. E.; SCAPAGNINI, G.; MICALI, G. Cosmeceuticals in dermatology. In: TOSTI, A.; HEXSEL, D., eds. **Update in cosmetic dermatology**. Berlin: Springer, 2013. cap.7, p.87-113.
- TOUNSI, M.S.; OUERGHEMMI, I.; WANNES, W.A.; KSOURI, R.; ZEMNI, H.; MARZOUK, M.E. Valorization of three varieties of grape. **Industrial Crops and Products**, v.30, n.2, p.292-296, 2009.
- TOURNOUR, H. H.; SEGUNDO, M. A.; MAGALHÃES, L. M.; BARREIROS, L. QUEIROZ, J.; CUNHA, L.M., Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v.74, p.397-406, 2015.
- TROPICOS. *Vitis vinifera* L. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/34000217>. Acesso em: 4 fev. 2016.
- UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Appraisal of the Safety of Chemicals In Foods, Drugs, And Cosmetics**. Austin, Tex.: Association of Food & Drug Officials of the United States, 1959. DRAIZE, J. H. Dermal Toxicity, p. 46-51.
- UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CFR Parts 347 and 352. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Proposed amendment of final monograph. **Federal Register**, p.49069-49122, 2007.

Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2007/08/27/07-4131/sunscreen-drug-products-for-over-the-counter-human-use-proposed-amendment-of-final-monograph>.

Acesso em: 13 jun. 2016.

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

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Division of Biotechnology and GRAS Notice Review (HFS-255). **Determination of the GRAS Status of the Addition of Grape Pomace Extract to Conventional Foods**. 2012. (GRAS Notice (GRN), 446). Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm337457.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2015.

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

VICIOLE, E.; CASTILHO, P.; ROSADO, C. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect *Laurus novocanariensis* oil and essential oil in human skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v.34, n.6, p.546-550, 2012.

WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J. D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1156-1162.

WILLIAMS, S.; TAMBURIC, S.; LALLY, C. Eating chocolate can significantly protect the skin from UV light. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.8, n.3, p.169-173, 2009.

YAMASAKI, R.; DEKIO, S.; JIDOI, J. Contact dermatitis from grape bud. **Contact Dermatitis**, v.12, n.4, p.226-227, 1985.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.255-260, 2004.

YUAN, X.Y.; LIU, W.; HAO J.C.; GU, W.J.; ZHAO, Y.S. Topical grape seed proanthocyanidin extract reduces sunburn cells and mutant p53 positive epidermal cell formation, and prevents depletion of Langerhans cells in an acute sunburn model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.30, n.1, p.20-25, 2012.

- XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J., Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v.119, p.1557-1565, 2010.
- XU, Y.J.; CAPISTRANO, R.L.; DHOOGHE, L; FOUBERT, K.; LEMIÈRE, F.; MAREGESI, S.; BALDÉ, A.; APERS, S.; PIETERS, L. Herbal medicines and infectious diseases: Characterization by LC-SPE-NMR of some medicinal plant extracts used against malaria. **Planta Medica**, v.77, n.11, p.1139-1148, 2011.
- XU, Y.; BURTON, S.; KIM, C.; SISMOUR, E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. **Food Science & Nutrition**, v.4, n.1, p.125-133, 2016.
- ZHENG, Z.G.; DUAN, T.T.; HE, B.; TANG, D.; JIA, X.B.; WANG, R.S.; ZHU, J.X.; XU, Y.H.; ZHU, Q.; FENG, L. Macrophage biospecific extraction and HPLC-ESI-MSⁿ analysis for screening immunological active components in *Smilacis glabrae* rhizoma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.77, s/n, p.44-48, 2013.
- ZHOU, Q.; FENG, C.; RUAN, Z.V. Inhibitory effect of a genistein derivative on pigmentation of guinea pig skin. **RSC Advances**, v.17, n.7, p.7914-7919, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE

APÊNDICE A – HPLC e ESI-MS/MS

Figura A.1 - Cromatograma do pico base (BPC) do extrato seco de *Vitis vinifera* L. Modo positivo com procianidinas (dímero e trímero) identificados

Figura A.2 - Estrutura do dímero e trímero de procianidina tipo B

Figura A.3 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 29,9 minutos

Figura A.4 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 579 a 29,9 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma procianidina dimérica

Figura A.5 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 31,6 minutos

Figura A.6 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos de m/z 579 em 31,6 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma procianidina dimérica

Figura A.7 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 33,7 minutos

Figura A.8 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 579 em 33,7 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma procianidina dimérica

Figura A.9 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 37,9 minutos

Figura A.10 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos de m/z 579 em 37,9 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma procianidina dimérica

Figura A.11 - Espectro de massa íon positivo MS¹ em 41,5 minutos

Figura A.12 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 867,38 em 41,5 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma procianidina trimérica

Figura A.13 - Íon positivo MS² e fragmentos do m/z 579 em 41,5 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma procianidina dimérica

Figura A.14 - Espectro de massa íons positivos ESI-MS¹ em 55,8 minutos da di-hidroquercetina-O-ramnose

Figura A.15 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 451,10 em 55,8 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de uma di-hidroquercetina-3-O-rhamnose

Figura A.16 - Espectro de massa íons positivos ESI-MS¹ em 55,9 minutos da quercetina-*O*-glicuronídeo

Figura A.17 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 479,0 em 55,9 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação da quercetina-*O*-glicuronídeo

Figura A.18 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 59,3 minutos da rutina

Figura A.19 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 611,28 em 59,4 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação da rutina

Figura A.20 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 59,6 minutos da quercetina-3-glicosídeo

Figura A.21 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 465,21 em 59,6 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação da quercetina-3-glicosídeo

Figura A.22 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 59,7 minutos da mavidina-3-*O*-glicosídeo piruvato

Figura A.23 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 465,21 em 59,6 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de malvidina-3-*O*-glicosídeo piruvato

Figura A.24 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 61,2 minutos do canferol-3-glicuronídeo

Figura A.25 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos de m/z 463,25 em 61,2 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação do canferol-3-glicuronídeo

Figura A.26 - Espectro de massa íons positivos ESI-MS¹ em 63,4 minutos da quercetina

Figura A.27 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos m/z 303,15 em 63,4 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação da quercetina

Figura A.28 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 64,4 minutos da petunidina-3-O-glicosídeo

Figura A.29 - ESI-MS² de íons positivos e fragmentos de m/z 479,22 em 64,4 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação de petunidina-3-O-glicosídeo

Figura A.30 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 64,6 minutos da peonidina-3-O-glicosídeo piruvato

Figura A.31 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 531,18 em 64,6 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação do piruvato de peonidina-3-*O*-glicosídeo

Figura A.32 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 65,3 minutos da malvidina-3-*O*-glicosídeo

Figura A.33 - Espectro de massa íon positivo ES-MS2 e fragmentos de m/z 493,22 em 65,3 minutos, destacando os picos correspondentes à fragmentação da malvidina-3-*O*-glicosídeo

Figura A.34 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 67 minutos da delfinidina-3-*O*-(6''-*O*-*p*-cumaril) glicosídeo-ácido pirúvico

Figura A.35 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 679,33 em 67 minutos, destacando os picos correspondentes a fragmentação da delfinidina-3-*O*-(6''-*O*-*p*-cumaril) glicosídeo-ácido pirúvico

Figura A.36 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 76,1 minutos da malvidina-3-(6''-*O*-acetilglicosídeo)

Figura A.37 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do m/z 535,27 em 76,1 minutos, destacando os picos correspondente a fragmentação da malvidina-3-(6''-O-acetilglicosídeo)

Figura A.38 - Espectro de massa íon positivo ESI-MS¹ em 81,1 minutos da malvidina-3-(6''-O-cafeoilglicosídeo)

Figura A.39 - Íon positivo ESI-MS² e fragmentos do the m/z 655,32 em 81,1 minutos, destacando os picos correspondentes a fragmentação da malvidina-3-(6''-O-ácido cafeico glicosilado)

APÊNDICE B – Formulações preliminares (F1 – F12)

Tabela B.1 - Composição qualitativa e quantitativa % (p/p) das formulações

Composição*	Concentração % (p/p)											
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Ammonium												
acryloyldimethyltaurate/Vinylpyrrolidone copolymer	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Butylparaben (and) Isobutylparaben												
	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ethylhexyl Methoxycinnamate**	10,0	10,0	10,0	10,0	-	-	-	-	10,0	10,0	10,0	10,0
Butyl methoxydibenzoyl methane**	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-	-	-	5,0	5,0	5,0	5,0
Ethylhexyl dimethyl PABA**	10,0	10,0	10,0	10,0	-	-	-	-	10,0	10,0	10,0	10,0
Extrato do bagaço de <i>V. vinifera</i> L.	-	-	-	-	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
pH ***	3,0	5,0	7,0	10,0	3,0	5,0	7,0	10,0	3,0	5,0	7,0	10,0
Água purificada q.s. (g)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

*INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredient); **Filtro UV; ***Corretor do valor de pH: Ácido cítrico (50%) e Hidróxido de sódio (1M) q.s.: quantidade suficiente.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – CURRÍCULO LATTES

[Imprimir currículo](#)

Alexandra de Almeida Hübner

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9384224082780809>

Última atualização do currículo em 02/08/2017

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Paulista (2013). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Farmacognosia, atuando principalmente nos seguintes temas: cesium chloride, micronucleus, chromosome aberration e chromosome aberration; micronucleus;.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Alexandra de Almeida Hübner
Filiação	Alvino Pereira de Almeida e Antonina de Almeida
Nascimento	09/07/1976 - Brasil
Carteira de identidade	6058650075 ssp - RS - 17/01/2014
CPF	785.087.620-20
Passaporte	FF117436
Endereço residencial	Avenida Luiz José Sereno Jardim Ermida II - Jundiaí 13212210, SP - Brasil Telefone: 011 28171413 Celular 011 996238155
Endereço profissional	Universidade de São Paulo Avenida Professor Lineu Prestes Butantã - São Paulo 05508000, SP - Brasil Telefone: 011 30913621
Endereço eletrônico	E-mail para contato : alexandra.hubner@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2015 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2011 - 2013 Graduação em Farmácia.
Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil
Título: Atividade antimicrobiana do Picão preto (*bidens pilosa* L.).
Ano de obtenção: 2013
Orientador: Nilsa Sumie Yamashita Wadt

Áreas de atuação

1. Farmacognosia

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
Espanhol	Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Bem

Produção

-

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata

Página 1 de 3

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. PERES, DANIELA D'ALMEIDA; HUBNER, ALEXANDRA; OLIVEIRA, CAMILA AREIAS DE; ALMEIDA, TANIA SANTOS DE; KANEKO, TELMA MARY; CONSIGLIERI, VLADI OLGA; PINTO, CLAUDINÉIA APARECIDA SALES DE OLIVEIRA; VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES; BABY, ANDRÉ ROLIM. Hydrolyzed collagen interferes with in vitro photoprotective effectiveness of sunscreens. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. , v.53, p.1 - 7, 2017.
2. SANTOS-MELLO, R.; DEIMLING, L.I.; LAUER JÚNIOR, C.M.; ALMEIDA, A. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. , v.516, p.23 - 28, 2002.
3. R. Santos-Mello; SCHMIDT, T.; E. Neuhauss; HÜBNER, A. A. Induction of micronuclei by CsCl in vivo and in vitro. *MUTATION RESEARCH*. , v.446, p.239 - 244, 2002.
4. SANTOS-MELLO, R.; DEIMLING, L.I.; ALMEIDA, A. Induction of micronuclei in mouse polychromatic erythrocytes by the administration of non-radioactive CsCl by the oral and intraperitoneal route.. *Mutation Research (Print)*. , v.497, p.147 - 151, 2001.

Apresentação de trabalho e palestra

1. HÜBNER, A. A. Fitoquímica, atividades antioxidante e eficácia fotoprotetora do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis Vinifera* L.) "Hydroethanolic Extract", 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)
2. HÜBNER, A. A. Fitoquímica, análise antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima da Pinha (*Pinus elliotti* Engelm) e gel, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. ALMEIDA, A. Estudo utiliza bagaço de uva para potencializar protetor solar, 2016

Demais produções técnicas

1. HÜBNER, A. A. Oficina de reciclagem "Semana do Meio Ambiente", 2016. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	4
Apresentações de trabalhos (Congresso)	1
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão)	1
--	---

Currículo Lattes

03/08/17 10:31

Programa de Rádio ou TV (entrevista)	1
--------------------------------------	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	1
--------------------------------------	---

Participações em eventos (seminário)	1
--------------------------------------	---

Participações em eventos (outra)	8
----------------------------------	---

Organização de evento (outro)	1
-------------------------------	---

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 03/08/2017 às 10:26:40.

ANEXO B – FICHA DO ALUNO

NUSP: 9130502

Nome: Alexandra de Almeida Hübner

Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
→ Mestrado Insumos Farmacêuticos (9138)		1	Matrícula de Acompanhamento

[Preparar para imprimir](#)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 01/08/2017 11:46:26

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	06/02/2015
Início da Contagem de Prazo:	06/02/2015
Data Limite para o Depósito:	07/08/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elfriede Marianne Bacchi - 06/02/2015 até o presente. Email: elfriede@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 10/08/2016 até o presente. Email: andrerb@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/02/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 09/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 06/02/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 01/08/2017 11:46:26

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

9138 - 9130502/1 - Alexandra de Almeida Hübner

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5710-8/2	Obtenção Racional de Insumos de Plantas Medicinais	02/03/2015	12/05/2015	90	6	95	A	N	Concluída
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5777-3/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	12/03/2015	24/06/2015	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída
BIB5754-4/1	Produtos Naturais: Biossíntese, Distribuição e Identificação em Espécies Vegetais (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	10/08/2015	16/11/2015	120	8	100	A	N	Concluída
BIB5734-4/3	Tópicos em Fitoquímica II (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	12/08/2015	02/11/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5779-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	10/03/2017	19/05/2017	90	6	100	A	S	Concluída

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

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 01/08/2017 11:46:26

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

9138 - 9130502/1 - Alexandra de Almeida Hübner

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
69974	Elfriede Marianne Bacchi	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 01/08/2017 11:46:26

ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fitoquímica e atividades antioxidante e fotoprotetora do extrato hidroetanólico do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (V. vinífera L.)

Pesquisador: Elfriede Marianne Bacchi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46383115.0.3001.8021

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.438.277

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa da aluna de pós graduação Alexandra Hubner, orientado pela prof. Dra. Elfriede Bacchi. Serão obtidos extratos do bagaço da uva Cabernet Sauvignon e posteriormente, serão desenvolvidos produtos cosméticos com atividade fotoprotetora, e a eficácia e a segurança desses serão avaliadas através de testes com seres humanos.

Objetivo da Pesquisa:

Os principais objetivos desta pesquisa são: avaliar a composição fitoquímica, determinar as atividades antioxidante e fotoprotetora do extrato do bagaço da uva, formular produtos cosméticos com atividade fotoprotetora, e finalmente, verificar a eficácia e a segurança destes através de testes com seres humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

as substâncias usadas nas formulações são consideradas seguras para a finalidade que se destinam, mas reações inesperadas podem ocorrer, como dermatites de contato e/ou alérgicas, com intensidades variáveis, podendo variar de pessoa para pessoa, levando em consideração as diferentes características fisiológicas e pessoais dos participantes.

Os benefícios esperados, embora que não sejam aplicados diretamente aos participantes envolvidos no estudo, poderão ser aplicados à comunidade (produto seguro para uso pela

Endereço: Rua Leonardo Cavalcante, 314
Bairro: Centro
UF: SP **Município:** JUNDIAÍ
Telefone: (11)4497-1315

CEP: 13.201-013

E-mail: cep@ipclin.com.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA INTEGRADA

Continuação do Parecer: 1.438.277

população).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está devidamente desenhado e estruturado.

Haverá acompanhamento por médico dermatologista durante todo o período da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos foram devidamente apresentados e estão adequados.

Foram elaborados TCLE para cada grupo de pesquisa: irritabilidade dérmica primária, acumulada e sensibilização; fototoxicidade e fotosensibilização; determinação do fator de proteção solar (FPS).

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_461309.pdf	04/12/2015 00:08:01		Acelto
Declaração de Pesquisadores	cartacomiteetica03dez15.docx	03/12/2015 23:51:49	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoetica.doc	03/12/2015 23:51:00	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoanuenciaipclin.jpg	03/12/2015 21:11:18	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciahospitalsaovicente.pdf	03/12/2015 21:08:41	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	irritacaocutanea.doc	03/12/2015 21:00:48	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fpsinvivo.doc	03/12/2015 21:00:24	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento /	fotoirritacao.doc	03/12/2015 20:59:35	Elfriede Marianne Bacchi	Acelto

Endereço: Rua Leonardo Cavalcante, 314
Bairro: Centro
UF: SP Município: JUNDIAÍ
Telefone: (11)4497-1315

CEP: 13.201-013

E-mail: cep@ipclin.com.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA INTEGRADA

Continuação do Parecer: 1.438.277

Justificativa de Ausência	fotoirritacao.doc	03/12/2015 20:59:35	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_461309.pdf	14/09/2015 12:52:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoetica.doc	14/09/2015 12:51:09	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	irritacaocutanea.doc	14/09/2015 12:45:10	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fpsinvivo.doc	14/09/2015 12:44:23	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fotoirritacao.doc	14/09/2015 12:43:57	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciaetica.docx	14/09/2015 12:40:53	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
Folha de Rosto	folharosto01.pdf	13/09/2015 12:24:21	Elfriede Marianne Bacchi	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_461309.pdf	15/06/2015 09:25:46		Aceito
Outros	descricao da equipe.pdf	15/06/2015 09:23:42		Aceito
Outros	declaracao elizabeth.pdf	15/06/2015 09:17:31		Aceito
Outros	Declaração de Anuência IPCLIN.jpg	15/06/2015 09:17:18		Aceito
Outros	declaracao elfi.pdf	15/06/2015 09:17:06		Aceito
Outros	declaracao andre.pdf	15/06/2015 09:16:54		Aceito
Outros	declaracao alexandra.pdf	15/06/2015 09:16:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto comite etica.docx	16/04/2015 13:58:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - Fator de Proteção Solar (FPS in vivo).doc	16/04/2015 13:47:29		Aceito
Folha de Rosto	folha rosto.pdf	16/04/2015 13:44:19		Aceito
TCLE / Termos de	TCLE - Irritação Cutânea	24/03/2015		Aceito

Endereço: Rua Leonardo Cavalcante, 314

Bairro: Centro

CEP: 13.201-013

UF: SP

Município: JUNDIAÍ

Telefone: (11)4497-1315

E-mail: cep@ipclin.com.br

Continuação do Parecer: 1.438.277

Assentimento / Justificativa de Ausência	Primária, Irritação Cutânea Acumulada e Sensibilização Dérmica.doc	14:38:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - Fotoirritação e Fotossensibilização.doc	24/03/2015 14:37:43		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUNDIAI, 04 de Março de 2016

Assinado por:
Andre David Bloch
(Coordenador)

Endereço: Rua Leonardo Cavalcante, 314
Bairro: Centro
UF: SP **Município:** JUNDIAI
Telefone: (11)4497-1315

CEP: 13.201-013

E-mail: cep@ipclin.com.br

ANEXO D – TCLE - IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: _____
 Documento de Identidade (número): _____ Sexo: () M () F
 Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ____ / ____ / ____
 Endereço: _____
 Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____
 Cidade: _____ Estado: _____
 Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: ~~Fitotóxica~~ e atividade antioxidante e ~~fotoprotetora~~ do extrato ~~hidroetanólico do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (V. vinífera L.)~~

Pesquisador Responsável: Dra. Elfriede Marianne ~~Bacchi~~ / fone: (11) 3091-3658 e (11) 99931-8016

- Professora Doutora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Colaborador: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033

- Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Alexandra de Almeida ~~Hübner~~ / fone: (11) 2817-1413 e (11) 99623-8155

- Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 2609-2000 e (11) 97030-2777

- Diretora Médica do ~~IPclin~~ Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 5 semanas

Risco da Pesquisa: Mínimo

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

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

3.Registro das Explicações do Pesquisador ao Participante do estudo sobre a pesquisa

1) Justificativa e os objetivos da pesquisa

Este trabalho se propõe analisar a fitoquímica e atividades antioxidante e fotoprotetora do extrato hidroetanólico do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.)

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

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada e sensibilização dérmica de seis (6) produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, se concordar, assine este termo de consentimento.

Todas as dúvidas surgidas durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.

Para a realização deste estudo, serão convidados 60 participantes, sendo 50 participantes avaliáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos e que queiram participar desta pesquisa. Os voluntários também participarão do ensaio de fototoxicidade e fotosensibilização.

A avaliação da irritação cutânea primária, acumulada e sensibilização dérmica será feita no IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, rua: Leonardo Cavalcante, 314 - Centro, Jundiaí - SP, 13201-013. O participante deverá comparecer durante seis semanas, em dias pré-estabelecidos (segundas, quartas ou sextas-feira) por aproximadamente 30 minutos cada visita ao Instituto.

Os estudos irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada e sensibilização dérmica terão duração de 6 semanas, nas primeiras três semanas o participante comparecerá as segundas, quartas e sextas nas três primeiras semanas (fase de indução), após serão 2 semanas de descanso e na última deverá comparecer na segunda e quarta-feira (fase de desafio), cada visita ao Instituto é de aproximadamente 30 minutos.

Será aplicado no participante um único adesivo com as seis (6) amostras a serem analisadas, sendo trocado a cada visita.

No primeiro dia, será realizada avaliação clínica da pele do dorso (costas) de cada participante por um médico dermatologista, caso o participante atenda aos critérios necessários para o estudo, será aplicado um adesivo hipoalergênico (com sítios com 1cm de diâmetro, separados entre si a uma distância de 1cm), contendo seis formulações fotoprotetora a serem testadas.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

Após dois dias, o adesivo hipoalergênico será retirado, com realização de uma nova avaliação clínica da pele e leitura das áreas de suas costas expostas a formulação.

Em seguida, um novo adesivo hipoalergênico contendo as seis formulações em teste serão colocadas na mesma posição. Na última semana de estudo, o participante retornará para aplicação de novo adesivo em seu dorso, do lado contrário ao utilizado inicialmente. Após dois dias, os adesivos serão retirados, com realização da última avaliação médica e determinação de possível irritação dérmica.

Durante as três semanas seguintes (*fase de indução*), uma vez por semana, será reaplicado adesivo com as seis formulações fotoprotetoras (descrita acima), sempre no mesmo local de suas costas, por meio de troca do adesivo semanalmente. A sua pele será avaliada a cada etapa de aplicação, para avaliação de possíveis reações de irritação acumulada.

Após o período de aplicação de três semanas, haverá um período de repouso de duas semanas (*fase de descanso*), onde nenhum adesivo será aplicado ou ficará em suas costas. Neste período, você não precisará comparecer ao Instituto em nenhum dia.

Após o período de repouso, última semana (*fase de desafio*) você retornará ao IPclin para aplicação de um novo adesivo contendo a mesma formulação em teste fase de desafio, em local virgem de suas costas (não utilizado anteriormente para aplicação de adesivos).

Finalmente, após dois dias de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e leitura das áreas de suas costas expostas ao produto, com avaliação de possíveis reações de sensibilização e/ou alergia.

É importante que você siga algumas recomendações durante o período de estudo (incluindo antes e depois) e somente se concordar deverá assinar este termo de consentimento livre e esclarecido:

- Não estar grávida ou com intenção de engravidar durante o estudo;
- Não alterar hábitos cosméticos, de higiene, de dieta e de exercícios;
- Evitar prática intensiva de esportes;
- Evitar exposição solar intensa, banhos de mar ou piscina durante todo o estudo;
- Não alterar o tratamento hormonal, nem o método contraceptivo medicamentoso;

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

- Não utilizar medicações de uso tópico ou sistêmico: anti-inflamatórios não hormonais de uso contínuo (a ser avaliado pelo médico responsável); corticoides; anti-histamínicos; imunossupressores; vitamina A ácida e seus derivados;
- Não realizar tratamento estético, cosmiátrico ou dermatológico;
- Não retirar ou molhar o adesivo;
- Não usar produtos cosméticos próximos à área do teste;
- Não se vacinar durante o estudo;
- Evitar roupas muito justas para não tirar o adesivo e não irritar a pele.

3) Desconfortos e riscos esperados:

A aplicação tópica de produtos ativos em humanos como conservantes parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno), filtros (Butyl methoxydibenzoyl methane; Ethylhexyl Methoxycinnamate e Ethylhexyl dimethyl PABA) e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo *in vivo* (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e também pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária.

4) Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo envolvido, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que contribuirá para ampliar o conhecimento sobre um produto cosmético.

I) ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

3. Todas as informações obtidas sobre os participantes do estudo são confidenciais.
- II) INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone da **D^{ca}** Leila Bloch (11) 97030-2777.

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo, endereço: Rua São Vicente de Paulo, 223, Centro - Jundiaí - SP/CEP:13201-625, telefone: (11) 4583-8155, que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas (transporte/alimentação) decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa. Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados.

“Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13º – Butantã – São Paulo – CEP: 05508- 900 Telefone 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br e/ou CEP: HUSP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária, CEP: 05508-0000, São Paulo/SP. Telefone: 3091-9457. Fax: 3091-9452. E-mail: cep@hu.usp.br.”

III) CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, ____ de ____ de ____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Favor, rubricar todas as páginas deste Termo de Consentimento

Página 5 de 6

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA
E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

ANEXO E – TCLE: FOTOIRRADIAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
AVALIAÇÃO DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: _____

Documento de Identidade (número): _____ Sexo: () M () F

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

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

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: ~~Fitoquímica e atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato hidroetanólico do~~
~~bagaço de uva Cabernet Sauvignon (V. vinifera L.)~~

Pesquisador Responsável: Dra. Elfriede Marianne ~~Bacchi~~ / fone: (11) 3091-3658 e (11) 99931-8016 -
 Professora Doutora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Colaborador: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033
 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Alexandra de Almeida ~~Hübner~~ / fone: (11) 2817-1413 e (11) 99623-8155
 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 2609-2000 e (11) 97030-2777
 - Diretora Médica do ~~IPclin~~ Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 5 semanas Risco da Pesquisa: Mínimo

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

3.Registro das Explicações do Pesquisador ao Participante do estudo sobre a pesquisa**1) Justificativa e os objetivos da pesquisa**

Este trabalho se propõe analisar a ~~fitoquímica~~ e atividades antioxidante e ~~fotoprotetora~~ do extrato ~~hidroetanólico~~ do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (~~Vitis vinifera~~ L.)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AValiação DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

- 2) Procedimentos que serão utilizados e realizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos experimentais:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a ~~fotoirritação~~ e ~~fotosensibilização~~ cutânea de seis (6) produtos cosméticos ~~fotoprotetores~~. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, se concordar, assine este termo de ~~consentimento~~.

Todas as dúvidas surgidas durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.

Para a realização do estudo, serão convidados 35 participantes, sendo 25 participantes avaliáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos e que queiram participar desta pesquisa. Os voluntários também participarão do teste de irritabilidade dérmica primária, acumulada e sensibilização.

A avaliação da ~~fotoirritação~~ e ~~fotosensibilização~~ cutânea será feita no **IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**, rua: Leonardo Cavalcante, 314 - Centro, Jundiaí - SP, 13201-013. Deverá comparecer durante seis semanas, em dias pré-estabelecidos (segundas, quartas ou ~~sextas-feira~~) por ~~aproximadamente~~ 30 minutos ao Instituto.

Os estudos de ~~fotoirritação~~ e ~~fotosensibilização~~ cutânea terão duração de 6 semanas, nas primeiras três semanas o participante comparecerá as segundas, quartas e sextas nas três primeiras semanas (fase de indução), após serão 2 semanas de descanso e na última deverá comparecer na segunda e quarta-feira (fase de desafio), cada visita ao Instituto é de aproximadamente 30 minutos.

Será aplicado no participante um único adesivo com as seis (6) amostras a serem analisadas, sendo trocado a cada visita.

No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação de um adesivo, contendo seis formulações ~~fotoprotetoras~~ teste, em suas costas (sítios com 1cm de diâmetro, separados entre si a uma distância de 1cm).

Após 24 horas de contato as seis formulações com a pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. A leitura das áreas de suas costas expostas as seis formulações será realizada 24 horas após a etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de ~~fotoirritação~~ primária.

Durante as três semanas seguintes (*fase de indução*), a etapa de aplicação e exposição à fonte de luz (descrita acima) será repetida em dias pré-estabelecidos, com reaplicação das seis formulações ~~fotoprotetoras~~ sempre no mesmo local de suas costas, por meio da troca do adesivo. A sua pele será avaliada após cada etapa de exposição à fonte de luz, para avaliação de possíveis reações de ~~fotoirritação~~ acumulada.

Após o período de aplicação de três semanas, haverá um período de repouso de duas semanas (*fase de descanso*), onde nenhum adesivo será aplicado ou ficará em suas costas. Neste período, você não precisará comparecer ao Instituto em nenhum dia.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

Após o período de repouso, última semana (*fase de desafio*), você retornará ao Instituto para aplicação de um novo adesivo contendo as seis formulações *fotoprotetoras* em teste, em local virgem de suas costas (não utilizado anteriormente para aplicação de adesivos).

Finalmente, após 24 horas de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. A leitura das áreas de suas costas expostas as seis formulações será realizada 24 horas após a última etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de *fotosensibilização*.

É importante que você siga algumas recomendações durante o período de estudo (incluindo antes e depois) e somente se concordar deverá assinar este termo de consentimento livre e esclarecido:

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

3) Desconfortos e riscos esperados:

A aplicação tópica de produtos ativos em humanos como conservantes *parabeno* (*metilparabeno*, *etilparabeno*, *propilparabeno* e *butilparabeno*), filtros (*Benzyl methoxydibenzoyl methane* (AVO) - UVA; *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (MCO) - UVB e *Ethylhexyl dimethyl PABA* (PABA) - UVB) e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica,

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
AValiação DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

com intensidades variáveis, podendo ser graves. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo *in vivo* (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e também pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária.

4) Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo envolvido, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que contribuirá para ampliar o conhecimento sobre um produto cosmético.

I) ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo.
3. Todas as informações obtidas sobre os participantes do estudo são confidenciais.

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

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

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo, endereço: Rua São Vicente de Paulo, 223, Centro - Jundiaí - SP/CEP:13201-625, telefone: (11) 4583-8155, que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas (transporte/alimentação) decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa. Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados.

“Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13º – Butantã – São Paulo – CEP: 05508-900, Telefone 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br e/ou CEP: HU/USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária, CEP: 05508-0000, São Paulo/SP. Telefone: 3091-9457. Fax: 3091-9452. E-mail: cep@hu.usp.br.”

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
AValiação DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

III) CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO F – TCLE: AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: _____
 Documento de Identidade (número): _____ Sexo: () M () F
 Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ____ / ____ / ____
 Endereço: _____
 Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____
 Cidade: _____ Estado: _____
 Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: ~~Fitoquímica~~ e atividades antioxidante e ~~fotoprotetora~~ do extrato hidroetanólico do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*V. vinifera* L.)

Pesquisador Responsável: Dra. Elfriede Marianne ~~Bacchi~~ / fone: (11) 3091-3658 e (11) 99931-8016

- Professora Doutora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Colaborador: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033

- Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Alexandra de Almeida ~~Hübner~~ / fone: (11) 2817-1413 e (11) 99623-8155

- Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médica Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 2609-2000 e (11) 97030-2777

- Diretora Médica do ~~IPclin~~ Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 2 dias

Risco da Pesquisa: Mínimo

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

3. Registro das Explicações do Pesquisador ao Participante do estudo sobre a pesquisa

1) Justificativa e os objetivos da pesquisa

Este trabalho se propõe analisar a ~~fitoquímica~~ e atividades antioxidante e ~~fotoprotetora~~ do extrato hidroetanólico do bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.)

Favor, rubricar todas as páginas deste Termo de Consentimento

Página 1 de 5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
AValiação DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

- 2) Procedimentos que serão utilizados e realizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos experimentais:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o Fator de Proteção Solar (FPS) de seis (6) produtos cosméticos ~~foto~~protetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, se concordar, assine este termo de consentimento

Todas as dúvidas surgidas durante e após o trabalho serão prontamente esclarecidas.

Para a realização deste estudo, serão convidados 20 participantes, sendo 10 participantes avaliáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos e que queiram participar desta pesquisa. Os voluntários que farão parte do painel do ensaio de FPS não farão parte dos demais painéis

A avaliação do fator de proteção solar será feita no ~~IPclin~~ - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, rua: Leonardo Cavalcante, 314 - Centro, Jundiaí - SP, 13201-013. Deverá comparecer durante dois dias semanas ao Instituto, sendo que a permanência no primeiro dia será de 4 horas e no segundo dia de aproximadamente meia hora.

para uma avaliação clínica da pele das costas por um médico dermatologista.

O estudo possui duração de dois dias, sendo que a permanência no Instituto no primeiro dia será de 4 horas e no segundo dia de aproximadamente 30 minutos.

No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação das seis formulações ~~foto~~protetoras em suas costas entre as linhas da escápula e cintura, então você será exposto a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar (superfície das áreas de exposição possui, aproximadamente, 0,5 cm² e a distância mínima entre as bordas de duas áreas de exposição adjacentes de 0,8 cm). No dia seguinte você deverá retornar ao Instituto para que seja realizada a leitura das áreas expostas à irradiação.

É importante que você siga algumas recomendações durante o período de estudo (incluindo antes e depois) e somente se concordar deverá assinar este termo de consentimento livre e esclarecido:

- Não estar grávida ou com intenção de engravidar durante o estudo;
- Não alterar hábitos cosméticos, de higiene, de dieta e de exercícios;
- Evitar prática intensiva de esportes;

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

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

3) Desconfortos e riscos esperados:

A aplicação tópica de produtos ativos em humanos como conservantes ~~parabens~~ (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno), filtros (*Butyl methoxydibenzoyl methane* (AVO) - UVA; *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (MCO) - UVB e *Ethylhexyl dimethyl PABA* (PABA) - UVB) e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo *in vivo* (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e também pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária.

4) Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo envolvido, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que contribuirá para ampliar o conhecimento sobre um produto ~~cosmético~~.

II) ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

2. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo.
3. Todas as informações obtidas sobre os participantes do estudo são confidenciais.

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

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

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo, endereço: Rua São Vicente de Paulo, 223, Centro - Jundiaí - SP/CEP:13201-625, telefone: (11) 4583-8155, que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas (transporte/alimentação) decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa. Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados.

"Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13ª – Butantã – São Paulo – CEP: 05508-900, Telefone 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br e/ou CEP: HU/USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária, CEP: 05508-0000, São Paulo/SP. Telefone: 3091-9457. Fax: 3091-9452. E-mail: cep@hu.usp.br."

III) CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Favor, rubricar todas as páginas deste Termo de Consentimento

Página 4 de 5

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)