

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em  
formulações cosméticas fotoprotetoras**

Maíra Bueno Ariede

Dissertação para obtenção do Título de

**MESTRE**

**Orientador:** Prof. Dr. André Rolim Baby

**Coorientador:** Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2016

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em  
formulações cosméticas fotoprotetoras**

Maíra Bueno Ariede

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de

**MESTRE**

**Orientador:** Prof. Dr. André Rolim Baby

**Coorientador:** Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2016

Maíra Bueno Ariede

Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em formulações  
cosméticas fotoprotetoras

Comissão Julgadora da Dissertação  
para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. André Rolim Baby  
Orientador / Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

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

Ariede, Maíra Bueno

A698a      Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em  
formulações cosméticas fotoprotetoras / Maíra Bueno Ariede. --  
São Paulo, 2016.

94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador : Baby, André Rolim

Co-orientador : Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Fator de proteção solar : Cosméticos 2. Antioxidantes  
3. Microalgas I. T. II. Baby, André Rolim, orientador. III. Carvalho,  
João Carlos Monteiro de, co-orientador.

668.55    CDD

## Dedicatória

Dedico esta dissertação

Aos meus pais, **Edson e Olga**

Às minhas irmãs, **Elouise e Eduarda**

Ao meu namorado, **Fernando**

## Agradecimentos

Agradeço imensamente aos meus pais, pela confiança, apoio e encorajamento, nunca me deixando desistir dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, por toda ajuda e cumplicidade.

Ao meu namorado, pelo companheirismo e estímulo.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. André Rolim Baby**, meus sinceros agradecimentos pela dedicação, confiança e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho**, pelo suporte, dicas e ensinamentos.

A **Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato**, por todos os conselhos e ajuda para a realização desta dissertação.

Aos técnicos do laboratório, **Claudinéia** e **Edgar**, por todo o apoio.

A todos os amigos da pós-graduação, pelos conselhos, experiência e ajuda: **Thalita, Ana, Thamires, Daniela, Camila, André, Michelli, Thayanne, Gabriela, Mirela, Letícia, Nádia, Alexandra, João, Eliane, Lina, Tércio, Caroline, Natália e Flávia.**

À CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

Aos funcionários da FCF-USP, em especial ao **David**, pelo enorme suporte.

Sou muitíssimo agradecida a todos que me acompanharam nessa trajetória, contribuindo para que este trabalho fosse concluído!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

ARIEDE, M. B. **Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em formulações cosméticas fotoprotetoras.** 2016. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diversos produtos tópicos são desenvolvidos a fim de se evitar os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (UV), dentre eles, os protetores solares constituídos por filtros físicos e/ou químicos. No entanto, os filtros químicos podem promover eventos adversos, razão pela qual a busca de ativos em fontes naturais tem-se mostrado de grande importância. A microalga *Botryococcus braunii* pode ser de potencial interesse em aplicações cosméticas, pois foi descrito que seu extrato aquoso apresentou redução da desidratação cutânea, induziu a produção do colágeno, bem como promoveu atividade antioxidante. Assim, o estudo visou analisar o auxílio da *B. braunii* na fotoproteção cutânea e na proteção da pele por meio da ação antioxidante *in vitro*. As formulações, constituídas de biomassa da microalga ou de seus extratos, acrescidas ou não de filtros, foram avaliadas quanto à: ação antioxidante, atividade fotoprotetora *in vitro* e fotoestabilidade. A *B. braunii* apresentou bom desempenho de crescimento, contendo lipídeos (25,65%) e proteínas (49,17%) em proporção semelhante à descrita na literatura. A presença de fenóis totais e a ação antioxidante foram analisadas nos extratos obtidos com clorofórmio, metanol e etanol 70%. O extrato obtido com etanol 70% foi o que apresentou maior concentração de fenóis totais (68,9 µg/mL de ácido cafeico), porém inferior ao relatado na literatura; e a ação antioxidante não foi considerada significativa ao se comparar com o padrão Trolox<sup>®</sup>. Nas formulações, os extratos foram considerados ineficientes para ação antioxidante. Quanto à atividade fotoprotetora *in vitro* e fotoestabilidade, a *B. braunii* não apresentou eficácia adequada, existindo, porém, a possibilidade de os extratos atuarem na região da luz visível e contribuírem contra os efeitos danosos provocados por esta radiação à pele.

Palavras-chave: microalga, *Botryococcus braunii*, fotoproteção, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

ARIEDE, M. B. **Application of the *Botryococcus braunii* microalgae extract in sunscreens**. 2016. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Several topical products are developed in order to avoid the harmful effects of ultraviolet (UV) radiation, including sunscreens made by physical and/or chemical filters. However, chemical filters may promote adverse events, which is why the search for actives from natural sources has proven to be of great importance. The microalgae *Botryococcus braunii* may be of potential interest in cosmetic applications, because it has been reported that its aqueous extract showed a reduction in skin dehydration, induced collagen production and promoted antioxidant activity. Thus, the study aimed to analyze the contribution of *B. braunii* in skin photoprotection and skin protection through *in vitro* antioxidant action. The formulations, consisting of biomass from the microalgae or their extracts, supplemented or not by filters, were evaluated for: antioxidant activity, photoprotective activity *in vitro* and photostability. The *B. braunii* showed good growth performance, containing lipids (25.65%) and protein (49.17%) in similar proportion to the described by the literature. The presence of phenolic compounds and antioxidant activity were analyzed in extracts obtained with chloroform, methanol and 70% ethanol. The extract obtained with 70% ethanol showed the highest concentration of total phenolics (68.9 mg/mL caffeic acid), but lower than that reported in the literature; and the antioxidant action was not considered significant when compared to the Trolox<sup>®</sup> standard. In the formulations, the extracts were considered inefficient for antioxidant action. In relation to the *in vitro* photoprotection activity and photostability, *B. braunii* did not provide adequate efficacy, however, there is a possibility that the extracts have an ability to act in the visible light region and contribute to the protection from the harmful effects caused by that radiation to the skin.

Keywords: microalgae, *Botryococcus braunii*, photoprotection, antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura molecular dos filtros avobenzona e <i>p</i> -metoxicinamato de octila (Adaptado de LHIAUBET-VALLET <i>et al.</i> , 2010).....                              | 5  |
| <b>Figura 2.</b> Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas no organismo humano em decorrência do estresse oxidativo (Adaptado de CHEN, HU, WANG, 2012).....                     | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Reação do DPPH com compostos antioxidantes (Adaptado TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2013).....   | 11 |
| <b>Figura 4.</b> <i>Botryococcus braunii</i> UTEX 2441 (25,2x).....   | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Fotobiorreator tubular do tipo <i>airflit</i> utilizado no cultivo da <i>B. braunii</i> .<br>.....   | 19 |
| <b>Figura 6.</b> Curva de calibração para determinação da concentração celular de <i>Botryococcus braunii</i> . ....  | 33 |
| <b>Figura 7.</b> Crescimento da <i>B. braunii</i> realizado em fotobiorreator tubular do tipo <i>airflit</i> em diferentes períodos. ....   | 34 |
| <b>Figura 8.</b> Curva analítica expressa em ácido cafeico ( $\mu\text{g/mL}$ ).....  | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico qualitativo dos extratos de <i>B. braunii</i> obtidos por diferentes solventes. ....   | 39 |
| <b>Figura 10.</b> Cromatograma do padrão Rutina. ....   | 41 |
| <b>Figura 11.</b> Estrutura molecular dos filtros avobenzona e <i>p</i> -metoxicinamato de octila (Adaptado de LHIAUBET-VALLET <i>et al.</i> , 2010).....                             | 48 |
| <b>Figura 12.</b> Curvas de absorvância das formulações F1 a F4, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR). .... | 50 |
| <b>Figura 13.</b> Curvas de absorvância das formulações F5 a F8, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR). .... | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Gráfico de Pareto ilustrando o efeito de cada variável e suas combinações para o resultado do FPS das formulações F5 a F8.....                                      | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Gráfico de efeitos principais para o FPS das formulações F5 a F8.   | 54 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16.</b> Curvas de absorvância das formulações F9 a F12, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR). ..... | 56 |
| <b>Figura 17.</b> Gráfico de Pareto ilustrando o efeito de cada variável e suas combinações para o resultado do FPS das formulações F9 a F12.....                                       | 57 |
| <b>Figura 18.</b> Gráfico de efeitos principais para o FPS das formulações F9 a F12. ....   | 57 |
| <b>Figura 19.</b> Gráfico de interações para o FPS das formulações fotoprotetoras com diferentes bases. ....  | 58 |
| <b>Figura 20.</b> Curvas de absorvância das formulações F13 a F20, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR). .... | 60 |
| <b>Figura 21.</b> Gráficos de efeitos principais o qual compara o FPS das formulações fotoprotetoras em relação aos extratos e processo de irradiação. ....                             | 62 |
| <b>Figura 22.</b> Varredura espectral dos diferentes extratos da <i>B. braunii</i> .....  | 63 |
| <b>Figura 23.</b> Potencial antioxidante dos extratos obtidos por diferentes solventes da microalga <i>B. braunii</i> .....   | 65 |
| <b>Figura 24.</b> Curva de inibição do radical livre DPPH pelo padrão de Trolox®. ...   | 66 |
| <b>Figura 25.</b> Atividade antioxidante das formulações F14 a F20 expressa em Trolox® (µg/mL). ....  | 67 |
| <b>Figura 26.</b> Gráficos de Efeitos principais de cada variável em relação à atividade antioxidante para os diferentes extratos. ....   | 68 |
| <b>Figura 27.</b> Gráficos de Interações para a atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras F14 a F20. ....   | 69 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1.</b> Composição do meio CHU utilizado no crescimento da <i>B. braunii</i> (PÉREZ-MORA <i>et al.</i> , 2016). ..... | 20 |
|--|----|

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição qualitativa e quantitativa (%) das formulações dermocosméticas (F1 a F20).....   | 27 |
| <b>Tabela 2.</b> Características físicas das formulações dermocosméticas.....  | 43 |
| <b>Tabela 3.</b> Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) <i>in vitro</i> das formulações F1 a F4 antes e após irradiação. ....   | 49 |
| <b>Tabela 4.</b> Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) <i>in vitro</i> das formulações F5 a F8 antes e após irradiação com incorporação da biomassa por espatulação..... | 52 |
| <b>Tabela 5.</b> Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) <i>in vitro</i> das formulações F9 a F12 antes e após irradiação. ....  | 55 |
| <b>Tabela 6.</b> Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) <i>in vitro</i> das formulações F13 a F20 antes e após irradiação. ....   | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURA

|                                     |   |   |
|-------------------------------------|---|---|
| $\lambda$                           | – | Comprimento de onda                                       |
| %                                   | – | Porcentagem   |
| °C                                  | – | Graus Celsius   |
| $\mu\text{m}$                       | – | Micrômetros   |
| <b>Abs</b>                          | – | Absorbância   |
| <b>cm</b>                           | – | Centímetro  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>               | – | Gás carbônico   |
| <b>DNA</b>                          | – | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| <b>ERO</b>                          | – | Espécie reativa de oxigênio                               |
| <b>FPS</b>                          | – | Fator de Proteção Solar                                   |
| <b>g</b>                            | – | Gramas  |
| <b>h</b>                            | – | Horas   |
| <b>HCl</b>                          | – | Ácido clorídrico  |
| <b>INCI</b>                         | – | <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> |
| <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | – | Fosfato de potássio                                       |
| <b>mg</b>                           | – | Miligrama   |
| <b>mL</b>                           | – | Mililitro   |
| <b>mm</b>                           | – | Milímetros  |
| <b>N</b>                            | – | Normalidade   |
| <b>NaNO<sub>3</sub></b>             | – | Nitrato de sódio  |
| <b>nm</b>                           | – | Nanômetros  |
| <b>pH</b>                           | – | Potencial hidrogeniônico                                  |
| <b>UV</b>                           | – | Ultravioleta  |

- UVA** – Ultravioleta A
- UVB** – Ultravioleta B
- UVC** – Ultravioleta C
- EC** – Extrato obtido com solvente Clorofórmio
- EM** – Extrato obtido com solvente Metanol
- EE** – Extrato obtido com solvente Etanol

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....   | 3  |
| 2.1. Radiação Ultravioleta .....  | 3  |
| 2.2. Defesas contra a ação da radiação ultravioleta .....                                     | 4  |
| 2.3. Análise da eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas .....                        | 6  |
| 2.4. Finalidade da incorporação de bioativos em protetores solares.....                       | 7  |
| 2.5. Estresse oxidativo e ação antioxidante .....   | 8  |
| 2.6. Avaliação da atividade antioxidante .....  | 10 |
| 2.7. Fontes de obtenção de compostos bioativos .....  | 11 |
| 2.8. Microalga <i>Botryococcus braunii</i> .....  | 13 |
| 3. OBJETIVOS.....   | 15 |
| 3.1. Objetivo geral .....   | 15 |
| 3.2. Objetivos específicos .....  | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 16 |
| 4.1. MATERIAL.....  | 16 |
| 4.1.1. Matérias-primas, reagentes e solventes .....   | 16 |
| 4.1.2. Equipamentos e dispositivos diversos .....   | 17 |
| 4.2. MÉTODOS .....  | 18 |
| 4.2.1. Crescimento e obtenção da biomassa seca da microalga <i>Botryococcus braunii</i> ..... | 18 |
| 4.2.2. Elaboração da Curva de Calibração de <i>Botryococcus braunii</i> .....                 | 21 |
| 4.2.3. Determinação de lipídeos totais.....   | 22 |
| 4.2.4. Determinação de proteínas totais.....  | 23 |
| 4.2.5. Obtenção dos extratos da microalga <i>B. braunii</i> .....                             | 24 |
| 4.2.6. Determinação de Fenóis Totais .....  | 24 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.7. Perfil dos extratos por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) .....  | 25 |
| 4.2.8. Preparo das formulações dermocosméticas antissolares .....   | 25 |
| 4.2.9. Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i> e fotoestabilidade de formulação contendo <i>B. Braunii</i> .....                          | 30 |
| 4.2.10. Determinação do potencial antirradicalar do extrato e da formulação contendo o extrato da <i>B. braunii</i> .....                 | 31 |
| 4.2.11. Análise estatística .....   | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 33 |
| 5.1. Determinação do crescimento da <i>B. braunii</i> .....   | 33 |
| 5.2. Determinação de lipídeos totais .....  | 35 |
| 5.3. Determinação de proteínas totais .....   | 35 |
| 5.4. Avaliação de fenóis totais .....   | 36 |
| 5.5. Perfil dos extratos por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) .  | 38 |
| 5.6. Preparo das formulações dermocosméticas antissolares .....   | 42 |
| 5.7. Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i> e fotoestabilidade de formulação contendo <i>B. braunii</i> .....                            | 47 |
| 5.7.1. Avaliação do FPS e comprimento de onda crítico das formulações contendo a incorporação da biomassa seca de <i>B. braunii</i> ..... | 47 |
| 5.7.2. Avaliação do FPS e comprimento de onda crítico das formulações contendo a incorporação de extratos de <i>B. braunii</i> .....      | 58 |
| 5.8. Determinação do potencial antirradicalar do extrato e da formulação contendo o extrato da <i>B. braunii</i> .....                    | 64 |
| 6. CONCLUSÕES .....   | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS.....   | 73 |
| 8. ANEXOS .....   | 90 |

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos organismos, por consequência da exposição à radiação ultravioleta (UV), desenvolvem mecanismos de defesa a fim de diminuir os danos provocados por essa radiação, tais como a expressão e regulação de enzimas antioxidantes, a reparação molecular e a síntese de compostos com ações fotoprotetoras – como flavonoides, encontrados em plantas diversas; melanina, produzida em animais e humanos; micosporina, presente em fungos; e aminoácido do tipo micosporina, detectado em cianobactérias, algas e animais (PALLELA, NA-YOUNG, KIM, 2010; ROJAS, LONDOÑO, CIRO, 2016; SHICK, DUNLAP, 2002; SINHA, SINGH, HÄDER, 2007; SUH *et al.*, 2014).

Compreendendo que a radiação UV é capaz de promover diversos danos à pele – entre eles o fotoenvelhecimento, caracterizado pela formação de rugas profundas e pigmentação anormal, e o câncer –, inúmeros estudos possuem por objetivo desenvolver formulações tópicas que contemplam substâncias ativas antioxidantes com ação fotoprotetora, as quais podem ser incorporadas a filtros solares UV, a fim de evitar tais prejuízos provocados pela radiação (GASPAR, CAMPOS, 2007; ROJAS, LONDOÑO, CIRO, 2016; SAEWAN, JIMTAISONG, 2015).

Diante da possibilidade de encontrar novos compostos com ação protetora, as indústrias vêm empregando pesquisas envolvendo componentes naturais para o desenvolvimento de produtos cosméticos, principalmente a partir de espécies do Reino Vegetal, por apresentarem moléculas ativas que podem contribuir para o combate aos danos causados à pele e, também, pela atual preferência dos consumidores por produtos naturais – ecológicos e produzidos de forma sustentável – em detrimento aos produtos sintéticos. Dessa forma, algumas algas e, principalmente, micro-organismos fotossintetizantes, que são organismos unicelulares procarióticos (cianobactérias) ou eucarióticos (microalgas), são utilizados como fontes primárias para a obtenção de componentes bioativos, atuando como ingredientes funcionais, podendo ser encontrados em suas composições carotenoides, ácidos graxos, polissacarídeos, peptídeos, vitaminas e esteróis. Adicionalmente, existe vantagem no uso de microalgas, em comparação às plantas, para a análise de compostos, uma vez que apresentam maior

eficiência de conversão fotossintética da luz solar, garantindo um rendimento superior, além de permitir a realização de manipulação e direcionamento de suas vias biossintéticas, por meio de alterações nas condições de cultivo, para a produção e acúmulo de componentes necessários ou de interesse (ANTIGNAC *et al.*, 2011; BUONO *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2008; SAEWAN, JIMTAISONG, 2015; WANG *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2009).

Atualmente, já se encontram no mercado produtos cosméticos que contêm microalgas para uso tópico e capilar, bem como diversas patentes que relatam a ação de microalgas – utilizando suas células, seus componentes ou mesmo seus extratos – em produtos de caráter cosmético (HAGINO, SAITO, 2010; HUNER *et al.*, 2004; LOTAN, 2012).

A microalga *Botryococcus braunii* – que é caracterizada por sua capacidade de produzir longas cadeias insaturadas de hidrocarbonetos, representando mais do que 75% de sua massa seca – pode ser uma alternativa para o uso em cosméticos, pois verificou-se que o seu extrato aquoso foi capaz de produzir, *in vitro*, redução da desidratação cutânea, que influencia na aparência, no metabolismo, nas propriedades mecânicas e na função de barreira da pele; induzir a síntese de colágeno; estimular a diferenciação de adipócitos; e promover atividade antioxidante e anti-inflamatória. Além disso, ficou comprovado, por meio do teste de citotoxicidade em células do tipo NIH3T3, em queratinócitos HaCaT e em MSC, que o extrato aquoso nas concentrações de 0,1 a 0,0025% não apresentou alteração na viabilidade celular. Neste sentido, seu uso para fins cosméticos se mostrou possivelmente viável (BUONO *et al.*, 2012).

Considerando o potencial desta microalga para uso cosmético e a escassez de estudos sobre sua aplicação nesta área, a proposta do presente trabalho envolveu o cultivo de *Botryococcus braunii* e posterior análise da sua ação em formulações cosméticas fotoprotetoras, a fim de verificar sua influência na eficácia *in vitro* da formulação contra a radiação ultravioleta (UVA/UVB), bem como avaliar sua ação antioxidante potencial.

*Revisão da Literatura*

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) é um dos principais fatores externos que provocam malefícios à pele e ao organismo humano, dentre eles os danos ao DNA, a produção de radicais livres, a queimadura, o envelhecimento cutâneo precoce e, até mesmo, o câncer de pele (ARAUJO, SOUZA, 2008; PERES *et al.*, 2015; ROJAS, LONDOÑO; CIRO, 2016).

De acordo com o comprimento de onda, o espectro da radiação UV é subdividido em três bandas: UVA, UVB e UVC. Os raios UVA apresentam comprimento de onda de 320 – 400 nm e, por terem maior poder de penetração, são capazes de atingir tanto a epiderme quanto a derme. Este tipo de radiação, devido à sua capacidade de reagir com o oxigênio molecular, promove a indução de processos oxidativos, com a formação de espécies reativas que podem desencadear processos inflamatórios na pele, fotoenvelhecimento e danos ao DNA. Tal radiação apresenta incidência independente da camada de ozônio, mantendo sua intensidade constante ao longo do dia e nas diferentes estações do ano. Por apresentar não uniformidade ao longo da região em que se encontra, a radiação UVA foi subdividida em UVA I (menos eritematosa e comprimento de onda compreendido entre 340 – 400 nm) e UVA II (mais eritematosa e fotossensibilizante, com comprimento de onda entre 320 – 340 nm) (CESTARI, OLIVEIRA, BOZA, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; JANSEN *et al.*, 2013a; LEVI, 2013; LORENCINI *et al.*, 2014; POPIM *et al.*, 2008; SKOTARCZAK *et al.*, 2015; TOFETTII, OLIVEIRA, 2010).

A radiação UVB, por sua vez, possui comprimento de onda de 290 – 320 nm, sendo capaz de penetrar a epiderme e provocar danos diretos ao DNA, fotoimunossupressão, eritema, melanogênese e indução ao câncer. Já a radiação UVC possui menor intervalo de comprimento de onda (100 – 290 nm), sendo fortemente mutagênica, carcinogênica e capaz de provocar alteração na queratinização da pele. No entanto, esta é barrada na camada de ozônio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; HUPEL, POUPART, GALL, 2011; JANSEN *et al.*,

2013a; LEVI, 2013; POPIM *et al.*, 2008; SKOTARCZAK *et al.*, 2015; TOFETTII, OLIVEIRA, 2010).

## 2.2. Defesas contra a ação da radiação ultravioleta

O organismo humano possui mecanismos para evitar os efeitos nocivos provocados pela radiação UV, como a produção de melanina, que é uma molécula capaz de converter a energia da radiação UV em calor; a presença de antioxidante endógeno para remover radicais livres; e o espessamento da camada córnea. No entanto, esses mecanismos podem não ser suficientes para evitar os efeitos deletérios da radiação UV em caso de exposição excessiva, sendo essencial o uso de protetores solares, pois estes possuem em sua composição filtros que tem por finalidade agir contra a radiação UV incidente, devendo apresentar, segundo os órgãos reguladores ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (Food and Drug Administration), amplo espectro de ação, para garantir a defesa na região UVA e UVB (ARAUJO, SOUZA, 2008; BRASIL, 2012; CESTARI, OLIVEIRA, BOZA, 2012; GASPAR *et al.*, 2013; JANSEN *et al.*, 2013a; SAMBANDAN, RATNER, 2011; UNITED STATES, 2011).

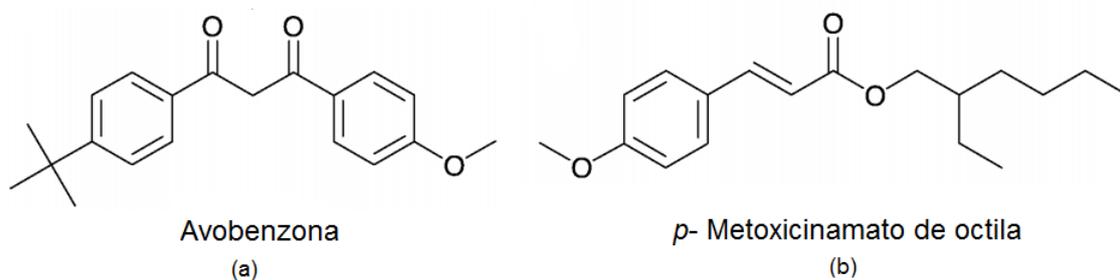
Assim, os fotoprotetores podem ser constituídos por filtros inorgânicos (físicos) – que formam barreira sobre a pele, refletindo ou dispersando a radiação UV, como dióxido de titânio e o óxido de zinco – e/ou filtros orgânicos (químicos), que, por possuírem um grupamento carbonila acoplado a um anel aromático, são capazes de absorver a radiação UV, fenômeno que provoca ressonância na molécula, resultando na conversão da radiação de alta energia em uma mais inócua, como na forma de calor, por exemplo (CESTARI, OLIVEIRA, BOZA, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; PALM, O'DONOGHUE, 2007; SAEWAN, JIMTAISONG, 2015; SCHLUMPF *et al.*, 2004).

A maioria dos protetores solares apresentam no mínimo dois filtros UV, sendo um de ação na região UVA e o outro na região UVB. No entanto, a presença destes diferentes filtros pode acarretar em uma decomposição mais acelerada dos ativos, como é o caso dos filtros avobenzona (*Butyl methoxydibenzoylmethane*) e *p*-metoxicinamato de octila (*Ethylhexyl methoxycinnamate*), que são compostos que sofrem interação quando

associados em uma formulação (ARAUJO, SOUZA, 2008; GASPAR *et al.*, 2013; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010; SAEWAN, JIMTAISONG, 2015; SAMBANDAN, RATNER, 2011).

A avobenzona (AVO), **Figura 1a**, é um filtro químico com ação na região UVA altamente fotoinstável e amplamente utilizado em formulações cosméticas. Este filtro sofre significativa degradação, cerca de 50 a 60% de perda de suas propriedades, quando exposto à radiação UV (AFONSO *et al.*, 2014; ARAUJO, SOUZA, 2008; GASPAR *et al.*, 2013; SAMBANDAN, RATNER, 2011).

**Figura 1.** Estrutura molecular dos filtros avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila (Adaptado de LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010).



A AVO é comumente associada a filtros UVB nas formulações cosméticas – especialmente com o filtro *p*-metoxicinamato de octila (OMC), **Figura 1b**, que apresenta ação eficiente na região UVB, mesmo sendo conhecida a interação fotoinstável entre estes filtros. Assim, para evitar tal interação, ao associar a AVO com o OMC na formulação geralmente é utilizado um composto para conferir maior estabilidade, como o uso do octocrileno (*Octocrilene*) – amplamente reconhecido por retardar a degradação da AVO – ou de compostos antioxidantes, que são uma nova tendência cosmética, uma vez que estudos têm avaliado o benefício da combinação destes compostos em protetores solares (AFONSO *et al.*, 2014; FREITAS, LOPES, GASPAR, 2015; GASPAR *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010; PERES *et al.*, 2015; SAMBANDAN, RATNER, 2011).

### 2.3. Análise da eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas

A eficiência dos protetores solares pode ser avaliada *in vitro* e *in vivo* por diversas técnicas que consideram os seguintes parâmetros: fator de proteção solar (FPS), que indica a capacidade da formulação em inibir a formação do eritema provocado pela radiação UVB; fator de proteção UVA (UVA-PF), que avalia a proteção contra a radiação UVA; e o comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ), que fornece a amplitude de proteção considerando o espectro completo da radiação UV (HUPEL, POUPART, GALL, 2011; UNITED STATES, 2011).

Para avaliar a ação protetora da formulação, primeiramente é realizado teste *in vitro*, pois fornece um perfil de como o protetor se comporta, sendo mais rápido, evitando o uso desnecessário de voluntários e permitindo o aperfeiçoamento das formulações previamente à sua submissão aos testes clínicos (GAROLI *et al.*, 2009; HUPEL, POUPART, GALL, 2011).

Um dos métodos utilizados, aprovado pelos órgãos regulatórios ANVISA e FDA, consiste em mensurar o FPS por meio da transmitância espectral ao aplicar a formulação fotoprotetora em um suporte que mimetiza a pele, como as placas de PMMA (polimetilmetacrilato). O FPS da formulação é obtido por meio de cálculos matemáticos após esta ser submetida à análise espectrofotométrico de refletância difusa, sendo possível ter, ao final, uma perspectiva da atuação do protetor solar (COSMETICS EUROPE, 2011; GAROLI *et al.*, 2009; HUPEL, POUPART, GALL, 2011).

No entanto, a formulação só é considerada adequada após a determinação do FPS *in vivo*. Para isto, um teste que visa observar a proteção proporcionada pelo produto contra a formação de eritema é realizado em voluntários, os quais são expostos à radiação UVB gerada por um simulador solar que emite ondas de 290 a 400 nm, com limite total de irradiação de 1500 W/m<sup>2</sup>. No teste, é considerado o efeito decorrente da primeira reação eritematogena perceptível e com bordas claramente definidas, provocada pela radiação. Após a análise, o FPS é determinado ao comparar a dose eritematogena mínima (DEM) da pele protegida com o protetor solar com a DEM da pele não protegida (ALI *et al.*, 2014; BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011).

Para a avaliação do comprimento de onda crítico e UVA-PF, apesar de existir uma forma de avaliação *in vivo*, são predominantemente realizados ensaios *in vitro*, por serem validados, sendo ultimamente utilizado o método espectrofotométrico de refletância difusa acoplado à esfera de integração, que apresenta faixa espectral de 250 a 450nm, capaz de processar os dados de transmitância em cada comprimento de onda e transformá-los em parâmetros de eficácia fotoprotetora (BRASIL, 2012; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; UNITED STATES, 2011).

#### **2.4. Finalidade da incorporação de bioativos em protetores solares**

Apesar de os protetores solares atuarem contra os efeitos prejudiciais à pele, atualmente nota-se a ocorrência de eventos adversos ocasionados pelo uso tópico de grandes quantidades de filtros químicos – como a ocorrência de dermatite de contato fotoalérgica ou fototóxica, provavelmente devido à subprodutos formados a partir da degradação dos filtros –, o que culminou no desenvolvimento de formulações com reduzidas concentrações destes filtros, visando, no entanto, a manutenção da ampla proteção frente às radiações UVA e UVB (AFONSO *et al.*, 2014; GASPAR *et al.*, 2013; HUPEL, POUPART, GALL, 2011; PEREIRA *et al.*, 2015; PERES *et al.*, 2015; VELASCO *et al.*, 2012).

Assim, podem ser associados às formulações compostos naturais ou bioativos com o propósito de aumentar a eficácia fotoprotetora, visto que existem componentes que apresentam semelhança à estrutura química dos filtros orgânicos que possivelmente podem auxiliar na atividade fotoprotetora da formulação – o aminoácido do tipo micosporina, encontrado em microalgas, macroalgas e cianobactérias, é um exemplo de substância bioativa, por ser capaz de absorver a radiação UV no comprimento de onda na faixa de 310 a 360 nm, dispersando-a sem promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) – e compostos com ação antioxidante, como polifenóis, que podem contribuir juntamente com os filtros para evitar os efeitos nocivos da luz UV ou mesmo auxiliar na fotoestabilidade dos filtros, resultando no aumento do FPS da formulação sem a necessidade de empregar agentes UV adicionais

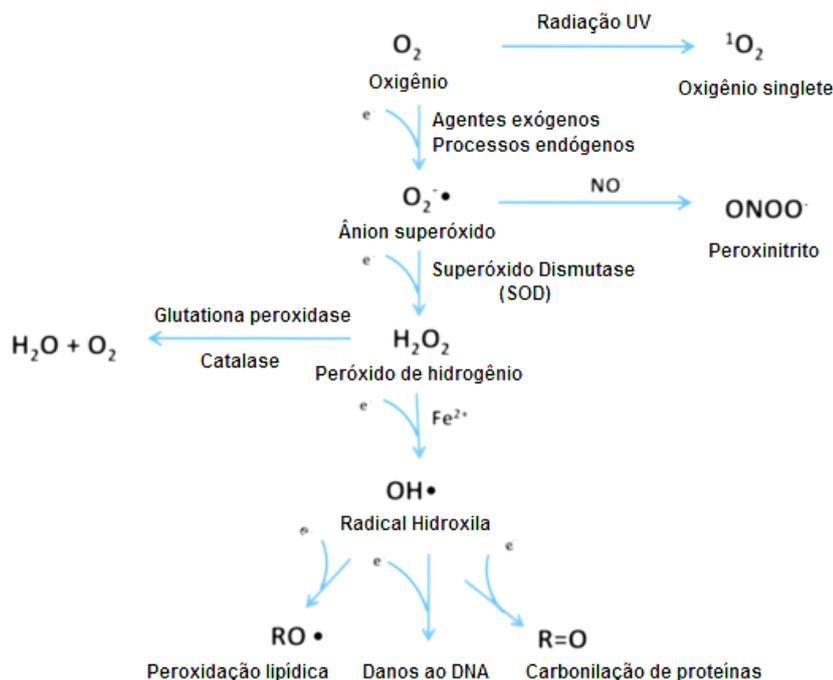
(AFONSO *et al.*, 2014; BADEA *et al.*, 2015; GASPAR *et al.*, 2013; HUPEL, POUPART, GALL, 2011; MARTORANA *et al.*, 2013; NISHIKAWA *et al.*, 2013; OREN; GUNDE-CIMERMAN, 2007; PERES *et al.*, 2015; VELASCO *et al.*, 2012).

## 2.5. Estresse oxidativo e ação antioxidante

O estresse oxidativo está relacionado à produção de radicais livres potencialmente nocivos, podendo provocar uma variedade de patologias, incluindo doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatórias, artrite reumatoide, aterosclerose e indução de câncer (CAROCHO, FERREIRA, 2013; CHEN, BERTIN, FROLDI, 2013; KRISHNAIAH, SARBATLY, NITHYANANDAM, 2011; SARANYA *et al.*, 2014).

Os radicais livres (RL) são moléculas que apresentam em sua estrutura elétrons desemparelhados. Estas substâncias podem ser formadas a partir de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre. As espécies reativas de oxigênio (EROS), demonstrada na **Figura 2**, porém, são predominantemente encontradas no nosso organismo, sendo capazes de oxidar compostos ao doar elétrons e, com isso, provocar danos ao DNA, proteínas, inativar enzimas e induzir a peroxidação lipídica, contribuindo para o fotoenvelhecimento cutâneo e o câncer de pele.

**Figura 2.** Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas no organismo humano em decorrência do estresse oxidativo (Adaptado de CHEN, HU, WANG, 2012).



As EROs podem ser produzidas naturalmente a partir do metabolismo ou ser oriundas de fatores externos, como o ato de fumar, a poluição e a radiação UV, existindo maior formação de radicais livres na região espectral da radiação UVA em relação à região UVB (CAROCHO, FERREIRA, 2013; CEFALI *et al.*, 2016; CHEN, HU, WANG, 2012; FREITAS, LOPES, GASPAR, 2015; SIERRA *et al.*, 2013).

A fim de combater essas espécies reativas de oxigênio, o organismo humano desenvolveu defesas oriundas de reações enzimáticas ou não enzimáticas. Entre os compostos antioxidantes sintetizados pelo organismo capazes de neutralizar os radicais livres encontram-se a vitamina A, o ácido úrico e a coenzima Q10 (ubiquinona). As principais enzimas envolvidas no processo de proteção são: glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. As duas primeiras enzimas são responsáveis pela eliminação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a última pela conversão do radical superóxido volátil em peróxido de hidrogênio menos volátil. No entanto, essas defesas não evitam eficazmente a formação de EROS com a exposição em excesso à radiação solar, resultando em danos ao organismo (ALAM, BRISTI,

RAFIQUZZAMAN, 2013; CAROCHO, FERREIRA, 2013; CEFALI *et al.*, 2016; CHEN, HU, WANG, 2012; ORESAJO *et al.*, 2012).

Assim, como a radiação solar, principalmente a radiação UVA, é um dos principais fatores exógenos responsáveis pela geração de radicais livres – como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila que são produzidos após 15 minutos de exposição à radiação UV – tem-se estimulado o uso de protetores solares (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; JANSEN *et al.*, 2013b; KAWAKAMI, GASPAR, 2015; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013).

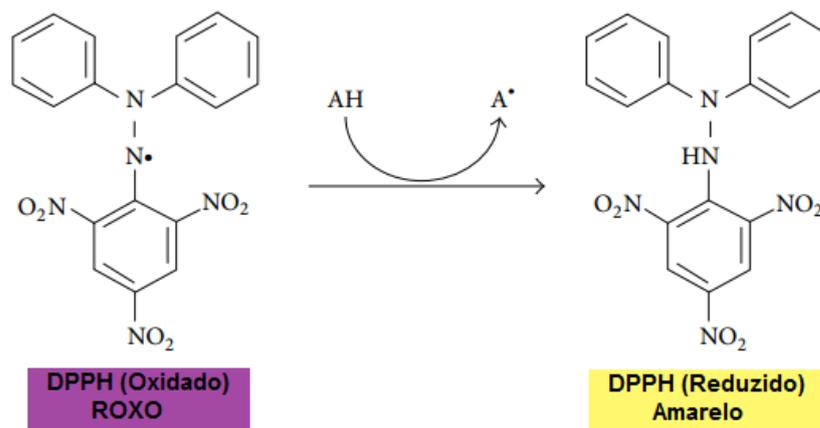
Não obstante, estudos têm demonstrado que somente o uso do protetor solar não é efetivo contra os efeitos danosos provocados pela radiação solar, assim os antioxidantes – substâncias conhecidas por sua “capacidade de atrasar, prevenir ou remover espécies reativas” que provocam danos oxidativos ao organismo – têm sido incorporados a protetores solares com o intuito de neutralizar os efeitos citotóxicos de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerados pela exposição à radiação UV ou mesmo pela fotodegradação dos filtros sintéticos presentes na formulação, tendo recebido especial atenção os compostos obtidos de fontes naturais, por estes apresentarem, em geral, nenhum prejuízo à saúde humana, baixo custo, versatilidade, além de serem obtidos de fontes renováveis (CAMPANINI *et al.*, 2014; CHEN, HU, WANG, 2012; CHIARI *et al.*, 2014; FREITAS, LOPES, GASPAR, 2015; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; JANSEN *et al.*, 2013b; KAWAKAMI, GASPAR, 2015; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013).

## **2.6. Avaliação da atividade antioxidante**

Existe atualmente uma infinidade de métodos para avaliar a atividade antioxidante. No entanto, a técnica mais amplamente conhecida e utilizada para quantificar a atividade antioxidante de determinado composto, principalmente quando se trata da ação antioxidante de extratos de plantas, emprega o uso do radical livre DPPH• (*1,1-diphenyl-2-pic-rylhydrazy*). Este método é baseado em uma reação direta entre o radical e um composto antioxidante, que permite observar a capacidade de os compostos antioxidantes reduzirem o radical DPPH por meio da detecção da queda da absorvância em espectrofotômetro, identificada pela alteração da coloração

roxa para amarela (**Figura 3**). O DPPH é um radical capaz de reagir com compostos que podem doar átomos de hidrogênio, apresentando comprimento de onda máximo entre 515 – 520 nm (CAROCHO, FERREIRA, 2013; CHEN, BERTIN, FROLDI, 2013; DENG, CHENG, YANG, 2011; KRISHNAIAH, SARBATLY, NITHYANANDAM, 2011; NOIPA *et al.*, 2011).

**Figura 3.** Reação do DPPH com compostos antioxidantes (Adaptado TEIXEIRA *et al.*, 2013).



Apesar do uso frequente do radical livre DPPH para analisar a ação antioxidante de amostras, deve-se tomar cuidados durante a análise em relação a alguns parâmetros, como exposição à luz, diferença de valor de pH, tempo de reação – que deve ser adequado para ocorrer o total equilíbrio da reação –, padronização do solvente – uma vez que já foi constatado que ao realizar o teste com extratos obtidos da mesma planta em diferentes solventes são obtidos resultados diferentes –, e quantidade de amostra (DAWIDOWICZ, WIANOWSKA, OLSZOWY, 2012; NOIPA *et al.*, 2011; SHARMA, BHAT, 2009).

## 2.7. Fontes de obtenção de compostos bioativos

Compostos naturais são produzidos por diversas fontes biológicas, como plantas, animais e micro-organismos. Estes compostos são denominados metabólitos secundários, pois não estão envolvidos diretamente no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, atuando principalmente em relação a defesas, como proteção de efeitos deletérios externos (MARTINS *et al.*, 2014).

Estes metabólitos, portanto, passaram a ser de grande interesse para a indústria cosmética, sendo muitas vezes obtidos a partir de extratos de plantas e algas por apresentarem, entre outros, compostos bioativos antioxidantes (BAYDAR, BAYDAR, 2013; LEE *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014).

As plantas terrestres são muito utilizadas para obter compostos ativos. Dentre os compostos secundários encontrados em plantas, os fenólicos são considerados um dos principais constituintes que possuem ação antioxidante, por conterem em suas moléculas dois grupos hidroxilas e um anel aromático, sendo que, já se verificou que há proteção contra os efeitos provocados pela radiação UV ao incorporar espécies que contêm grande quantidade deste componente em formulações para uso tópico (GOIRIS *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2014, 2016; MARTORANA *et al.*, 2013; SKOTARCZAK *et al.*, 2015).

Recentemente, as microalgas têm recebido crescente atenção como potencial fonte de obtenção de bioativos para uso em produtos cosméticos devido à possibilidade de modular seus metabolismos para obter compostos de interesse e ao fato de apresentarem grande variedade de componentes que podem promover ação antioxidante e proteção contra a radiação UV (CHOOCHOTE, SUKLAMPOO, OCHAIKUL, 2014; GOIRIS *et al.*, 2012; MAADANE *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015).

A ação antioxidante das microalgas tem sido relacionada à presença de compostos fenólicos e carotenoides. No entanto, atribui-se a referida ação mais aos carotenoides, pois, apesar de alguns estudos já terem relatado classes de flavonoides, ainda há pouca informação sobre a presença de substâncias fenólicas em microalgas (CHOOCHOTE; SUKLAMPOO, OCHAIKUL, 2014; GOIRIS *et al.*, 2012; MAADANE *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2014; SAFAFAR *et al.*, 2015; SARANYA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; WARD, 2016).

Assim, por possuírem imensa biodiversidade, as microalgas representam uma das maiores fontes naturais de antioxidantes e, embora não esteja completamente esclarecida a importância da ação antioxidante dos compostos fenólicos, já foi constatado que quando a microalga é exposta à radiação UV ocorre um aumento da concentração destes compostos em sua composição, indicando que estas substâncias podem desempenhar alguma ação antioxidante frente a este estresse (GOIRIS *et al.*, 2012; SAFAFAR *et al.*, 2015; SARANYA *et al.*, 2014; WARD, 2016).

## 2.8. Microalga *Botryococcus braunii*

*B. braunii* (Figura 4) é uma microalga fotossintetizante unicelular que pertence à família *Chlorophyceae* (chlorophyta), comumente encontrada em águas doces, salobras, lagos e represas de todos os continentes, conhecida por sua habilidade de sintetizar e acumular uma variedade de lipídeos que auxiliam na função barreira da pele. Este acúmulo está relacionado ao armazenamento de lipídeos no espaço extracelular (parede celular) e intracelular, diferentemente de outras microalgas já analisadas, que apresentaram os lipídeos apenas em seus citoplasmas (BANERJEE *et al.*, 2002; DAYANANDA *et al.*, 2007a; DEMURA *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2004; FURUHASHI *et al.*, 2016a; HIROSE *et al.*, 2013; METZGER, LARGEAU, 2005; PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

**Figura 4.** *Botryococcus braunii* UTEX 2441 (25,2x).



Esta microalga cresce formando colônias irregulares de 30  $\mu\text{m}$  a 2 mm de tamanho, sendo constituídas por células elípticas de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro e comprimento de 2,5 a 8  $\mu\text{m}$ . Suas células são unidas por uma matriz mucilaginosa transparente, sendo possível existirem várias colônias ligadas umas às outras por meio de finos fios hialinos (ACHITOUV *et al.*, 2004; LI, QIN, 2005; PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

Sabe-se que para o crescimento e formação dos produtos da microalga *B. braunii*, em cultura, é necessária a presença de água, luz,  $\text{CO}_2$ , quantidade e qualidade de nutrientes inorgânicos, bem como controle do valor de pH do meio,  $\text{CO}_2$ , salinidade, temperatura e intensidade de luz, uma vez que o

excesso de irradiação pode provocar danos às células. Em relação aos nutrientes, é de fundamental importância o controle da quantidade de nitrogênio e fósforo presente na água, tendo em vista que estes elementos influenciam diretamente no crescimento da microalga e, portanto, a escassez de qualquer um deles prejudica o seu desenvolvimento. De acordo com o meio de crescimento, a *B. braunii* pode ser classificada em três tipos relacionados às características dos hidrocarbonetos formados, quais sejam: (i) tipo A, que compreende n-alcadienos e mono-, tri-, tetra-, e pentanos, que são derivados de ácidos graxos de C<sub>23</sub> a C<sub>33</sub>; (ii) tipo B, que produz hidrocarbonetos triterpenoides conhecidos como botriococenos (C<sub>30</sub>-C<sub>37</sub>); e (iii) tipo L, que produz tetraterpenoides (C<sub>40</sub>) (AL-HOTHALY *et al.*, 2016; BANERJEE *et al.*, 2002; DAYANANDA *et al.*, 2007a, 2007b; FURUHASHI *et al.*, 2016b; KOLLER *et al.*, 2012; METZGER, LARGEAU, 2005; XIN *et al.*, 2010).

Esta microalga, além da presença dos hidrocarbonetos, também contém em sua composição os carotenoides, que apresentam ação antioxidante e, portanto, são capazes de eliminar os radicais livres, prevenindo os danos oxidativos às células e tecidos. Nos tipos B e L, este composto é mais pronunciado, havendo a produção do β-caroteno, da luteína e da neoxantina. No entanto, a luteína é o componente mais encontrado na fase estacionária, correspondendo de 22 a 29% dos carotenoides. Apesar de apresentar diferentes compostos, esta microalga ainda é muito utilizada na produção de biocombustível devido à sua habilidade de produzir grandes quantidades de hidrocarboneto (BANERJEE *et al.*, 2002; FURUHASHI *et al.*, 2016b; RAO *et al.*, 2006, 2007, 2010).

Apesar de a presença dos carotenoides serem maiores nas linhagens B e L, estudos já avaliaram que a linhagem A desta microalga é capaz de aumentar a quantidade deste composto, bem como de sua biomassa, quando seu crescimento é realizado com baixos níveis de salinidade. Ademais, foi constatado que em sua composição também é possível encontrar compostos fenólicos, que podem contribuir na ação de produtos cosméticos que buscam evitar danos à pele. Tais ações, no entanto, foram pouco estudadas até o momento, o que torna a *B. braunii* de grande interesse para a pesquisa de novos bioativos em formulações cosméticas (BUONO *et al.*, 2012; GOIRIS *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2007).

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente trabalho empregou a biomassa ou extrato da microalga *Botryococcus braunii* em formulações dermocosméticas fotoprotetoras na qualidade de potencial composto bioativo.

#### 3.2. Objetivos específicos

- (i) Realização do cultivo da microalga e análise de seus componentes na biomassa seca (lipídeos e proteínas totais).
- (ii) Preparo dos extratos com solventes distintos a partir da biomassa seca da microalga e análise da presença de fenóis totais.
- (iii) Preparo e caracterização física das formulações fotoprotetoras.
- (iv) Determinação da ação antioxidante dos extratos e das formulações dermocosméticas.
- (v) Avaliação da ação fotoprotetora *in vitro* e da fotoestabilidade funcional das formulações, acrescidas ou não da biomassa ou extrato da microalga *B. braunii*.

# *Material e Métodos*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Matérias-primas, reagentes e solventes

- Ácido bórico PA – Synth<sup>®</sup>
- Ácido cafeico pureza 98,0% – Sigma - Aldrich<sup>®</sup>
- Ácido cítrico PA – Synth<sup>®</sup>
- Ácido clorídrico PA – Synth<sup>®</sup>
- Ácido sulfúrico PA – Synth<sup>®</sup>
- Álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado(10 OE) (*Cetearyl Alcohol, Dicetyl Phosphate e Ceteth-10 Phosphate*) – Crodafos<sup>®</sup> CES, Mapric<sup>®</sup>
- Avobenzona (*Butyl methoxydibenzoylmethane*) – Fragon<sup>®</sup>
- Carbonato de sódio P.A. – Synth<sup>®</sup>
- Cepas da *Botryococcus braunii* UTEX 2441 – Universidade do Texas
- Citrato férrico – Vetec<sup>®</sup> Química Fina
- Cloreto de cálcio PA – Synth<sup>®</sup>
- Cloreto de cobalto PA – Synth<sup>®</sup>
- Cloreto de manganês PA – Synth<sup>®</sup>
- Clorofórmio PA – Synth<sup>®</sup>
- Co-polímero do ácido sulfônico acriloidimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (*ammonium cryloyldimethyltaurate/VP copolymer*) – Aristoflex<sup>®</sup> AVC, Pharmaspecial<sup>®</sup>
- DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) – Sigma Aldrich<sup>®</sup>
- EDTA sal dissódico PA – Synth<sup>®</sup>
- Etanol PA – Synth<sup>®</sup>
- Éter de petróleo PA – Synth<sup>®</sup>
- Fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno – Phenova<sup>®</sup>, Mapric<sup>®</sup>
- Folin-Ciocalteu – Dinâmica<sup>®</sup>
- Fosfato de potássio bibásico anidro PA – Synth<sup>®</sup>

- Hidróxido de sódio P.A. – Synth<sup>®</sup>
- Metanol grau cromatográfico - Merck<sup>®</sup>
- Metanol PA – Synth<sup>®</sup>
- Nitrato de sódio PA – Synth<sup>®</sup>
- *p*-metoxicinamato de octila (*Ethylhexyl methoxycinnamate*) – Fragon<sup>®</sup>
- Propilenoglicol – Mapric<sup>®</sup>
- Rutina trihidratada pureza 97,1% – Sigma - Aldrich<sup>®</sup>
- Sódio molibdato PA – Synth<sup>®</sup>
- Sulfato cúprico ou de cobre PA – Dinâmica<sup>®</sup>
- Sulfato de magnésio PA – Synth<sup>®</sup>
- Sulfato de potássio PA – Synth<sup>®</sup>
- Sulfato de zinco PA – Synth<sup>®</sup>
- Triglicérides de ácido cáprico (e) caprílico – Crodamol<sup>®</sup> GTCC, Mapric<sup>®</sup>
- Trolox (*tetramethylchroman-2-carboxylic acid*) – pureza 97% – Sigma - Aldrich<sup>®</sup>

#### 4.1.2. Equipamentos e dispositivos diversos

- Agitador mecânico - IKA<sup>®</sup> RW 20n
- Banho de ultrassom – Unique<sup>®</sup> UltraCleaner 1600<sup>a</sup>
- Bloco digestor – Tecnal<sup>®</sup> TE007D
- Câmara de fotoestabilidade - Atlas Suntest<sup>®</sup> CPS+
- Centrífuga – Cientec<sup>®</sup> CT-6000 R
- Centrífuga - Hitachi<sup>®</sup> RX2
- Centrífuga – Sorval<sup>®</sup> RC-5C Plus
- Coluna de fase reversa C-18, CLC-C8(M), com 4,6mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5µm – Shimadzu<sup>®</sup>
- Controle pH do meio – Mettler Toledo<sup>®</sup> M300
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution - Shimadzu<sup>®</sup>

- Espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração – Labsphere<sup>®</sup> UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*
- Espectrofotômetro – FEMTO<sup>®</sup> 600 plus, munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico
- Espectrofotômetro UV-Visível – Thermo Scientific<sup>®</sup> Evolution 600, munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a um sistema computacional
- Estufa – Fanem<sup>®</sup> 320E
- *Freezer* – Consul<sup>®</sup> *Facilite Frost Free*
- *Freezer* – Eletrolux<sup>®</sup> H400
- Homogeneizador de Solução Ap-22 – Phoenix<sup>®</sup>
- Membrana filtrante com abertura 0,45 µm (Milipore<sup>®</sup>)
- Rotaevaporador – Fisatom<sup>®</sup> 801
- Rotaevaporador RV10 digital, com banho de aquecimento – IKA<sup>®</sup>
- *Shaker* – Infors HT<sup>®</sup> multitron
- Tamis – Granutest<sup>®</sup> 0,42 mm

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Crescimento e obtenção da biomassa seca da microalga *Botryococcus braunii*

As cepas de *Botryococcus braunii* UTEX 2441 (Linhagem A), provenientes da Universidade do Texas, foram cultivadas em meio CHU (**Quadro 1**), utilizando sistemas devidamente estéreis. Inicialmente, a microalga foi mantida em frascos de Erlenmeyer sob agitação constante em *shaker* (Infors HT<sup>®</sup> multitron), à temperatura de 25±1 °C, até o meio possuir concentração celular de 200mg/L, aproximadamente. Posteriormente, as células passaram a ser cultivadas, por meio de processo descontínuo alimentado, em fotobiorreator tubular do tipo *airlift*, desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (**Figura 5**), com controle do valor de pH em 7,8±0,2 com uso de gás

carbônico e temperatura de  $25 \pm 1$  °C (EROGLU, OKADA, MELIS, 2011; LI, QIN, 2005; UTEX, 2011).

**Figura 5.** Fotobiorreator tubular do tipo *airflit* utilizado no cultivo da *B. braunii*.



**Quadro 1.** Composição do meio CHU utilizado no crescimento da *B. braunii* (PÉREZ-MORA et al., 2016).

| <b>Componentes</b>                               | <b>Concentração</b> |
|--|---------------------|
| Cloreto de cálcio (mg/L)                         | 36,7                |
| Sulfato de magnésio (mg/L)                       | 36,9                |
| Fosfato de potássio (mg/L)                       | 8,7                 |
| Nitrato de sódio (mg/L)                          | 85,0                |
| Ácido cítrico (mg/L)                             | 33,5                |
| Citrato Férrico (mg/L)                           | 33,5                |
| <u>Solução de micronutrientes CHU</u><br>(µg/L): |                     |
| EDTA sal dissódico                               | 0,05                |
| Ácido bórico                                     | 0,618               |
| Cloreto de manganês                              | 0,0126              |
| Sulfato de zinco                                 | 0,044               |
| Sulfato cúprico                                  | 0,0196              |
| Cloreto de cobalto                               | 0,02                |
| Sódio molibdato                                  | 0,0126              |
| Hidróxido de sódio (mg/L)                        | 56,1                |
| Água purificada                                  | q.s.p. 1L           |

O crescimento da microalga foi observado a partir da retirada diária de uma alíquota da amostra do fotobiorreator, a qual era analisada no espectrofotômetro (em cubetas de quartzo e caminho óptico de 1cm à 680nm), sendo a absorvância empregada na equação da reta obtida por meio da curva de calibração (Item 4.2.2 infra). Durante o seu crescimento, a microalga foi diariamente “alimentada” com fósforo e nitrogênio por meio das soluções de fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ) e nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ), respectivamente, visando a reposição destes nutrientes, sendo a quantidade necessária determinada em função do seu crescimento (PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

Para obter a biomassa seca da *B. braunii*, a microalga foi retirada do fotobiorreator e submetida à centrifugação de 4500 rpm por 20 minutos (Sorvall® RC-5C Plus). Em seguida, as células obtidas foram lavadas por duas vezes com água purificada, repetindo o processo de centrifugação, a fim de remover o sal adsorvido nas células. Por fim, a biomassa obtida foi seca em estufa (Fanem® 320E) a 55 °C por, aproximadamente, 12 horas, sendo posteriormente triturada com pistilo e almofariz, padronizando-se o tamanho da partícula em 0,42 mm em tamis Granutest®. Após, a biomassa foi armazenada em freezer (Eletrolux® H400) a -7,3 °C para, enfim, ser submetida às técnicas analíticas (PELIZER *et al.*, 1999).

#### **4.2.2. Elaboração da Curva de Calibração de *Botryococcus braunii***

A curva de calibração foi desenvolvida com base na correlação entre a absorvância ( $\lambda = 680 \text{ nm}$ ) de diferentes diluições da amostra e a correspondente concentração celular, em massa seca. Para isso, foram realizados dois procedimentos, sendo o primeiro relacionado à determinação da concentração celular expressa em biomassa seca por unidade de volume e, o segundo, à da absorvância (PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

Para o primeiro procedimento, quatro alíquotas de 15 mL da biomassa foram filtradas, à vácuo, em membranas (Milipore®) – previamente pesadas e dessecadas – de 1,2  $\mu\text{m}$  cada. Após a filtração, as células contidas nas membranas foram lavadas a vácuo, por duas vezes, com água destilada, para a retirada do sal, sendo, então, mantidas em estufa (Fanem® 320E) a 55 °C por

24 h. Ao final do processo, cada membrana foi novamente pesada, inserindo-se os dados na **Equação 1**.

$$x \text{ (mg/L)} = (M_f - M_i/V) \times 1000$$

**Equação 1.** Cálculo da concentração celular na amostra.

**No qual:** x= concentração celular expressa em massa seca (mg/L);  $M_f$  = Massa final da membrana;  $M_i$ = Massa inicial da membrana; V= volume de amostra filtrada (L).

Em seguida, foi calculada a média dos resultados verificados, obtendo-se a concentração celular da biomassa seca.

Com relação ao procedimento para a determinação da absorbância de *B. braunii*, foi realizada a leitura, em triplicata, de diferentes diluições da biomassa do cultivo, em cubetas de quartzo (caminho óptico de 1 cm) à 680 nm no espectrofotômetro 600 plus (FEMTO<sup>®</sup>), calculando-se, posteriormente, a média das três absorbâncias constatadas em cada diluição. Para a análise, foi utilizada água purificada como branco.

Com base nos resultados dos dois processos, foi estabelecida a curva de calibração, correlacionando, para cada diluição, a média da absorbância com a respectiva concentração celular (adquirida pela razão entre a média da concentração celular, obtida no primeiro procedimento, e a diluição).

Por fim, a equação da reta de tendência linear resultante da curva, foi utilizada para verificar o crescimento da microalga *B. braunii* (PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

#### 4.2.3. Determinação de lipídeos totais

Os lipídeos totais na biomassa seca foram determinados por meio do método baseado na extração com solventes apolar e polar (PELIZER *et al.*, 1999). A biomassa da *B. braunii* (1g) foi submetida a uma extração em Soxhlet, primeiramente com éter de petróleo (solvente apolar) por 4h, com posterior remoção deste por meio de um rotaevaporador (Fisatom<sup>®</sup> 801). Em seguida, para a extração da fração lipídica polar da biomassa, foi utilizado no processo a mistura dos solventes clorofórmio-metanol 2:1 v/v, ocorrendo a extração até o

líquido ficar límpido. Após a retirada do solvente em rotaevaporador (Fisatom<sup>®</sup> 801), foi realizado o cálculo considerando a diferença da massa do balão antes e após o procedimento (**Equação 2**), a fim de determinar a porcentagem de lipídeos na amostra (PELIZER *et al.*, 1999; PIORRECK, BAASCH, POHL, 1984; OLGUÍN *et al.*, 2001).

$$\text{Lipídeo total (\%)} = \frac{M_f - M_i}{M_{am}} \times 100$$

**Equação 2.** Cálculo para determinação de lipídeos totais.

**No qual:**  $M_f$  = Massa final do balão;  $M_i$  = Massa inicial do balão;  $M_{am}$  = Massa da amostra.

#### 4.2.4. Determinação de proteínas totais

A determinação do teor de proteína total foi realizada pelo método de Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Para realizar o procedimento, empregou-se a amostra ausente de lipídeos – resultante da análise de lipídeos totais –, seca e pulverizada, realizando-se digestão, destilação e titulação.

Para a digestão, as amostras foram retiradas do cartucho Soxhlet e secas no dessecador por, aproximadamente, 12 horas. Em seguida, foram pesadas aproximadamente 20mg da amostra em papel manteiga e transferidas para o tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2 g do catalisador (1,9 g de sulfato de potássio e 0,1 g de sulfato de cobre) e 3 mL de ácido sulfúrico. O material foi aquecido a 350 °C em bloco digestor na capela de exaustão até a amostra contida no tubo de ensaio tornar-se límpida. O branco foi preparado com o mesmo procedimento, mas sem a adição da biomassa.

Para a destilação, foram colocados 5 mL de ácido bórico saturado – para recebimento da amônia – juntamente com o indicador Micro-Kjeldahl em um Erlemeyer, tendo sido adicionados na amostra, por meio da parte superior do aparelho, 10 mL de hidróxido de sódio 60%. O processo de destilação da amônia foi encerrado ao ter sido atingida a quantidade de, aproximadamente,

50 mL no frasco de Erlenmeyer. Por último, a solução foi titulada com ácido clorídrico 0,02N.

#### **4.2.5. Obtenção dos extratos da microalga *B. braunii***

A obtenção dos extratos da microalga se deu por processo de maceração realizado com três solventes distintos – clorofórmio, metanol e etanol/água (7:3 v/v) –, a fim de identificar aquele que proporcionaria a melhor extração dos componentes presentes na *B. braunii*.

A análise se deu em tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca, no qual foi adicionado 0,5 g da biomassa em contato com 15 mL de solvente, sendo posteriormente adicionado nitrogênio. Em seguida, a amostra permaneceu no escuro e sob agitação por 2 horas no homogeneizador de solução Ap-22, Phoenix<sup>®</sup>. Na sequência, foi realizada a centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos (Cientec<sup>®</sup> CT-6000 R), obtendo-se o extrato. Após, para garantir a extração total dos componentes, foram adicionados mais 15 mL do mesmo solvente na mesma biomassa, realizando-se novamente o referido processo (LI *et al.*, 2007). Ao final de todo o experimento, foram obtidos 30 mL de extrato para cada solvente.

Após a obtenção do extrato, e visando sua aplicação em formulações cosméticas, foi realizado o processo de padronização do solvente, sendo que, para isto, o extrato foi submetido à rotaevaporação (Rotaevaporador RV10 digital, com banho de aquecimento, IKA<sup>®</sup>) a 30 °C para completa evaporação do solvente. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de etanol/água (7:3 v/v) na amostra, seguido de sonicação por 10 minutos e filtração (filtro de 0,45 µm, Micropore<sup>®</sup>). Por fim, os extratos foram armazenados em vidro âmbar e freezer (Consul<sup>®</sup> *Facilite Frost Free*) a -5,0 °C (POP *et al.*, 2015; SAKLANI, CHANDRA, MISHRA, 2011).

#### **4.2.6. Determinação de Fenóis Totais**

Amostras e o padrão (ácido cafeico) foram preparados em solução metanol/água (60:40 v/v) acidificada (3g/L de HCL), sendo que 1 mL de cada extrato armazenado em etanol/água foi submetido à secagem sob nitrogênio. A

massa obtida foi ressuspensa em 1 mL da solução metanol/água acidificada com auxílio de banho de ultrassom (Unique<sup>®</sup> UltraCleaner 1600A) por 2 minutos.

Assim, a alíquota de 100 µL de cada amostra e padrão foi adicionada, separadamente, a 2 mL de carbonato de sódio 2%. Após 5 minutos, foi adicionado à solução 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu 50% (Dinâmica<sup>®</sup>), ocorrendo a reação em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi avaliada no espectrofotômetro UV-VIS Evolution<sup>®</sup> 600 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) com cubetas de quartzo, caminho ótico de 1,0 cm e comprimento de onda de 750 nm. O branco foi preparado com todos os solventes e reagentes, sem a presença de amostra ou padrão. O resultado foi expresso em ácido cafeico, sendo a curva analítica realizada de 5,0 – 130,0 µg/mL (RAO *et al.*, 2006)

#### **4.2.7. Perfil dos extratos por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE)**

O perfil cromatográfico dos extratos foi realizado em Cromatógrafo à líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution (Shimadzu<sup>®</sup>). Foi utilizada coluna de fase reversa C-18 (4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm - modelo Shim-pack VP-ODS - Shimadzu<sup>®</sup>). O ensaio foi realizado em sistema gradiente de 55 - 100% B (metanol em água Mili-Q) por 85 minutos, com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 30 µL para os extratos e 20 µL para o padrão Rutina (Sigma - Aldrich<sup>®</sup>) (SANTI *et al.*, 2014).

#### **4.2.8. Preparo das formulações dermocosméticas antissolares**

Foram preparadas três gramas das formulações em diferentes bases – co-polímero do ácido sulfônico acrilóildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (*ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer*, Aristoflex<sup>®</sup> AVC, Pharmaspecial) ou Álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado (10 OE) (*Cetearyl Alcohol*, *Dicetyl Phosphate* e *Ceteth-10 Phosphate*, Crodafos<sup>®</sup> CES, Mapric) – as quais foram acrescidas ou não de

biomassa ou extrato de *B. braunii* e filtros solares, a saber: avobenzona (*butyl methoxydibenzoylmethane*, Pharmaspecial) e *p*-metoxicinamato de octila (*Ethylhexyl methoxycinnamate*, Pharmaspecial), conforme demonstrado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Composição qualitativa e quantitativa (%) das formulações dermocosméticas (F1 a F20).

| Componentes                   | Proporção (% p/p) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                               | F1                | F2   | F3   | F4   | F5   | F6   | F7   | F8   | F9   | F10  |
| Aristoflex <sup>®</sup> AVC   | 1,0               | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 0,5  | 0,5  |
| Crodafos <sup>®</sup> CES     | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 6,0  | 6,0  |
| Propilenoglicol               | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 5,0  | 5,0  |
| AVO                           | -                 | 3,0  | -    | 3,0  | -    | 3,0  | -    | 3,0  | -    | 3,0  |
| MCO                           | -                 | 10,0 | -    | 10,0 | -    | 10,0 | -    | 10,0 | -    | 10,0 |
| Biomassa de <i>B. braunii</i> | -                 | -    | 10,0 | 10,0 | -    | -    | 10,0 | 10,0 | -    | -    |
| EC                            | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| EM                            | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| EE                            | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Crodamol <sup>®</sup>         | -                 | 3,5  | -    | 3,5  | -    | 3,5  | -    | 3,5  | -    | 3,5  |
| Phenova <sup>®</sup>          | -                 | -    | -    | -    | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  |
| Água purificada               | 99,0              | 82,5 | 89,0 | 72,5 | 98,2 | 81,7 | 88,2 | 71,7 | 87,7 | 71,2 |

**Legenda.** Componentes ativos das formulações dermocosméticas: AVO = avobenzona; MCO = *p*-metoxicinamato de octila; EC = Extrato da *B. braunii* obtido por Clorofórmio; EM = Extrato da *B. braunii* obtido por Metanol; EE = Extrato da *B. braunii* obtido por Etanol.

**Nomenclatura INCI.** AVO - *butyl methoxydibenzoylmethane*; MCO - *ethylhexyl methoxycinnamate*; Propilenoglicol - *Propylene Glycol*; Crodamol<sup>®</sup> GTCC - *Caprylic/Capric Triglyceride*; Phenova<sup>®</sup> - *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben*.

**Tabela 1 (continuação).** Composição qualitativa e quantitativa (%) das formulações dermocosméticas (F1 a F20).

| Componentes                   | Proporção (% p/p) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                               | F11               | F12  | F13  | F14  | F15  | F16  | F17  | F18  | F19  | F20  |
| Aristoflex® AVC               | 0,5               | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |
| Crodafos® CES                 | 6,0               | 6,0  | 6,0  | 6,0  | 6,0  | 6,0  | 6,0  | 6,0  | 6,0  | 6,0  |
| Propilenoglicol               | 5,0               | 5,0  | 5,0  | 5,0  | 5,0  | 5,0  | 5,0  | 5,0  | 5,0  | 5,0  |
| AVO                           | -                 | 3,0  | -    | 3,0  | -    | 3,0  | -    | 3,0  | -    | 3,0  |
| MCO                           | -                 | 10,0 | -    | 10,0 | -    | 10,0 | -    | 10,0 | -    | 10,0 |
| Biomassa de <i>B. braunii</i> | 10,0              | 10,0 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| EC                            | -                 | -    | -    | -    | 10,0 | 10,0 | -    | -    | -    | -    |
| EM                            | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | 10,0 | 10,0 | -    | -    |
| EE                            | -                 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 10,0 | 10,0 |
| Crodamol®                     | -                 | 3,5  | -    | 3,5  | -    | 3,5  | -    | 3,5  | -    | 3,5  |
| Phenova®                      | 0,8               | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  |
| Água purificada               | 77,7              | 61,2 | 87,7 | 71,2 | 77,7 | 61,2 | 77,7 | 61,2 | 77,7 | 61,2 |

**Legenda.** Componentes ativos das formulações dermocosméticas: AVO = avobenzona; MCO = *p*-metoxicinamato de octila; EC = Extrato da *B. braunii* obtido por Clorofórmio; EM = Extrato da *B. braunii* obtido por Metanol; EE = Extrato da *B. braunii* obtido por Etanol.

**Nomenclatura INCI.** AVO - *butyl methoxydibenzoylmethane*; MCO - *ethylhexyl methoxycinnamate*; Propilenoglicol - *Propylene Glycol*; Crodamol® GTCC - *Caprylic/Capric Triglyceride*; Phenova® - *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben*.

A preparação das formulações F1-F4 foi realizada como segue: o agente geleificante Aristoflex<sup>®</sup> AVC foi previamente hidratado em béquer de vidro com quantidade suficiente de água purificada. Em seguida, a água restante foi incorporada ao gel e fez-se a homogeneização, manualmente, com bastão de vidro. Ao mesmo tempo, os filtros UV foram dissolvidos em triglicérides de ácido cáprico e caprílico. Posteriormente, os compostos ativos foram incorporados ao gel já formado, com bastão de vidro e agitação vigorosa. A biomassa de *B. braunii*, antes de ser incorporada, foi submetida à redução de partícula em álcool P.A. com auxílio do banho de ultrassom (Unique<sup>®</sup> UltraCleaner 1600A) por período de 30 minutos. As formulações foram acondicionadas em frascos plásticos, avaliadas quanto às suas características físicas (aspecto, cor e odor) e mantidas sob refrigeração a 4°C (Consul<sup>®</sup> Facilite Frost Free) para posteriores análises.

No preparo das formulações F5 a F8, o agente geleificante Aristoflex<sup>®</sup> AVC foi hidratado em água, sob agitação de 1000 rpm, em agitador mecânico, com hélice tipo centrífuga. Os filtros UV foram dissolvidos em triglicérides de ácido cáprico e caprílico, sendo posteriormente incorporados ao gel na forma de um fio constante e sob agitação. O conservante foi adicionado durante o processo de agitação. A biomassa da *B. braunii* foi inserida por meio do processo de espatulação. As formulações foram acondicionadas, avaliadas quanto às suas características físicas (aspecto, cor e odor) e mantidas sob refrigeração a 4°C (Consul<sup>®</sup> Facilite Frost Free) para posteriores análises.

As formulações F9 – F12 foram preparadas da seguinte maneira (PINTO, 2014):

Fase A - Aristoflex<sup>®</sup> AVC foi hidratado em água e propilenoglicol, sob agitação de 1000 rpm, em agitador mecânico, com hélice tipo centrífuga, durante 10 minutos e, posteriormente, foram aquecidos a 75,0 °C.

Fase B - Os componentes Crodafos<sup>®</sup> CES; triglicérides de ácido cáprico e caprílico e os filtros UV orgânicos foram aquecidos à temperatura de 75,0 °C.

Após, a Fase B foi vertida lenta e constantemente sobre A sob agitação de 1000 rpm, em agitador mecânico, com hélice tipo centrífuga. Após, a velocidade foi elevada gradualmente até 5000 rpm e mantida por 2 minutos. O conservante foi adicionado durante o processo de agitação. As formulações foram resfriadas à temperatura ambiente, sendo então acondicionadas,

avaliadas quanto às suas características físicas (aspecto, cor e odor) e mantidas sob refrigeração a 4°C (Consul<sup>®</sup> *Facilite Frost Free*) para posteriores análises.

As formulações contendo o extrato da microalga (**Tabela 1**) foram preparadas da mesma forma descrita para as formulações F9 – F12, apresentando como diferença a incorporação dos diferentes extratos obtidos ao invés da biomassa seca da microalga.

#### 4.2.9. Atividade fotoprotetora *in vitro* e fotoestabilidade de formulação contendo *B. Braunii*

A avaliação da eficácia *in vitro* com relação à radiação UVA e UVB das formulações fotoprotetoras foi realizada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere<sup>®</sup> UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*), tendo intervalo espectral de 250 a 450 nm. As amostras foram aplicadas em placa de polimetilmetacrilato (PMMA) sob a forma de filme fino e uniforme, compreendendo uma área de 1,3 mg/cm<sup>2</sup> (COSMETICS EUROPE, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; UNITED STATES, 2011).

De acordo com Velasco e colaboradores (2008), a determinação da eficácia *in vitro* das formulações foi baseada nos seguintes parâmetros: fator de proteção solar estimado (FPS) e comprimento de onda crítico. As análises foram realizadas em triplicatas, tendo sido utilizados, pelo menos, cinco registros de transmitância por placa (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

O FPS estimado foi obtido por meio da **Equação 3**, pelo programa UV-2000<sup>®</sup> (COSMETICS EUROPE, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

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

**Equação 3.** Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS estimado).

Na qual:  $E\lambda$  = eficácia eritematogena espectral da CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*);  $S\lambda$  = irradiância solar espectral;  $T\lambda$  = transmitância espectral da amostra;  $d\lambda$  = intervalo dos comprimentos de onda.

O comprimento de onda crítico estimado das amostras foi determinado pela **Equação 4** (COSMETICS EUROPE, 2011; UNITED STATES, 2011).

$$\int_{290}^{\lambda_c} A_{\lambda}.d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A_{\lambda}.d\lambda$$

**Equação 4.** Comprimento de onda crítico *in vitro*.

Na qual:  $A(\lambda)$  = absorvância espectral da amostra;  $d(\lambda)$  = intervalo dos comprimentos de onda.

As placas de PMMA contendo as amostras, após a análise do FPS e do comprimento de onda crítico, foram submetidas ao processo de irradiação em câmara de fotoestabilidade (Atlas Suntest® CPS+) com dose fixa de 2088 kJ/m<sup>2</sup> (correspondente à irradiação de 1 hora), irradiância igual a 55 W/m<sup>2</sup>, e temperatura de 35°C (SCALIA, MEZZENA, 2010).

Subsequentemente, as amostras foram novamente avaliadas no Labsphere® UV2000S para obtenção dos valores de FPS e de comprimento de onda crítico, sendo os resultados comparados com aqueles obtidos antes da etapa da irradiação. Tal comparação teve por objetivo avaliar a influência da microalga *B. braunii* na fotoestabilidade funcional dos filtros.

#### **4.2.10. Determinação do potencial antirradicalar do extrato e da formulação contendo o extrato da *B. braunii***

A atividade antioxidante da microalga e da formulação foi determinada pela ação sequestradora do radical livre *2,2-difenil-1-picril-hidrazila* (DPPH•).

O método empregado consistiu em promover a reação de 1 mL do extrato com 3 mL de DPPH• (100 µM) por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Após, as amostras foram analisadas em 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS Evolution® 600, com cubetas de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm. Assim, foi possível observar a porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) por meio da **Equação 5** que correlacionou a absorvância da amostra ( $Abs_{amostra}$ ) com o controle negativo ( $Abs_{controle}$ ),

constituído por álcool etílico/água (7:3 v/v) e solução 100,0 µM de DPPH•, na proporção indicada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; SCALIA, MEZZENA, 2010).

$$\%SRL = [(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) \times 100] / Abs_{controle}$$

**Equação 5.** Equação da porcentagem de sequestro de radicais livres.

**Lenda:** %SRL: Porcentagem de radicais livres sequestrados; Abs<sub>controle</sub>: Absorbância do controle negativo; Abs<sub>amostra</sub>: Absorbância da amostra.

O resultado da ação antioxidante dos extratos (concentração 10%) foi correlacionado ao padrão de Trolox<sup>®</sup> por meio de curva padrão realizada de 3,0 – 30,0 µg/mL (MITTAL *et al.*, 2014; VILLAÑO *et al.*, 2007)

Para avaliar a ação antioxidante das formulações, foi realizado o mesmo procedimento aplicado aos extratos. Entretanto, em razão da presença de componentes que tornaram as soluções turvas a fim de obter o sobrenadante e realizar o experimento, 0,1 g de cada formulação foi adicionado em 1 mL de etanol 70% e, em seguida, submetido à centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos.

#### 4.2.11. Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo programa Minitab<sup>®</sup>, versão 17, em triplicata, empregando ANOVA (modelo linear generalizado) ou delineamento experimental do tipo fatorial, compreendendo o nível de significância de 5% (p≤0,05) para a determinação de resultados estatisticamente significativos.

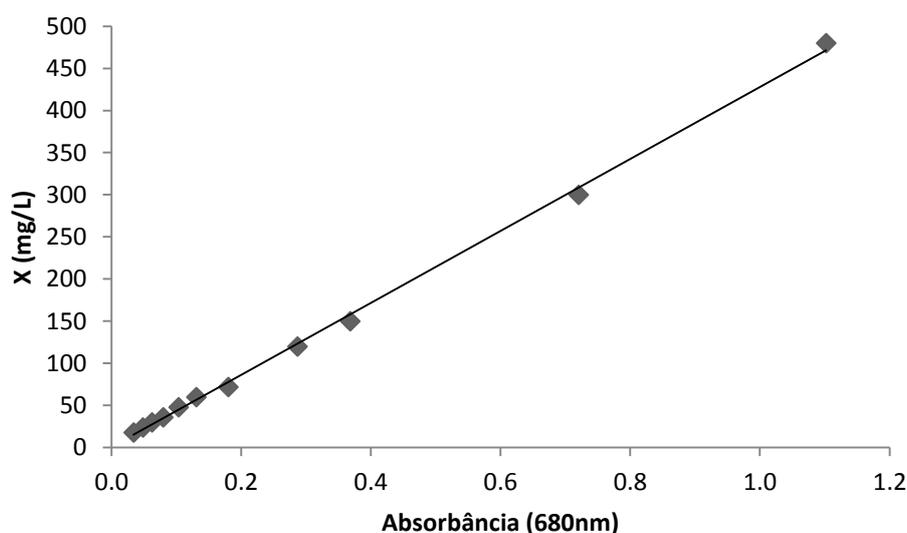
## *Resultados e Discussão*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Determinação do crescimento da *B. braunii*

Para verificar o crescimento celular da *B. braunii* foi necessária a realização da curva de calibração (**Figura 6**), descrita no item 4.2.2.

**Figura 6.** Curva de calibração para determinação da concentração celular de *Botryococcus braunii*.



**Legenda:** Leitura realizada em cubetas de quartzo a 680 nm, conforme procedimento do item 4.2.2.

Após a elaboração da curva, foi possível determinar o crescimento da *B. braunii*, ao empregar a absorbância da alíquota retirada diariamente do fotobiorreator (item 4.2.1 supra) na equação da reta (**Equação 6**).

$$x = 427,14 \times \text{abs} + 0,6649$$

**Equação 6.** Equação da reta obtida da curva de calibração da *B. braunii*.

No qual: x= concentração celular (mg/L); abs= absorbância

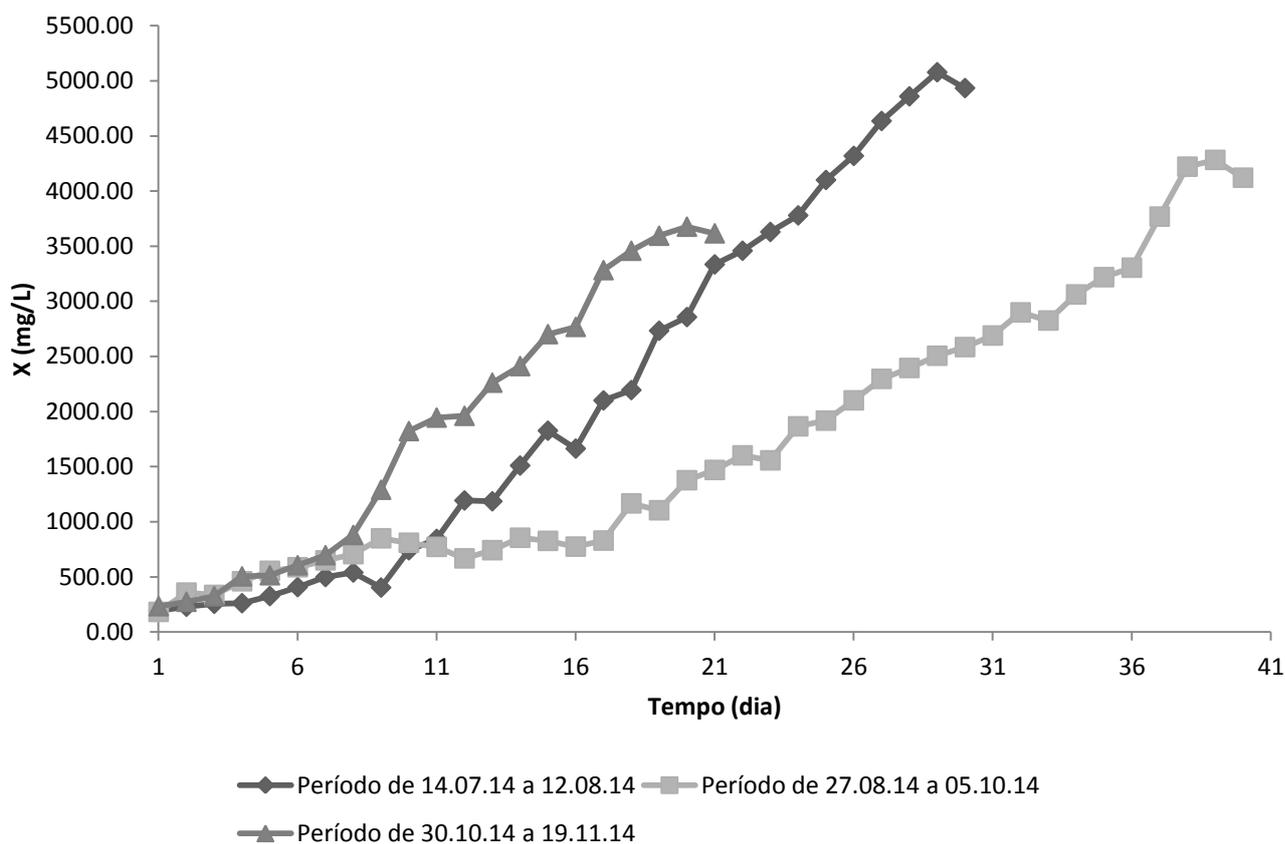
O cultivo da microalga foi realizado por alimentação intermitente com fosfato de potássio e nitrato de sódio, em quantidade proporcional ao seu crescimento celular diário, com intuito de evitar possível estresse inibitório devido à altas concentrações de nutrientes, bem como de fornecer, ao mesmo

tempo, a correção dos elementos fósforo e nitrogênio no meio, uma vez que fazem parte da composição elementar da biomassa de *B. braunii* (PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

O controle do valor de pH em torno de  $7,8 \pm 0,2$  foi realizado pela adição de gás carbônico no sistema através de uma válvula solenoide que, além de contribuir com o referido controle, supria as células ao incorporar o carbono, que também faz parte da sua composição elementar (PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

No cultivo foram obtidos os seguintes valores de crescimento, conforme ilustra a **Figura 7**.

**Figura 7.** Crescimento da *B. braunii* realizado em fotobiorreator tubular do tipo *airflit* em diferentes períodos.



## 5.2. Determinação de lipídeos totais

A escolha do sistema solvente e do método para a extração de lipídeos de microalgas é importante, uma vez que a eficácia do processo está relacionada à permeabilidade celular e parâmetros de extração. A temperatura é um parâmetro considerável, visto que os lipídeos passam a ser instáveis em alta temperatura, sendo o Soxhlet um sistema adequado, pois, durante o processo, se evita a temperatura alta de ebulição do solvente, e, conseqüentemente, a possível decomposição da gordura. Com relação ao solvente, é recomendada a mistura de clorofórmio-metanol para a extração, embora seja necessária, no caso da microalga *B. braunii*, uma pré-extração com solvente mais apolar (éter de petróleo), a fim de acelerar o processo, uma vez que esta apresenta muitas moléculas apolares em sua composição, como a presença de ácido linoleico (C18:2n6), ácido oleico (C18:1n9), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) (LEE, YOON, OH, 1998; LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2004; PÉREZ-MORA *et al.*, 2016).

De acordo com Mata e colaboradores (2010), a concentração de lipídeos na espécie estudada pode variar de 25,0 a 75,0% do peso seco da biomassa e esta diferença pode ocorrer devido à variações ambientais, condições de cultivo – como deficiência de nitrogênio ou estresse salino – e a fase de crescimento da microalga. Já no estudo de Rao e colaboradores (2007), foi observado conteúdo lipídico total na faixa de 24,0 a 28,0% ao realizar cultivo em diferentes salinidades, o que comprovou que a forma ou os parâmetros durante o crescimento da microalga podem influenciar na produção dos componentes (ZHILA, KALACHEVA, VOLOVA, 2011). Neste estudo, o resultado obtido da extração de lipídeos da biomassa seca de *B. braunii*, realizado em duplicata, apresentou média de 25,65%, sendo, portanto, compatível com os dados obtidos da literatura.

## 5.3. Determinação de proteínas totais

As microalgas verdes são conhecidas por apresentarem em sua composição grande quantidade de componentes, em particular as proteínas (SKJÅNES, REBOURS, LINDBLAD, 2012).

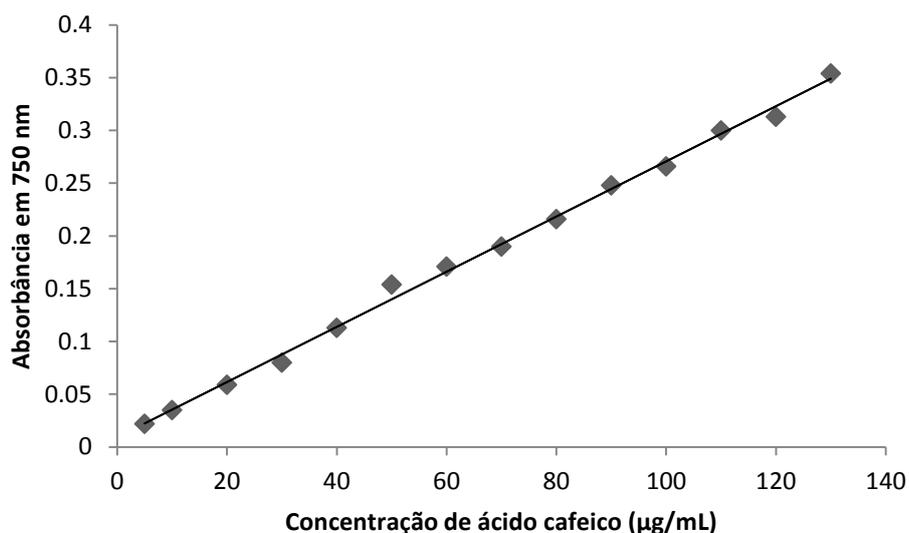
As proteínas de algas e microalgas são, atualmente, alvos de diversas pesquisas, uma vez que foi verificado que possuem ação em produtos cosméticos. Existem proteínas ou mesmo peptídeos – derivados da proteína hidrolisada – que conferem retenção de umidade ao cabelo e à pele, mostrando-se conveniente ao uso em cosméticos. Ademais, muitas microalgas apresentam em sua composição a micosporina e/ou aminoácido do tipo micosporina que exibem ação protetora contra a radiação UV no comprimento de onda de 310-365 nm e, portanto, torna-se de grande interesse para uso comercial. Por conseguinte, as proteínas podem ser interessantes fontes para estudos de futuras formulações dermocosméticas (HAGINO, SAITO, 2010; SAMARAKOON, JEON, 2012).

Segundo Batista e colaboradores (2013), as microalgas verdes, como *Chlorella vulgaris* (green) e *Spirulina maxima*, apresentam aproximadamente 40% de proteína em sua composição, sendo que esta concentração pode variar de acordo com os fatores ambientais a qual a microalga é submetida durante o seu crescimento. Nos estudos realizados por Órpez e colaboradores (2009) e Pérez-Mora (2016), a concentração de proteína encontrada na *B. braunii* foi de 30,1 e 32,4%, respectivamente. No presente estudo, foi obtida média de concentração de 49,17% de proteínas. Essa discrepância nos dados referentes ao teor proteico da biomassa pode estar relacionada à diferença ou alteração de algum parâmetro durante o cultivo da *B. braunii*, como a intensidade da luz, pois, segundo relatos, a intensidade elevada durante o cultivo é capaz de estimular a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem atuar na inibição da síntese de proteínas, enquanto que a baixa intensidade pode ocasionar uma melhor formação destas na microalga, já que existe uma menor tendência da ocorrência de EROs (SKJÅNES, REBOURS, LINDBLAD, 2012).

#### **5.4. Avaliação de fenóis totais**

A quantidade de fenóis totais nos extratos foi determinada por meio de comparação da absorbância com curva analítica de ácido cafeico (**Figura 8**).

**Figura 8.** Curva analítica expressa em ácido cafeico ( $\mu\text{g/mL}$ ).



**Legenda:** Leitura realizada em cubetas de quartzo no espectrofotômetro UV-VIS Evolution<sup>®</sup> 600 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) com cubetas de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm a 750 nm, conforme procedimento do item 4.2.6.

De acordo com a equação da reta, a média das absorvâncias dos diferentes extratos foi empregada no cálculo, resultando em equivalência de, aproximadamente, 18,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 25,4  $\mu\text{g/mL}$  e 68,9  $\mu\text{g/mL}$  de ácido cafeico para os extratos EC, EM e EE, respectivamente.

Ao comparar estes resultados com os obtidos por Rao e colaboradores (2006), verificou-se que a microalga apresentou equivalência de concentração de ácido cafeico inferior do que a relatada no estudo, pois, na análise dos referidos autores, os extratos da *B. braunii* obtidos em metanol e etanol apresentaram, respectivamente, concentração de 128,0 e 84,3  $\mu\text{g/mg}$  de fenóis totais expressos em ácido cafeico, enquanto que no presente trabalho foi obtido concentração de 12,1 e 7,6  $\mu\text{g/mg}$ , respectivamente. Tal divergência de concentração de fenóis totais poderia ser explicada em função da cepa utilizada no presente estudo. Esta foi diferente da utilizada por Rao e colaboradores (2006), que utilizaram a cepa UTEX LB 572 (linhagem A), indicando que, ainda que as microalgas sejam da mesma linhagem, pode haver diferença nas concentrações de compostos fenólicos presentes em sua composição (RAO *et al.*, 2010). Ainda, tais distintos resultados podem estar relacionados às condições de crescimento da microalga, como luz, salinidade e nutrientes, as quais podem influenciar sua composição final, pois o processo

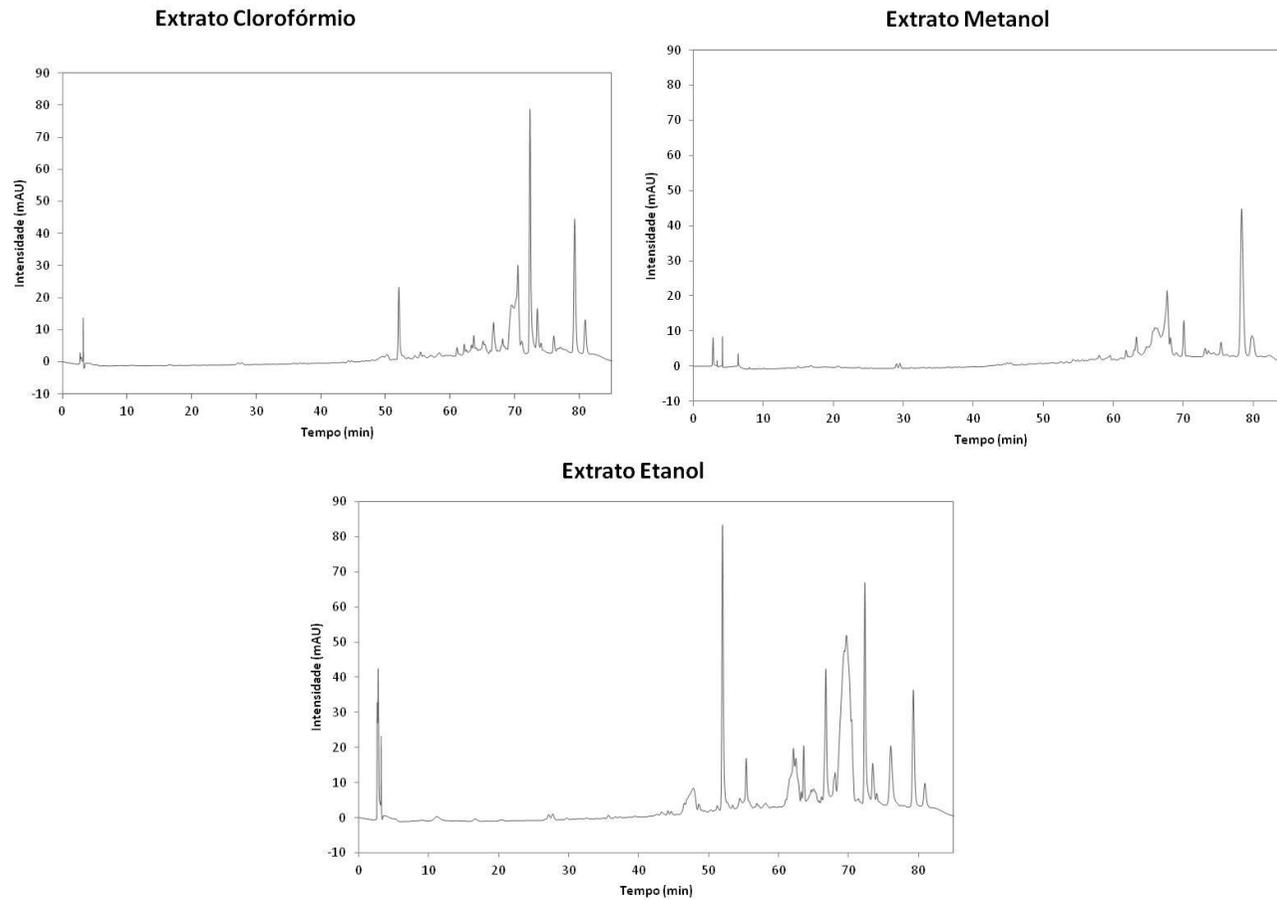
pelo qual a microalga foi cultivada neste estudo possuiu diferenças com relação ao de Rao e colaboradores (2006), como o emprego de luminosidade contínua, cultivo em fotobiorreator e uso do processo de secagem em estufa para obter a biomassa da microalga (SABEENA, FARVIN, JACOBSEN, 2013; SKJÅNES, REBOURS, LINDBLAD, 2012).

O meio de obtenção da biomassa seca também pode ter contribuído para a concentração inferior dos compostos encontrados, tendo em vista que, em estudo recente com diferentes algas, foi observado que o tratamento da amostra pode apresentar diferença em relação aos metabólitos produzidos, havendo maior preservação dos componentes da biomassa seca em processo de liofilização em comparação ao processo de secagem em estufa (MA *et al.*, 2015).

#### **5.5. Perfil dos extratos por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE)**

A fim de obter informações qualitativas sobre como as substâncias presentes nos extratos da *B. braunii* se apresentam, foram identificados os perfis cromatográficos das amostras. Na **Figura 9** estão ilustrados os perfis cromatográficos dos extratos obtidos com clorofórmio, metanol e etanol 70%.

**Figura 9.** Perfil cromatográfico qualitativo dos extratos de *B. braunii* obtidos por diferentes solventes.



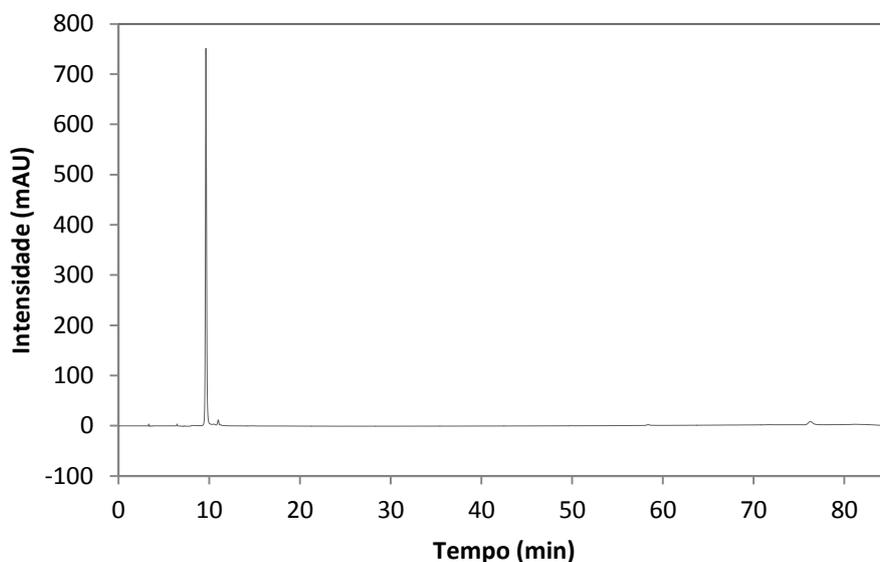
**Legenda.** Análise realizada no equipamento Cromatógrafo líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution (Shimadzu®), injeção 30 µL, detector PDA (350 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna de fase reversa C-18 (4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm - modelo Shim-pack VP-ODS - Shimadzu®). Gradiente de metanol em água Mili-Q, 5 min a 55%, de 5 a 65 min 55 - 100% B, 65 a 75 min 100% B, tempo total de corrida 85 min.

Observou-se que houve diferenciação na composição dos extratos conforme o tipo de solvente empregado. Este resultado é corroborado por diversos estudos, pois a extração de componentes está relacionada a diversos fatores, como a polaridade e/ou proporção do solvente e o processo extrativo utilizado, por exemplo (CHOOCHOTE, SUKLAMPOO, OCHAIKUL, 2014; GHITESCU *et al.*, 2015; MACHU *et al.*, 2015; WARD, 2016).

Apesar de o metanol e o etanol apresentarem polaridade semelhante, alguns estudos descreveram que tais solventes, quando empregados em processo extrativo e material vegetal idênticos, resultam em diferentes níveis de concentração dos compostos nos extratos, o que se constatou nos extratos da microalga *B. braunii*, pois houve picos com maior intensidade ao ser utilizado o solvente extrator etanol 70%, seguido do clorofórmio e metanol (BOULEKBACHE-MAKHLOUF *et al.*, 2013; HUSSEIN *et al.*, 2013; KANATT *et al.*, 2015).

Como substância padrão do método de CLAE, foi utilizada a rutina (cromatograma representado na **Figura 10**), que, por ser um composto fenólico encontrado amplamente no Reino Vegetal, incluindo algas, poderia estar presente nos extratos da microalga (AL-SAIF, ABDEL-RAOUF, AREF, 2014; ARAUJO, ROSADO, FERNANDES, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015, 2016b; KUMAR, MURUGESAN, BHUVANESWARI, 2015; PERES *et al.*, 2015).

**Figura 10.** Cromatograma do padrão Rutina.



**Legenda.** Análise realizada no equipamento Cromatógrafo líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution (Shimadzu<sup>®</sup>), injeção 30  $\mu$ L, detector PDA (350 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna de fase reversa C-18 (4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0  $\mu$ m - modelo Shim-pack VP-ODS - Shimadzu<sup>®</sup>). Gradiente de metanol em água Mili-Q, 5 min a 55%, de 5 a 65 min 55 - 100% B, 65 a 75 min 100% B, tempo total de corrida 85 min.

A Rutina é um flavonoide que possui ação antioxidante e apresenta estrutura molecular semelhante aos filtros químicos, a qual permite absorção na faixa do espectro UV. Devido à estas características, este flavonoide tem sido alvo de estudos para auxiliar nos produtos cosméticos, visando à fotoproteção (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016ab; VELASCO *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por Choquet e colaboradores (2008) averiguou-se que, ao incorporar a rutina em emulsão O/A na concentração de 10% (p/p), o valor do fator de proteção solar (FPS) foi semelhante ao do reconhecido filtro UVB homossalato. Em relação à radiação UVA, também foi observado que este flavonoide foi capaz de realizar a fotoproteção para esta faixa de radiação, tornando-o um composto atrativo para uso em formulações fotoprotetoras.

Ao associar a rutina, em concentração de 0,1% (p/p), aos filtros UVA benzofenona-3 e avobenzona (AVO), verificou-se no estudo de De Oliveira e colaboradores (2015) que, *in vitro*, ocorreu aumento do FPS de 54% da formulação contendo o flavonoide e a benzofenona-3, bem como a prevenção

da foto-oxidação do filtro UVA. No entanto, não foi obtido desempenho eficaz quando associada ao filtro AVO, provocando a redução do valor do FPS. Neste mesmo estudo foi constatado que a formulação contendo rutina apresentou atividade antioxidante 40 vezes superior em comparação à formulação controle que não continha o flavonoide, confirmando, assim, o seu potencial de sequestro de radicais livres. Portanto, existindo a possibilidade de presença deste composto na microalga, e devido às suas habilidades de poder atuar na melhora da eficácia fotoprotetora, bem como de contribuir para ação multifuncional por exercer ação antioxidante, este flavonoide foi utilizado como substância padrão para o método.

Ao analisar o cromatograma do padrão com os perfis dos extratos, constatou-se a ausência de rutina em suas composições, uma vez que não foram verificados picos relativos à esta substância.

#### **5.6. Preparo das formulações dermocosméticas antissolares**

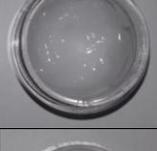
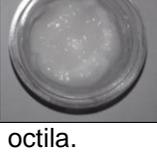
As formulações foram analisadas de acordo com as suas características físicas (aspecto, cor e odor), descritas na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Características físicas das formulações dermocosméticas.

| Formulações | Composição  | Aspecto  | Características organolépticas                                 |
|-------------|---|--|--|
| F1          | Base Aristoflex® AVC  |    | Gel homogêneo, incolor e inodoro                               |
| F2          | Base Aristoflex® AVC com filtros AVO e MCO                                |    | Gel homogêneo, de coloração branca e odor característico       |
| F3          | Base Aristoflex® AVC com células da <i>B. braunii</i>                     |    | Gel homogêneo, de coloração verde escuro e odor característico |
| F4          | Base Aristoflex® AVC com células da <i>B. braunii</i> e filtros AVO e MCO |    | Gel homogêneo, de coloração verde claro e odor característico  |
| F5          | Base Aristoflex® AVC  |   | Gel homogêneo, incolor e inodoro                               |
| F6          | Base Aristoflex® AVC com filtros AVO e MCO                                |  | Gel homogêneo, de coloração branca e odor característico       |
| F7          | Base Aristoflex® AVC com células da <i>B. braunii</i> (espatuladas)       |  | Gel homogêneo, de coloração verde escuro e odor característico |

**Legenda.** AVO = Avobenzone; MCO = Metoxinamato de octila.

Tabela 2 (Continuação). Características físicas das formulações dermocosméticas.

| Formulações | Composição  | Aspecto  | Características organolépticas                                     |
|-------------|---|--|--|
| F8          | Base Aristoflex <sup>®</sup> AVC com células da <i>B. braunii</i> (espatuladas) e filtros AVO e MCO |    | Gel homogêneo, de coloração verde escuro e odor característico     |
| F9          | Base Crodafos <sup>®</sup> CES  |    | Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico       |
| F10         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com filtros AVO e MCO  |    | Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico       |
| F11         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com células da <i>B. braunii</i> (espatuladas)                       |    | Emulsão homogênea, de coloração verde escuro e odor característico |
| F12         | Base Aristoflex <sup>®</sup> AVC com células da <i>B. braunii</i> (espatuladas) e filtros AVO e MCO |   | Emulsão homogênea, de coloração verde escuro e odor característico |
| F13         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES  |  | Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico       |
| F14         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com filtros AVO e MCO  |  | Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico       |

**Legenda.** AVO = Avobenzona; MCO = Metoxinamato de octila.

**Tabela 2 (Continuação).** Características físicas das formulações dermocosméticas.

| Formulações | Composição  | Aspecto   | Características organolépticas                                |
|-------------|---|---|---|
| F15         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com extrato da <i>B. braunii</i> (solvente utilizado clorofórmio)                          |    | Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico |
| F16         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com os filtros AVO e MCO e o extrato da <i>B. braunii</i> (solvente utilizado clorofórmio) |    | Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico |
| F17         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com extrato da <i>B. braunii</i> (solvente utilizado Metanol)                              |    | Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico |
| F18         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com os filtros AVO e MCO e o extrato da <i>B. braunii</i> (solvente utilizado Metanol)     |    | Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico |
| F19         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com extrato da <i>B. braunii</i> (solvente utilizado Etanol)                               |   | Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico |
| F20         | Base Crodafos <sup>®</sup> CES com os filtros AVO e MCO e o extrato da <i>B. braunii</i> (solvente utilizado Etanol)      |  | Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico  |

**Legenda.** AVO = Avobenzona; MCO = Metoxinamato de octila.

O emprego do Aristoflex<sup>®</sup> AVC na formulação se deu em razão de ser um co-polímero sintético formador de gel em sistema aquoso, apresentando propriedades sensoriais e espalhabilidade adequadas. O gel não é irritante e confere adesividade com agradável sensação à pele, sem o toque pegajoso dos polímeros tradicionais, apresentando carga aniônica e transparência, além de estabilidade quanto à ampla faixa de valor de pH (4 a 9), bem como quando associado a uma variedade de substâncias ativas. Ademais, este polímero é estável perante a radiação UV e pode atuar como agente espessante e estabilizador de emulsões, uma vez que é possível utilizá-lo com fases oleosas diversas, como fluidos de silicone, ceras e hidrocarbonetos, acarretando na formação de sistemas estáveis (ADRIANO *et al.*, 2014; DANIELS, 2012; PERES; DIAS, 2011; ZANINI, 2007).

No preparo das formulações F3 e F4, foi necessária a redução de partícula da biomassa da *B. braunii*, descrito no item 4.2.8, pois a preparação precisou estar homogênea para aplicação e análise pelo Labsphere<sup>®</sup> UV2000S. (ABUÇAFY *et al.*, 2016; COSMETICS EUROPE, 2011).

Inicialmente, a análise foi realizada por meio da incorporação da biomassa da microalga com redução de partículas em etanol, tendo sido constatado que a microalga não promoveu a ação esperada (item 5.7.1 *infra*). Assim, novas formulações foram desenvolvidas com uso da biomassa e de seus extratos – obtidos a partir de diferentes solventes –, alterando-se o veículo, bem como o processo de incorporação – com emprego da espatulação para garantir a homogeneidade da formulação –, a fim de verificar se estas alterações poderiam contribuir para melhor ação da microalga *B. braunii*.

A base Crodafos<sup>®</sup> CES foi selecionada como o veículo alternativo, pois é uma base autoemulsificante fosfatada que apresenta alta estabilidade em sistemas óleo/água (O/A). Esta base possibilita melhor formação de filme que o gel, contribuindo para aumento do FPS da formulação fotoprotetora (CRODA EUROPE, 2016; PINTO, 2014; SOHN *et al.*, 2016). Por fim, todas as formulações apresentaram-se homogêneas.

### **5.7. Atividade fotoprotetora *in vitro* e fotoestabilidade de formulação contendo *B. braunii***

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), um fotoprotetor deve promover ação contra a radiação UVA e UVB, tendo que apresentar, no mínimo, FPS igual a 6 e comprimento de onda crítico igual ou superior a 370 nm – valor que corresponde a 90% da área integrada entre 290 a 400 nm (intervalo espectral que abrange a radiação UVB e UVA) (BRASIL, 2012;).

A fotoproteção *in vitro* das formulações F1 a F20 foi analisada por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração em Labsphere® UV-2000S, o qual fornece o FPS e o comprimento de onda crítico por meio da conversão dos valores de transmitância ou absorbância, que são calculados pela diferença entre a radiação emitida na placa de PMMA contendo a amostra e a radiação detectada após sua passagem pela formulação (DUEVA-KOGANOV *et al.*, 2009; PERES *et al.*, 2015).

A fotoestabilidade é um procedimento que envolve a irradiação prévia das formulações fotoprotetoras. Este processo é considerado uma etapa fundamental, pois permite averiguar mudanças no fator de proteção solar (FPS) quando as amostras são expostas à radiação UV emitida pela câmera de fotoestabilidade, e, portanto, auxilia na conveniente avaliação e determinação da fotoestabilidade das formulações (UNITED STATES, 2011).

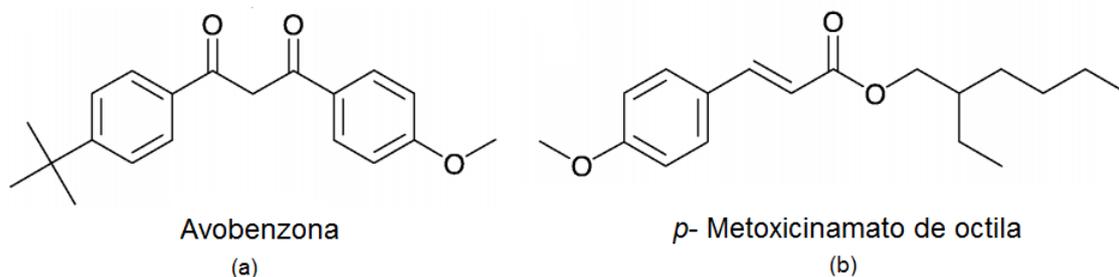
#### **5.7.1. Avaliação do FPS e comprimento de onda crítico das formulações contendo a incorporação da biomassa seca de *B. braunii***

Ao realizar o experimento, foi constatado que as formulações contendo os filtros solares apresentaram absorção da radiação UV, compreendendo espectro de absorção nas regiões UVB e UVA. Este amplo espectro ocorreu devido à ação conjunta dos filtros presentes na formulação, uma vez que a avobenzona é capaz de absorver a radiação na faixa de 310 a 400 nm, que compreende a região UVA, enquanto que o *p*-metoxicinamato de octila absorve

a radiação UVB, com máximo de absorção, geralmente, em 310 nm (MOTA, FREITAS, TODESCHINI, 2009; PALM, O'DONOGHUE, 2007).

A seleção dos filtros teve por objetivo a obtenção de uma formulação com amplo espectro de absorção, tendo sido considerado, ainda, que estes são utilizados em fotoprotetores disponíveis no mercado e que existem estudos científicos que comprovam a segurança e eficácia. Ressalta-se que a avobenzona (**Figura 11A**) é uma molécula fotoinstável que se cliva por meio da irradiação e, quando associada ao *p*-metoxicinamato de octila (**Figura 11B**), desempenha maior probabilidade de quebra e interação fotoinduzida entre os filtros, provocando, por consequência, a redução da proteção UVA e do FPS da formulação (AFONSO *et al.*, 2014; BALOGH *et al.*, 2011; BISSONNETTE, 2008; KIM *et al.*, 2015; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010; NASH, 2006; RIBEIRO, 2010; SCALIA, MEZZENA, 2010; VELASCO *et al.*, 2008).

**Figura 11.** Estrutura molecular dos filtros avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila (Adaptado de LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010).



Na **Tabela 3** encontram-se os valores do FPS e do comprimento de onda crítico, antes e após o processo de irradiação das formulações F1 a F4 (incorporação das células após sofrerem redução de partícula em álcool), tendo na **Figura 12** a ilustração das respectivas curvas de absorbância.

**Tabela 3.** Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) *in vitro* das formulações F1 a F4 antes e após irradiação.

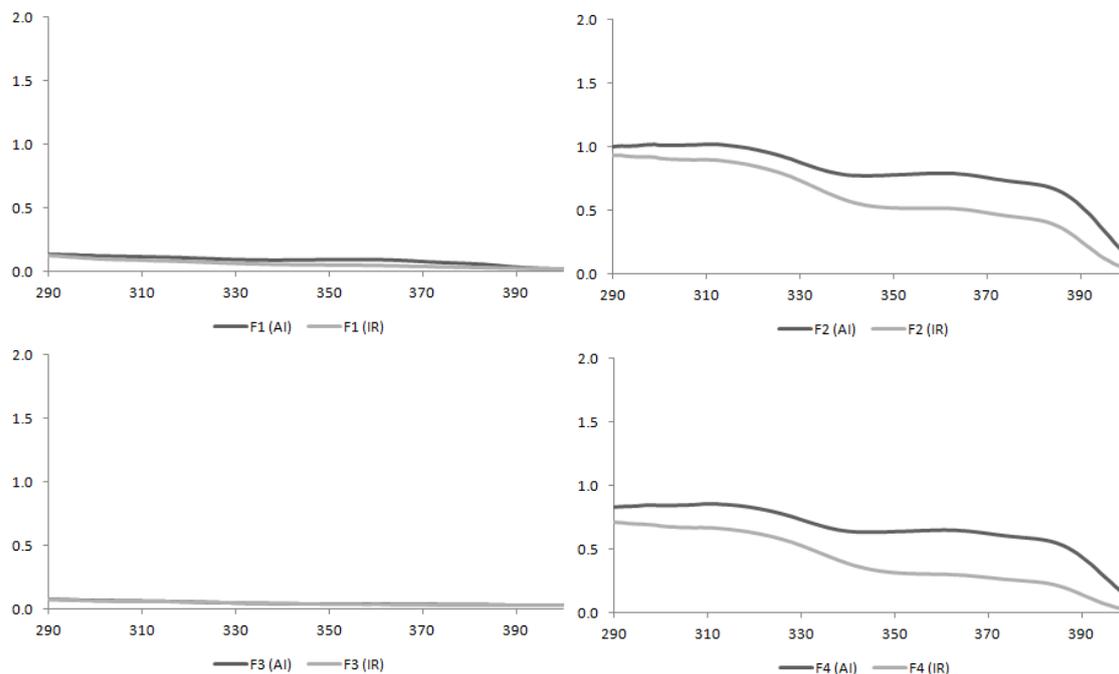
| Formulações | FPS                      |                         | Comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) |                           |
|-------------|--------------------------|-------------------------|---|---------------------------|
|             | Pré – irradiação         | Pós – irradiação        | Pré – irradiação                            | Pós – irradiação          |
| F1          | N.A.                     | N.A.                    | N.A.  | N.A.                      |
| F2          | 10,0 ± 1,7 <sup>Aa</sup> | 8,0 ± 1,1 <sup>Aa</sup> | 381,0 ± 1,1 <sup>Aa</sup>                   | 376,0 ± 1,0 <sup>Ab</sup> |
| F3          | N.A.                     | N.A.                    | N.A.  | N.A.                      |
| F4          | 7,0 ± 1,0 <sup>Ba</sup>  | 4,0 ± 0,6 <sup>Bb</sup> | 381,0 ± 1,0 <sup>Aa</sup>                   | 372,0 ± 3,5 <sup>Ab</sup> |

**Legenda.** FPS = Fator de Proteção Solar; N.A. = não aplicável; F1 – Formulação gel base; F2 – Formulação gel com filtros; F3 – Formulação gel com *B. braunii* com partícula reduzida; F4 – Formulação gel contendo filtros e *B. braunii* com partícula reduzida.

- Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

- Letras diferentes representam diferença significativa, tendo letra maiúscula para a diferença entre as formulações e minúscula para os dados antes e após a irradiação.

**Figura 12.** Curvas de absorvância das formulações F1 a F4, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR).



**Legenda.** F1 – Formulação gel base; F2 – Formulação gel com filtros; F3 – Formulação gel com *B. braunii* com partícula reduzida; F4 – Formulação gel contendo filtros e *B. braunii* com partícula reduzida.

Para formulações F1 a F4, o comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) permaneceu com valor superior a 370 nm e não apresentou diferença entre as amostras F2 e F4 (COSMETICS EUROPE, 2011). O mesmo não ocorreu para os valores de FPS, pois foi observada diferença entre as formulações. Na formulação F3, houve ausência de FPS, constatando-se, portanto, que, ao utilizar somente a microalga, não foi possível obter auxílio na fotoproteção por obtenção de FPS. Já, com relação às formulações F2 e F4, apesar de ambas apresentarem absorção da radiação UV, a F2 – contendo somente os filtros – obteve melhor desempenho, exibindo valor de FPS superior ( $10,0 \pm 1,7$ ) em relação à F4 ( $7,0 \pm 1,0$ ), composta de filtros e a microalga *B. braunii*. Assim, nas condições do estudo, a associação da microalga não favoreceu a melhora da eficácia por meio do FPS *in vitro*.

A redução do FPS na formulação F4 poderia estar relacionada a uma interação entre os filtros e a microalga, pois estudos apontaram que

determinados filtros UV podem reagir com aminoácidos livres e proteínas, por possuírem em sua estrutura o grupamento carbonila eletrofílico, o qual reage com o grupo nucleofílico das proteínas, sob condições térmicas e/ou por meio da irradiação, culminando na formação de produtos que apresentam influência no espectro de ação do filtro UV. Desta maneira, considerando-se que a microalga possui proteínas em sua composição, pode ter ocorrido interação com os filtros na formulação F4, resultando em menor ação desta em relação à F2 (STIEFEL, SCHWACK, NGUYEN, 2015; STIEFEL, SCHWACK, 2013, 2014).

Outra possibilidade a ser considerada está relacionada ao método de incorporação utilizado para a microalga, pois é sabido que a forma de incorporação ou mesmo o processo de extração de compostos podem interferir diretamente na qualidade dos compostos ativos (SASIDHARAN *et al.*, 2011). Assim, foi realizado novo processo de incorporação da microalga e alteração da base da formulação.

Na **Tabela 4** encontram-se os valores do FPS e do comprimento de onda crítico, antes e após o processo de irradiação das formulações F5 a F8 (biomassa incorporada por processo de espatulação), tendo na **Figura 13** a ilustração das respectivas curvas de absorbância.

**Tabela 4.** Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) *in vitro* das formulações F5 a F8 antes e após irradiação com incorporação da biomassa por espatulação.

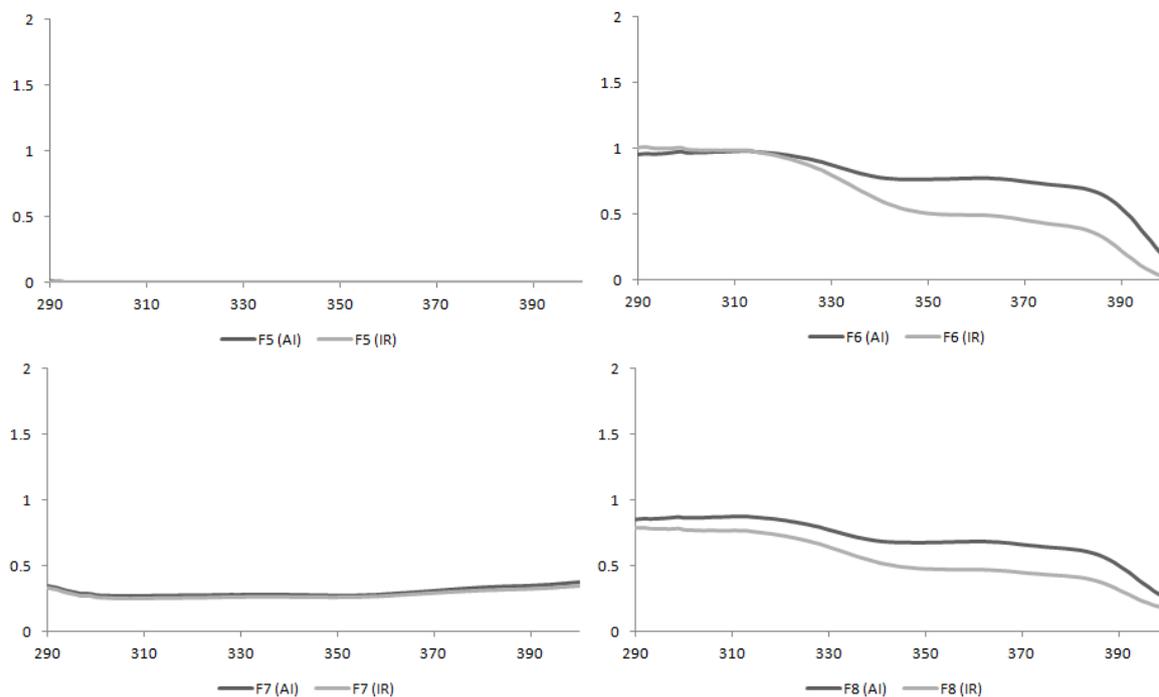
| Formulações | FPS                      |                         | Comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) |                           |
|-------------|--------------------------|-------------------------|---|---------------------------|
|             | Pré – irradiação         | Pós – irradiação        | Pré – irradiação                            | Pós – irradiação          |
| F5          | N.A.                     | N.A.                    | N.A.  | N.A.                      |
| F6          | 10,0 ± 2,1 <sup>Aa</sup> | 8,0 ± 4,5 <sup>Aa</sup> | 382,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>                   | 373,0 ± 3,0 <sup>Ab</sup> |
| F7          | N.A.                     | N.A.                    | N.A.  | N.A.                      |
| F8          | 7,0 ± 1,0 <sup>Ba</sup>  | 5,6 ± 1,2 <sup>Ba</sup> | 383,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>                   | 380,0 ± 0,6 <sup>Bb</sup> |

**Legenda.** FPS = Fator de Proteção Solar; N.A. = não aplicável; F5 – Formulação gel base; F6 – Formulação gel com filtros; F7 – Formulação gel com *B. braunii*; F8 – Formulação gel contendo filtros e *B. braunii*.

- Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

- Letras diferentes representam diferença significativa, tendo letra maiúscula para a diferença entre as formulações e minúscula para os dados antes e após a irradiação.

**Figura 13.** Curvas de absorvância das formulações F5 a F8, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR).

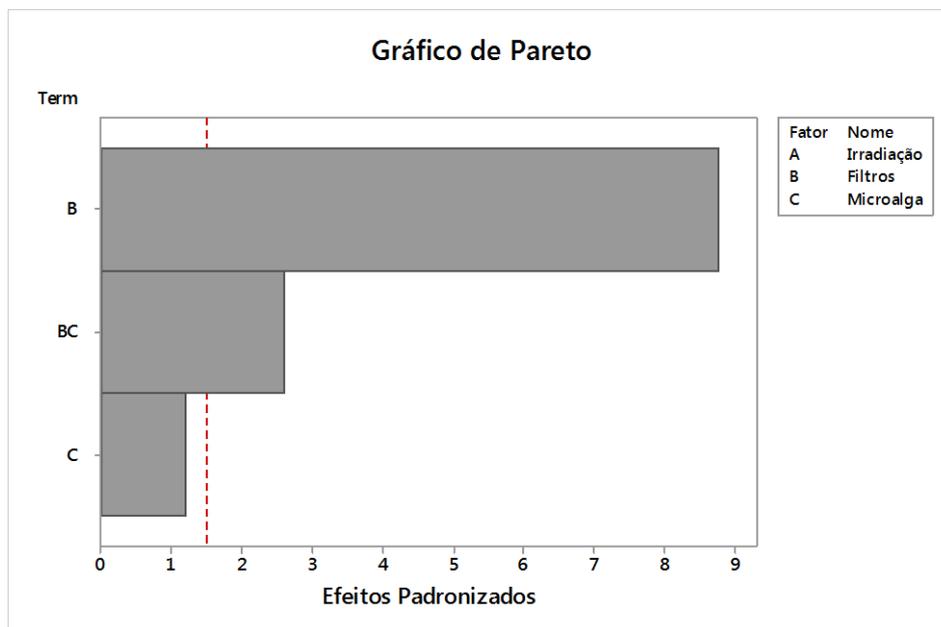


**Legenda.** F5 – Formulação gel base; F6 – Formulação gel com filtros; F7 – Formulação gel com *B. braunii*; F8 – Formulação gel contendo filtros e *B. braunii*.

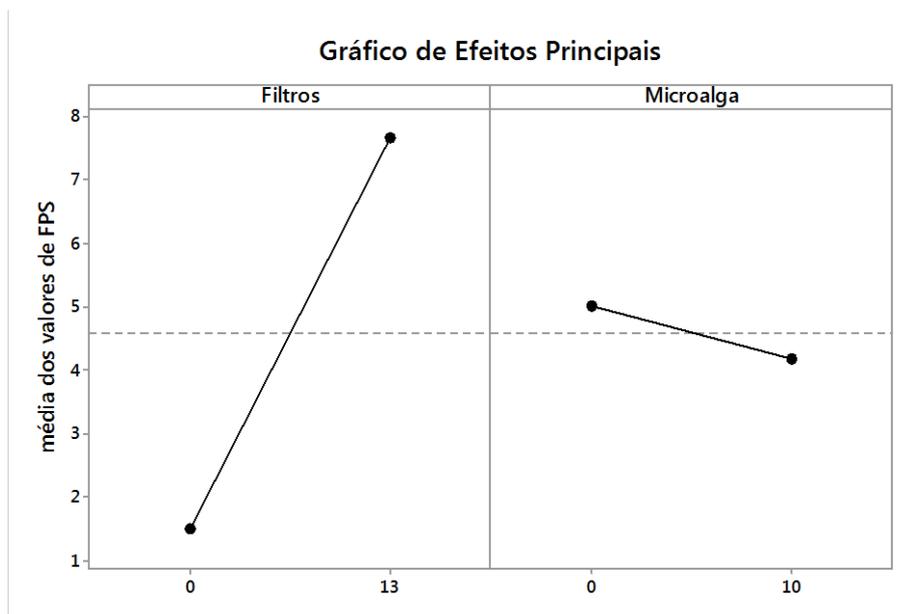
Ao adotar novo método de incorporação, constatou-se que o comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) das formulações F6 e F8 permaneceram acima de 370 nm, antes e após o processo de irradiação, favorecendo a ação na região UVA (COSMETICS EUROPE, 2011).

A ação das variáveis para o FPS pode ser confirmada por intermédio do gráfico de Pareto de causa e efeito (**Figura 14**), que apresenta barras de cada variável e suas combinações e reta de referência indicativa do nível de significância do teste estatístico ( $\alpha = 0,05$ ); e pelo gráfico de efeitos principais, que demonstra o efeito isolado de cada variável para o resultado do FPS, sendo que quanto maior a inclinação da reta, maior é o impacto da variável no resultado (**Figura 15**) (PERES *et al.*, 2016).

**Figura 14.** Gráfico de Pareto ilustrando o efeito de cada variável e suas combinações para o resultado do FPS das formulações F5 a F8.



**Figura 15.** Gráfico de efeitos principais para o FPS das formulações F5 a F8.



Constatou-se que a microalga isoladamente (F7) não foi considerada significativa para o efeito do FPS, assim como na formulação averiguada anteriormente (F3), ou seja, independentemente da forma de incorporação, não houve ação da microalga contra a absorção da radiação UVB.

As formulações F6 e F8 apresentaram influência no efeito do FPS, sendo que a presença do filtro isoladamente garantiu ação mais pronunciada, pois a distância entre a reta de referência e o final da barra foi maior em relação à combinação dos filtros e a microalga, ou seja, a incorporação da microalga gerou redução do FPS da formulação, o que foi comprovado pelo gráfico de efeitos principais (**Figura 15**), indicando possível interação entre a microalga e os filtros UV.

Desta forma, tendo em vista que a alteração do método de incorporação da *B. braunii* não contribuiu para a melhora na eficácia do FPS das formulações, foi realizada a análise do desempenho das formulações fotoprotetoras com a alteração da base, de gel para creme.

Na **Tabela 5** encontram-se os valores do FPS e do comprimento de onda crítico (nm), antes e após o processo de irradiação das formulações F9 a F12, tendo na **Figura 16** a ilustração das respectivas curvas de absorbância.

**Tabela 5.** Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) *in vitro* das formulações F9 a F12 antes e após irradiação.

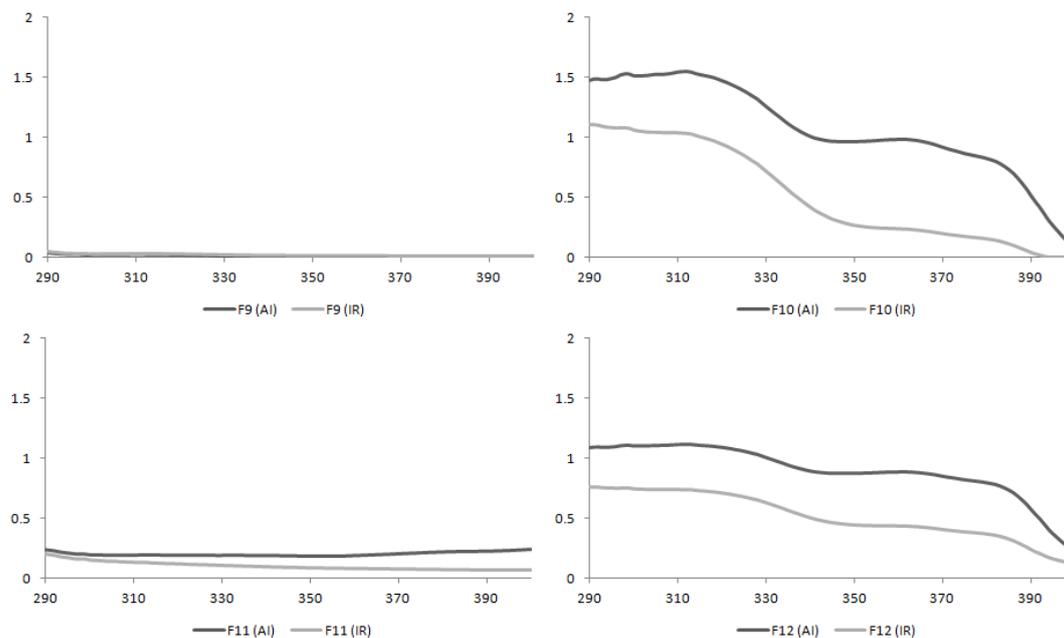
| Formulações | FPS                      |                         | Comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) |                           |
|-------------|--------------------------|-------------------------|---|---------------------------|
|             | Pré – irradiação         | Pós – irradiação        | Pré – irradiação                            | Pós – irradiação          |
| F9          | N.A.                     | N.A.                    | N.A.  | N.A.                      |
| F10         | 29,0 ± 4,7 <sup>Aa</sup> | 8,0 ± 1,1 <sup>Ab</sup> | 378,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>                   | 370,0 ± 3,0 <sup>Ab</sup> |
| F11         | N.A.                     | N.A.                    | N.A.  | N.A.                      |
| F12         | 12,0 ± 1,5 <sup>Ba</sup> | 5,0 ± 1,0 <sup>Bb</sup> | 382,0 ± 0,6 <sup>Ba</sup>                   | 378,0 ± 1,1 <sup>Bb</sup> |

**Legenda.** FPS = Fator de Proteção Solar; N.A. = não aplicável; F9 – Formulação creme base; F10 – Formulação creme com filtros; F11 – Formulação creme com *B. braunii*; F12 – Formulação creme contendo filtros e *B. braunii*.

- Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

- Letras diferentes representam diferença significativa, tendo letra maiúscula para a diferença entre as formulações e minúscula para os dados antes e após a irradiação.

**Figura 16.** Curvas de absorvância das formulações F9 a F12, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR).



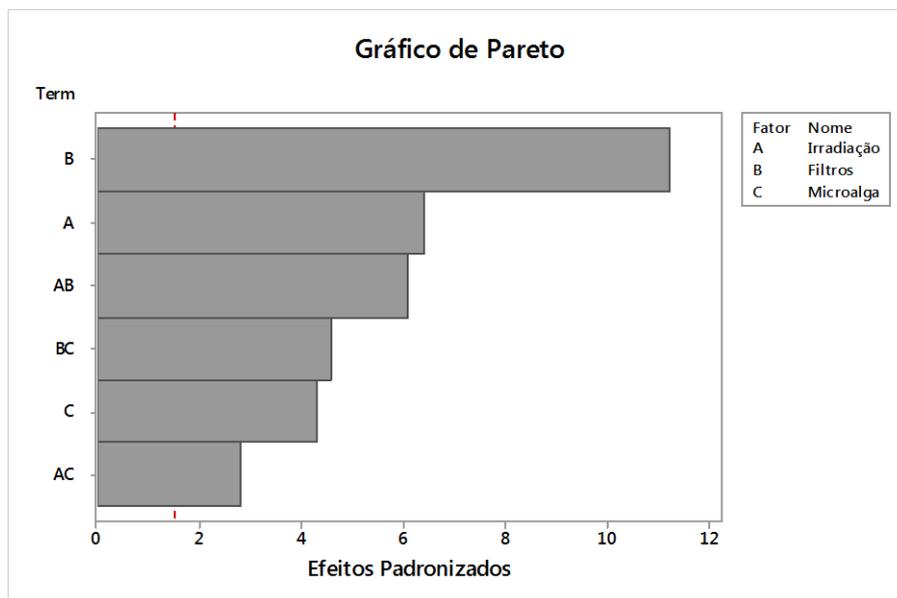
**Legenda.** F9 – Formulação creme base; F10 – Formulação creme com filtros; F11 – Formulação creme com *B. braunii*; F12 – Formulação creme contendo filtros e *B. braunii*.

Ao realizar a substituição de base, foi constatado que as formulações F10 e F12, antes e após o processo de irradiação, mantiveram o comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) no intervalo do valor recomendado (370 nm) para favorecer a ação na região UVA (COSMETICS EUROPE, 2011; BRASIL, 2012).

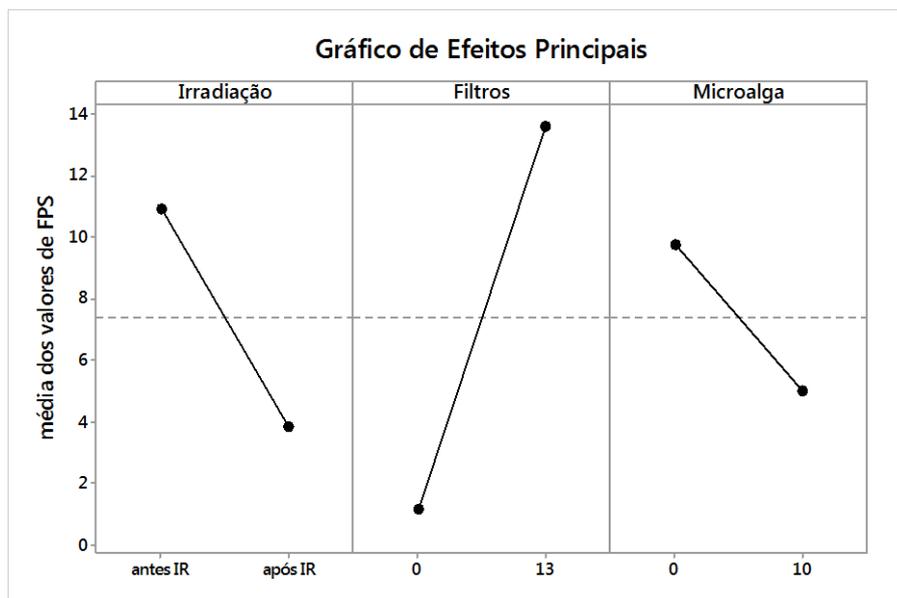
O fator de proteção solar (FPS) para as formulações F10 e F12 apresentaram diferença, tendo a primeira – contendo somente os filtros – melhor desempenho, exibindo valor de FPS superior ( $29,0 \pm 4,7$ ) em relação à F12 ( $12,0 \pm 1,5$ ), composta de filtros e a microalga *B. braunii*.

Por meio do gráfico de Pareto de causa e efeito (**Figura 17**), foi possível averiguar que todas as variáveis influenciaram no efeito do FPS, sendo que os filtros foram os que mais contribuíram na formulação e, por meio do gráfico de efeitos principais (**Figura 18**), constatou-se que a irradiação e a incorporação da microalga promoveram redução do FPS da formulação e que os filtros foram os responsáveis pela ação fotoprotetora.

**Figura 17.** Gráfico de Pareto ilustrando o efeito de cada variável e suas combinações para o resultado do FPS das formulações F9 a F12.



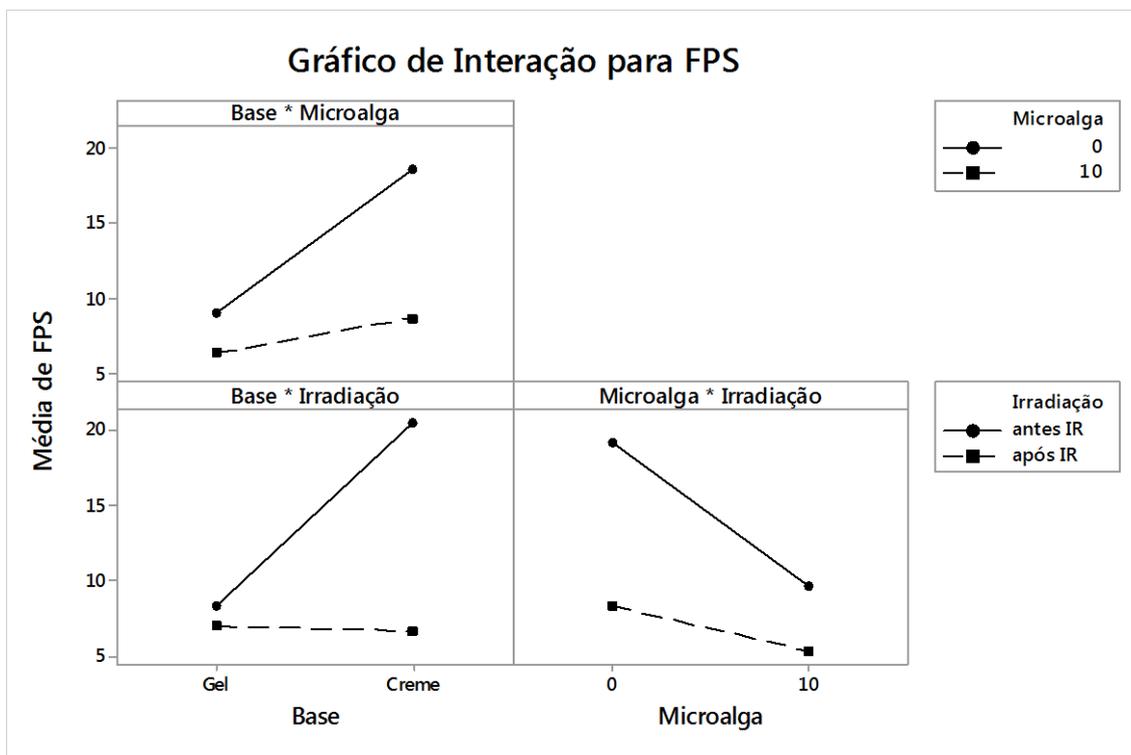
**Figura 18.** Gráfico de efeitos principais para o FPS das formulações F9 a F12.



Ao comparar o desempenho do FPS das formulações fotoprotetoras nas duas bases, foi possível determinar por meio do gráfico de interações (**Figura 19**) – o qual permite avaliar quais componentes influenciaram no resultado do FPS das amostras – que a base creme promoveu melhor FPS ao ser associada com a microalga antes do processo de irradiação, não havendo diferença do valor do FPS após referido processo em comparação com o valor

obtido na base gel. Ademais, foi possível observar que, em ambas as bases, a formulação contendo somente os filtros resultou em FPS superior em relação àquelas contendo a microalga com os filtros.

**Figura 19.** Gráfico de interações para o FPS das formulações fotoprotetoras com diferentes bases.



Indiferentemente da base utilizada, comprovou-se que, ao adicionar a biomassa seca da microalga na formulação fotoprotetora, esta produziu a redução do FPS, o que pode ter ocorrido em razão da interação dos filtros UV com compostos presentes na microalga, como por exemplo, a proteína (STIEFEL, SCHWACK, NGUYEN, 2015).

### 5.7.2. Avaliação do FPS e comprimento de onda crítico das formulações contendo a incorporação de extratos de *B. braunii*

A partir dos resultados obtidos, a formulação base creme foi selecionada para a incorporação dos diferentes extratos, uma vez que forneceu maior FPS e manteve o comprimento de onda crítico (nm) no intervalo do valor

recomendado (370 nm), sendo tal resultado atribuído, normalmente, ao fato de a preparação emulsionada promover a formação de filmes uniformes, espessos e não transparentes, proporcionando elevados níveis de fotoproteção (BRASIL, 2012; PINTO, 2014; SAMBANDAN, RATNER, 2011).

Na **Tabela 6** encontram-se os valores do FPS e do comprimento de onda crítico, antes e após o processo de irradiação das formulações F13 a F20, tendo na **Figura 20** a ilustração das respectivas curvas de absorvância.

**Tabela 6.** Valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm) *in vitro* das formulações F13 a F20 antes e após irradiação.

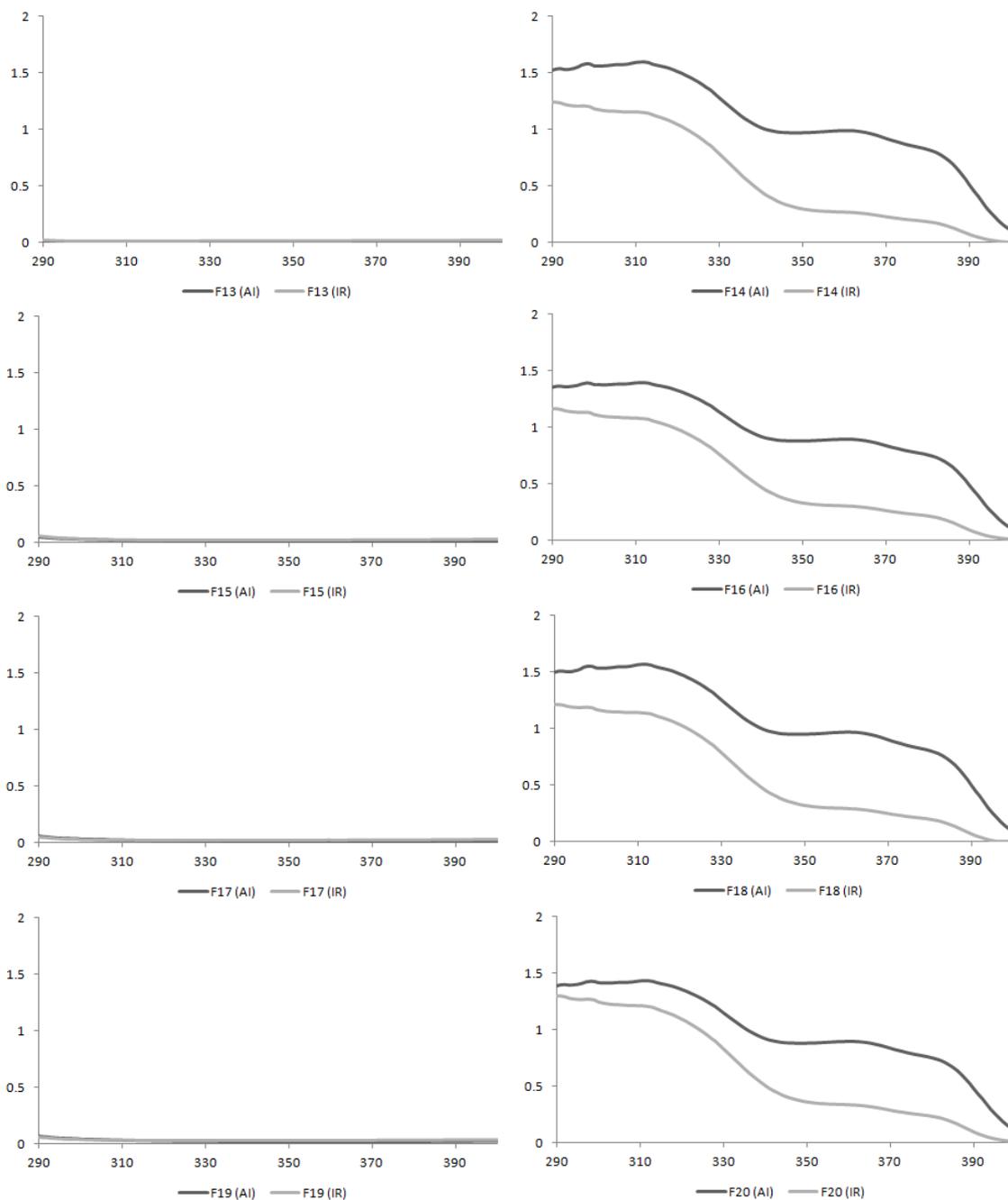
| Formulações | FPS                       |                          | Comprimento de Onda Crítico ( $\lambda_c$ ) |                           |
|-------------|---------------------------|--------------------------|---|---------------------------|
|             | Pré – irradiação          | Pós – irradiação         | Pré – irradiação                            | Pós – irradiação          |
| F13         | N.A.                      | N.A.                     | N.A.  | N.A.                      |
| F14         | 35,0 ± 3,2 <sup>Aa</sup>  | 9,0 ± 1,7 <sup>Ab</sup>  | 377,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>                   | 370,0 ± 3,0 <sup>Ab</sup> |
| F15         | N.A.                      | N.A.                     | N.A.  | N.A.                      |
| F16         | 21,0 ± 4,7 <sup>Ca</sup>  | 9,0 ± 1,1 <sup>Ab</sup>  | 378,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>                   | 363,0 ± 3,6 <sup>Ab</sup> |
| F17         | N.A.                      | N.A.                     | N.A.  | N.A.                      |
| F18         | 29,0 ± 2,8 <sup>Aba</sup> | 11,0 ± 1,1 <sup>Ab</sup> | 377,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>                   | 360,0 ± 2,5 <sup>Ab</sup> |
| F19         | N.A.                      | N.A.                     | N.A.  | N.A.                      |
| F20         | 23,0 ± 3,2 <sup>BCa</sup> | 12,0 ± 4,7 <sup>Ab</sup> | 378,0 ± 0,0 <sup>Aa</sup>                   | 363,0 ± 3,2 <sup>Ab</sup> |

**Legenda.** FPS = Fator de Proteção Solar; N.A. = não aplicável; F13 – Formulação creme base; F14 – Formulação creme com filtros; F15 – Formulação creme com EC; F16 – Formulação creme contendo filtros e EC; F17 – Formulação creme EM; F18 – Formulação creme contendo filtros e EM; F19 – Formulação creme com EE; F20 – Formulação creme contendo filtros e EE.

- Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

- Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa, tendo letra maiúscula para a diferença entre as formulações e minúscula para os dados antes e após a irradiação.

**Figura 20.** Curvas de absorvância das formulações F13 a F20, mensuradas no comprimento de onda entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) antes da etapa de irradiação (AI) e após (IR).



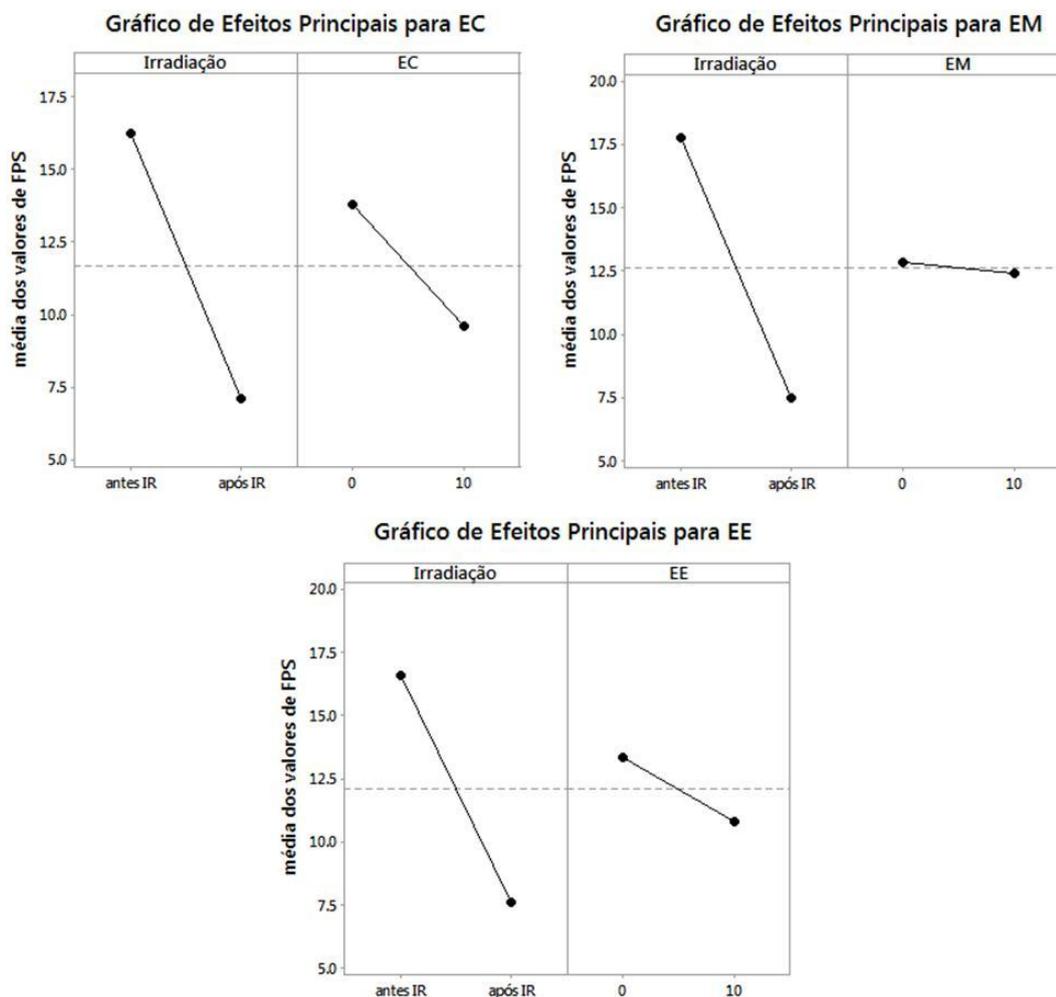
**Legenda.** F13 – Formulação creme base; F14 – Formulação creme com filtros; F15 – Formulação creme com EC; F16 – Formulação creme contendo filtros e EC; F17 – Formulação creme EM; F18 – Formulação creme contendo filtros e EM; F19 – Formulação creme com EE; F20 – Formulação creme contendo filtros e EE.

Constatou-se que, quando incorporados isoladamente, os extratos não foram capazes de exercer potencial de fotoproteção, comprovando que não possuem em sua composição substâncias que apresentem ação contra os raios UV ou concentração adequada de moléculas capazes de absorver a radiação UV – como fenóis totais –, resultando em FPS não significativo (MUNHOZ *et al.*, 2012; SIIPOLA *et al.*, 2015).

A incorporação dos extratos na formulação fotoprotetora resultou, antes do processo de irradiação, na redução do valor do FPS e em valores de comprimento de onda crítico acima do valor recomendado (370 nm). No entanto, após o processo de irradiação, tanto os valores de FPS quanto de comprimento de onda crítico decaíram de forma significativa.

A redução do valor do FPS pode ter decorrido da incompatibilidade de componentes dos extratos com os respectivos filtros, tendo o EM apresentado menor influência na redução do FPS, dado corroborado pelo gráfico de efeitos principais (**Figura 21**), provavelmente pelo fato de o metanol ter promovido a extração diferenciada de componentes – indicativo desta ação verificado pela análise em CLAE (item 5.5), na qual se observou menor quantidade e intensidade de picos –, o que pode ter reduzido a interferência destas substâncias na ação dos filtros (BOULEKBACHE-MAKHLOUF *et al.*, 2013; HERNANDES, 2015; MUNHOZ *et al.*, 2012; STIEFEL, SCHWACK, NGUYEN, 2015).

**Figura 21.** Gráficos de efeitos principais o qual compara o FPS das formulações fotoprotetoras em relação aos extratos e processo de irradiação.



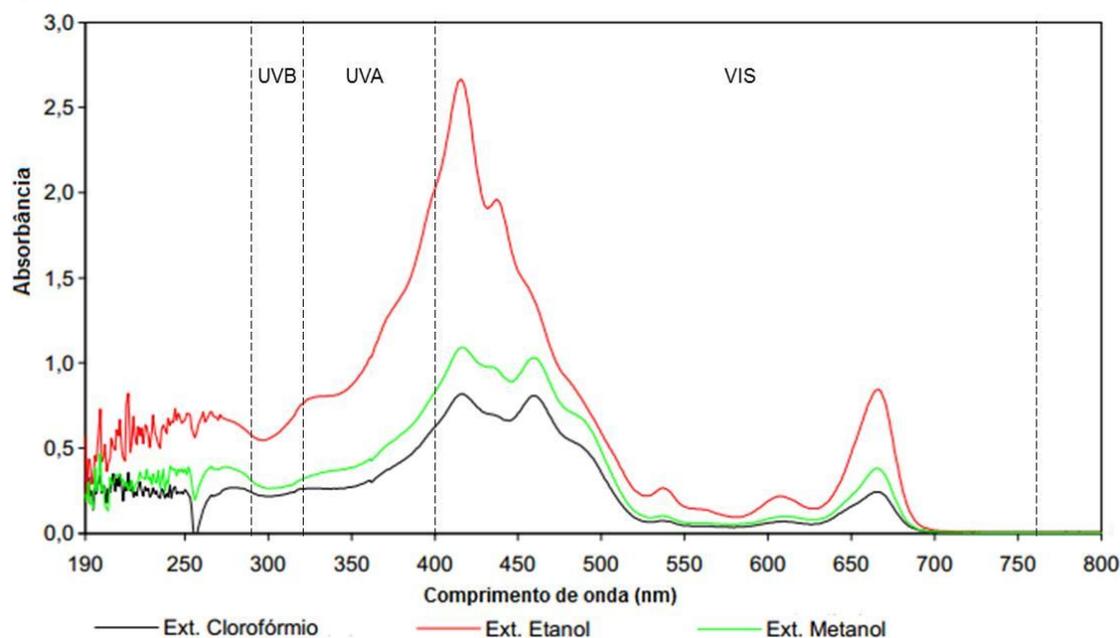
**Legenda.** 0 – sem presença do extrato; 10 – com presença do extrato; IR – Irradiado; FPS – Fator de Proteção Solar; EC – Extrato obtido com Clorofórmio; EM – Extrato obtido com Metanol; EE – Extrato obtido com Etanol.

Assim, ainda que se tenha realizado a extração dos compostos da microalga, a fim de incorporá-los à formulação fotoprotetora de forma mais concentrada, não foi constatada influência positiva no FPS da formulação e, após a irradiação, houve redução dos valores de comprimento de onda crítico (nm) para valor abaixo do recomendado (370 nm), indicando inexistência de ação na região UVA e, portanto, ausência de amplo espectro de ação (BRASIL, 2012; SASIDHARAN *et al.*, 2011; UNITED STATES, 2011)

Além da possibilidade de interação entre os filtros e os extratos, já mencionada, a ausência de contribuição destes para o FPS da formulação pode estar relacionado à sua eventual atuação na região da luz visível, e não

UV, pois, ao realizar a varredura<sup>1</sup> dos extratos na mesma proporção utilizada no preparo das formulações (**Figura 22**), verificou-se que possuem espectro que compreende a região do visível (400 – 700nm) (GRETHER-BECK *et al.*, 2014; PLEFKA *et al.*, 2011).

**Figura 22.** Varredura espectral dos diferentes extratos da *B. braunii*.



**Legenda.** Espectros dos extratos obtidos com diferentes solventes, sendo eles, clorofórmio, metanol e etanol (7:3 v/v), realizados em Espectrofotômetro UV-VIS Evolution<sup>®</sup> 600 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) com cubetas de quartzo e caminho óptico de 1,0 cm em intervalo espectral de 190 – 800 nm.

Os danos provenientes da luz visível são relativamente pouco exporados, mas é sabido que dependendo do comprimento de onda, pode provocar impactos fotobilológicos na pele, contribuindo para o fotoenvelhecimento, formação de radicais livres, redução da produção de colágeno e estímulo à pigmentação nas peles tipos IV-VI, também podendo culminar na formação de melasmas ou outras fotodermatoses, o que indica a necessidade de se incorporar nas formulações compostos que auxiliem na

<sup>1</sup> A varredura foi realizada com intuito de observar a região espectral de ação dos extratos na concentração utilizada no preparo da formulação. Método empregado: solução em DMSO, contendo 10,0% do extrato, sendo realizada, em seguida, sua leitura em espectrofotômetro UV-VIS Evolution<sup>®</sup> 600 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) com cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm, em intervalo espectral de 190 – 800 nm.

proteção da pele contra a luz visível (GRETHER-BECK *et al.*, 2014; J. KRUTMANN *et al.*, 2016; LIEBEL *et al.*, 2012; LOHAN *et al.*, 2016; MAHMOUD *et al.*, 2010; PLEFKA *et al.*, 2011; VANDERSEE *et al.*, 2015; ZASTROW *et al.*, 2009; ZASTROW, LADEMANN, 2016).

Dentro do espectro da luz visível, a luz azul (400 – 500 nm) atua na região próxima do espectro UVA e é particularmente importante, uma vez que pode penetrar de forma mais profunda na pele do que a radiação UV, por apresentar maior comprimento de onda. Esta radiação é capaz de produzir danos a nível celular, podendo promover redução da proliferação e diferenciação de queratinócitos, bem como interferir na diferenciação dos fibroblastos (CHIARELLI-NETO, *et al.*, 2014; J. KRUTMANN *et al.*, 2016; MODEPALLI, NAYAK, 2016).

Desta forma, diante da possibilidade de ação da microalga *B. braunii* na região do visível, segundo a varredura, com ação mais evidente na região próxima de 400 – 500 nm; bem como da necessidade de garantir a proteção da pele contra os malefícios causados por esta radiação, novos estudos podem ser direcionados para verificar a ação da microalga na prevenção dos danos provocados na faixa espectral do visível (CHIARELLI-NETO, *et al.*, 2014; J. KRUTMANN *et al.*, 2016; VANDERSEE *et al.*, 2015).

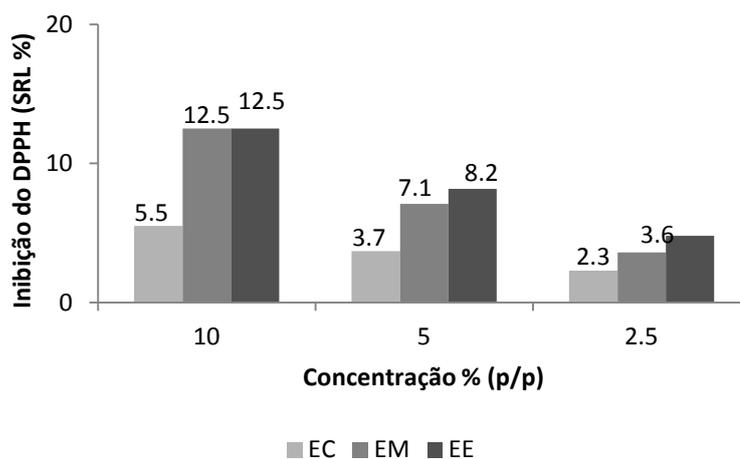
#### **5.8. Determinação do potencial antirradicalar do extrato e da formulação contendo o extrato da *B. braunii***

A atividade antioxidante da microalga *B. braunii* foi avaliada tanto nos extratos obtidos com diferentes solventes (variando às concentrações), quanto nas formulações em que os extratos foram incorporados.

Para analisar a capacidade de sequestro de radicais livres, foi utilizado o composto DPPH\* (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), que é um radical livre capaz de reagir com átomos de hidrogênio doados por substâncias antioxidantes, resultando na alteração da coloração da solução de roxa para amarela, devido à formação do composto *2,2-difenil-1-picril-hidrazina* de coloração amarela (AMATATONGCHAI *et al.*, 2012; BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER, BERSET, 1995; GÜLÇİN *et al.*, 2010; PYRZYNSKA, PEKAL, 2013).

Na análise dos extratos (**Figura 23**), realizada em diferentes concentrações, observou-se que a extração com o solvente clorofórmio resultou em porcentagem de inibição de DPPH<sup>\*</sup> inferior em relação aos demais solventes. Ao comparar os extratos obtidos pelos solventes etanol e metanol, constatou-se que estes apresentaram ação antioxidante semelhante.

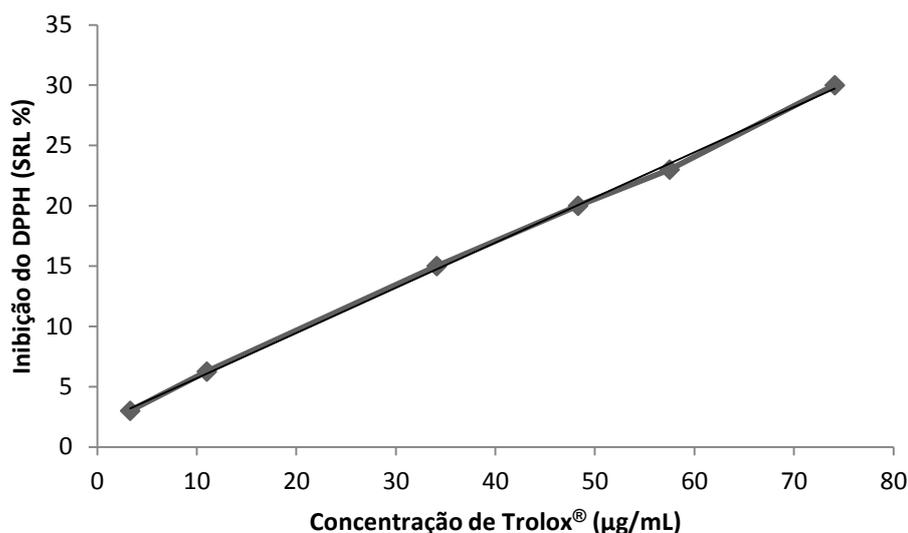
**Figura 23.** Potencial antioxidante dos extratos obtidos por diferentes solventes da microalga *B. braunii*.



Legenda. EC = Extrato obtido com solvente clorofórmio; EM = Extrato obtido com solvente metanol; EE = Extrato obtido com solvente etanol.

A ação antioxidante dos respectivos extratos em concentração 10% – concentração utilizada nas formulações – foi comparada com o padrão Trolox<sup>®</sup> (*tetramethylchroman-2-carboxylic acid*) (**Figura 24**), pois é uma substância com conhecida ação antioxidante, análoga à vitamina E, amplamente utilizada como referência em estudos com a finalidade de comparar a sua ação em relação ao material em análise (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012; MITTAL *et al.*, 2014; VILLAÑO *et al.*, 2007).

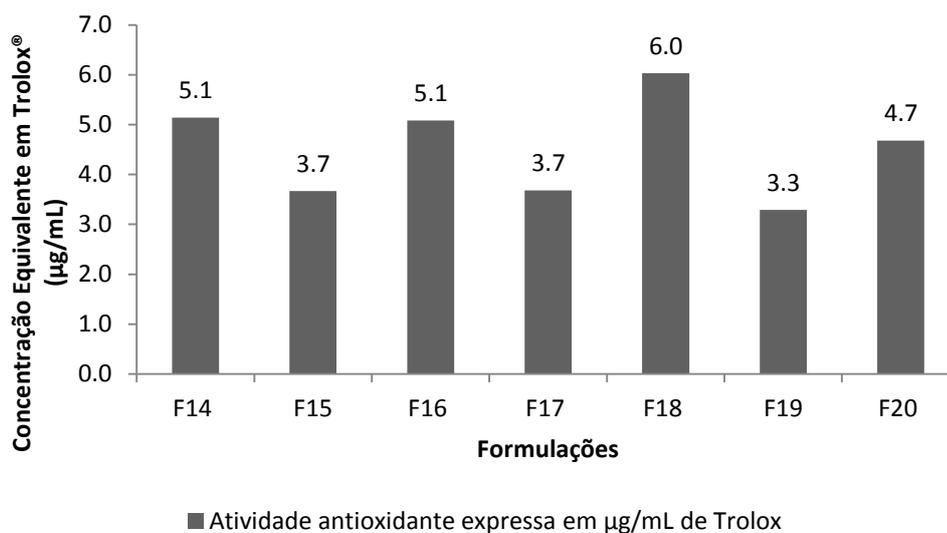
**Figura 24.** Curva de inibição do radical livre DPPH pelo padrão de Trolox®.



A partir da equação da reta ( $y = 2,665047x - 5,14598$ ;  $R^2 = 0,99$ ), obtida na curva do Trolox®, foi observado que o EC apresentou menor ação antioxidante, tendo equivalência com a concentração de 4,0 µg/mL do padrão, enquanto que os extratos obtidos por metanol e etanol resultaram em equivalência de 6,6 µg/mL de Trolox®. Este resultado provavelmente ocorreu devido à menor capacidade do clorofórmio de extrair, nesta microalga, substâncias que proporcionam ação antioxidante, como por exemplo, os compostos fenólicos, que apresentam maior afinidade com solventes polares e, portanto, mais difíceis de serem extraídos por solventes de baixa polaridade (BAGLA, *et al.*, 2016; HUSSEIN *et al.*, 2013; YE *et al.*, 2015; EDDINE, REDHA, LADJEL, 2016).

Apesar de constatar que os extratos não possuem ação antioxidante elevada, uma vez que possuem concentração inferior à concentração inibitória mínima de 50% ( $IC_{50}$ ) do Trolox®, correspondente a 20,7 µg/mL, foi analisado se, ao incorporá-los à formulação, a ação antioxidante relatada continuaria a ser exercida da mesma forma ou se provocaria alguma contribuição à formulação fotoprotetora. A **Figura 25** demonstra a ação antioxidante observada nas formulações F14 a F20.

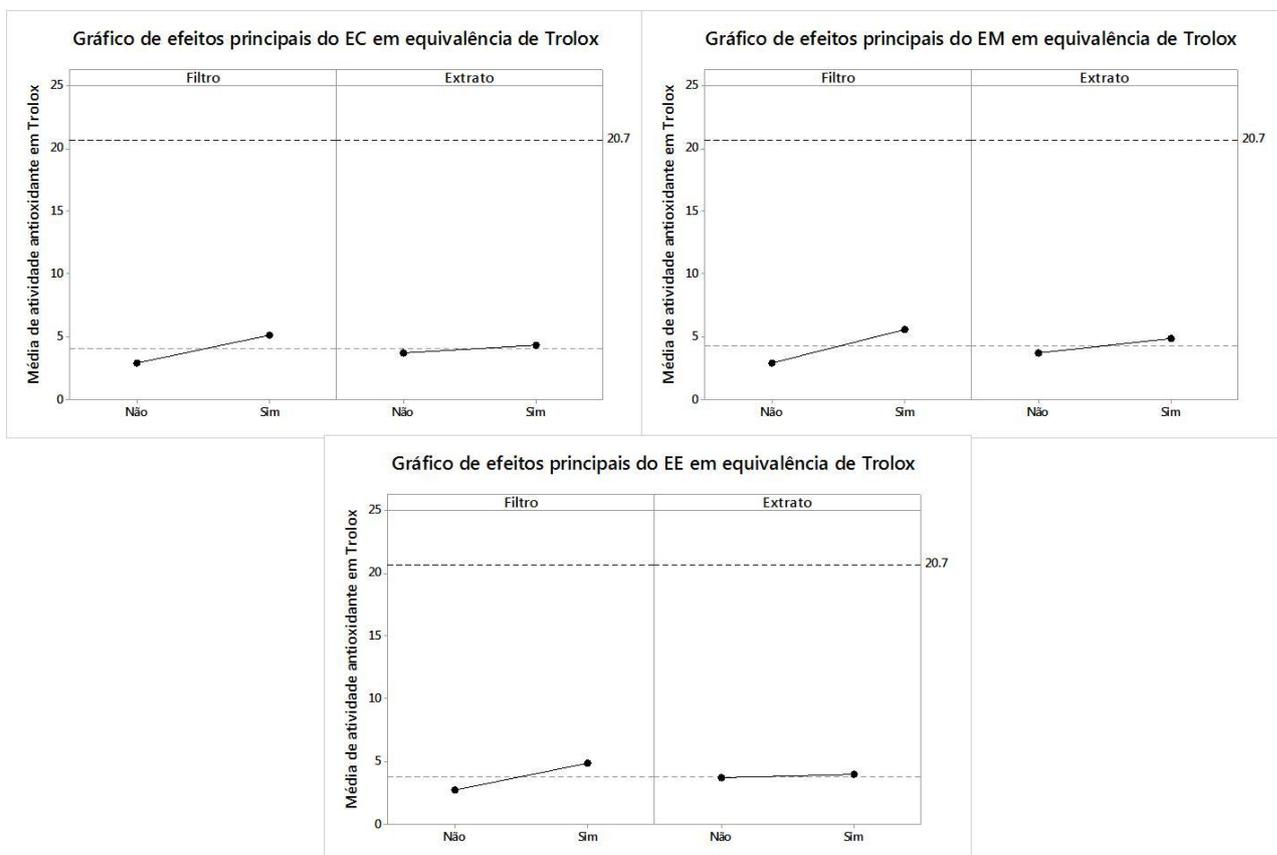
**Figura 25.** Atividade antioxidante das formulações F14 a F20 expressa em Trolox® ( $\mu\text{g/mL}$ ).



**Legenda.** F14 – Formulação creme com filtros; F15 – Formulação creme com EC; F16 – Formulação creme contendo filtros e EC; F17 – Formulação creme EM; F18 – Formulação creme contendo filtros e EM; F19 – Formulação creme com EE; F20 – Formulação creme contendo filtros e EE.

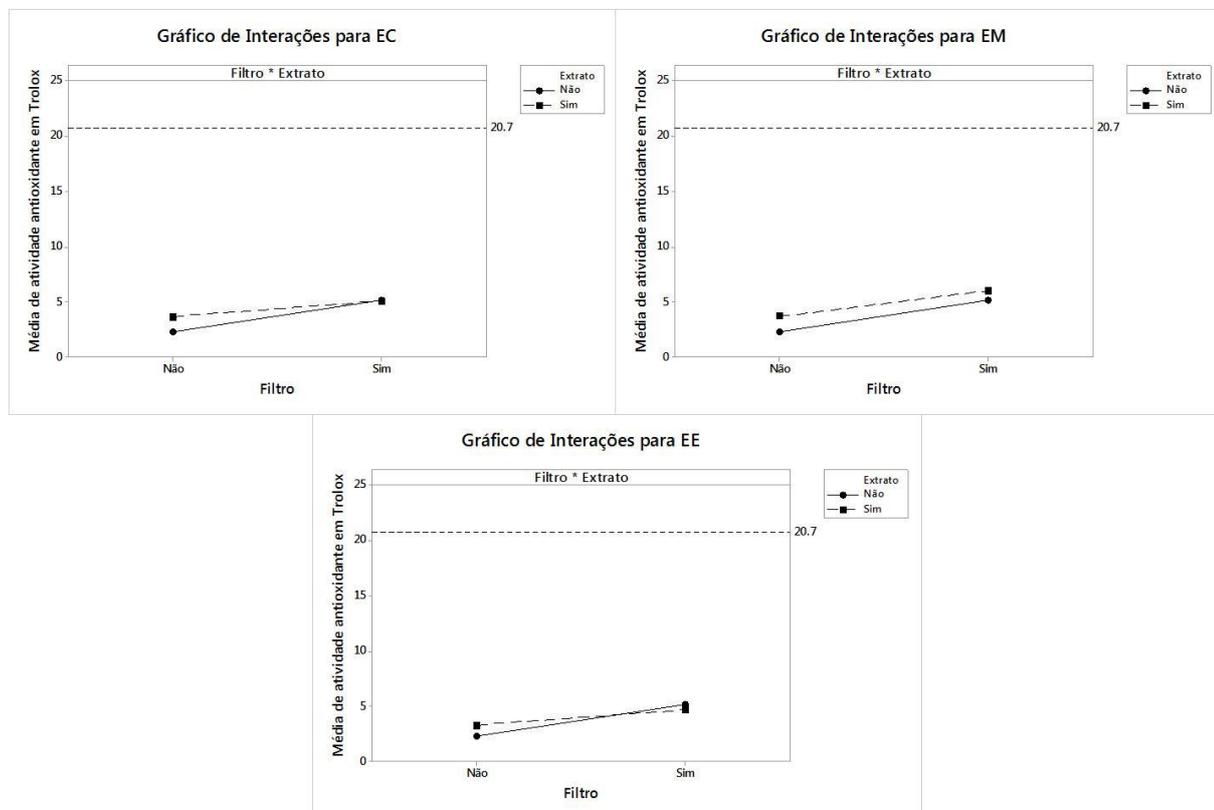
Por meio da análise estatística, elaborou-se o gráfico de Efeitos Principais (**Figura 26**), que representa cada variável isolada, sendo que quanto maior a inclinação da reta, maior é o impacto da variável no resultado. Com base neste gráfico, foi observado que, quando incorporados na formulação fotoprotetora, os extratos não apresentaram potencial de ação antioxidante, pois apresentam porcentagem de inibição inferior ao valor do  $\text{IC}_{50}$  do padrão Trolox® ( $20,7 \mu\text{g/mL}$ ), bem como não geraram impacto na atividade antioxidante, uma vez que houve mínima inclinação da reta (OLIVEIRA *et al.* 2016; PERES *et al.*, 2016).

**Figura 26.** Gráficos de Efeitos principais de cada variável em relação à atividade antioxidante para os diferentes extratos.



Ademais, foi observado no gráfico de interações (**Figura 27**) – o qual permite avaliar quais componentes influenciaram no resultado da atividade antioxidante das formulações – que houve interação dos extratos EC e EE na presença do filtro, contribuindo para a manutenção ou mesmo redução da ação antioxidante da formulação fotoprotetora (PERES *et al.*, 2016).

**Figura 27.** Gráficos de Interações para a atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras F14 a F20.



Portanto, apesar de existir dados na literatura que relatam que a microalga *B. braunii* apresenta atividade antioxidante eficaz, no presente estudo não foi constatada esta ação (BUONO *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2006; UQUICHE, ANTILAF, MILLAO, 2016). A ausência da ação antioxidante pode estar relacionada ao tipo de cepa e linhagem, pois existe diferença em relação à composição da microalga de acordo com estes fatores. Outra possibilidade está relacionada às condições de crescimento da microalga, uma vez que é sabido que sua composição pode ser alterada durante o crescimento, conforme a presença de luz, salinidade e nutrientes, entre outros fatores (RAO *et al.*, 2006; SABEENA, FARVIN, JACOBSEN, 2013; SKJÅNES, REBOURS, LINDBLAD, 2012).

Ademais, a ação pode ter sido prejudicada pelo método de extração utilizado, bem como pelo tipo de solvente, os quais podem não ter permitido a obtenção de concentração suficiente de compostos antioxidantes da biomassa da microalga, tais como fenóis totais e carotenoides, contribuindo para o

resultado ineficaz da redução do radical livre DPPH<sup>•</sup> e, conseqüentemente, para a ineficiência da microalga para a ação antioxidante (CUSTÓDIO *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2006).

*Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais adotadas, pode-se concluir que durante o cultivo da microalga *Botryococcus braunii* houve crescimento celular adequado, gerando, aproximadamente, 4,0 g de biomassa por fotobiorreator.

A biomassa apresentou teor de lipídeos totais (25,65%) compatível com os relatos na literatura, comprovando a característica da microalga em relação à produção destes compostos. A quantidade de proteínas (49,17%) na biomassa da *B. braunii* foi superior à descrita na literatura.

Com relação à quantidade de fenóis totais, observou-se que os valores obtidos, em concentração equivalente ao padrão ácido cafeico, foram inferiores aos dados obtidos em estudo já realizado para a mesma espécie e gênero, tanto para o extrato EE quanto para o EM, indicando que a alteração das condições de crescimento da microalga, além do tipo de processo utilizado para obtenção da biomassa seca, pode influenciar nos componentes ativos presentes no extrato.

A partir da biomassa seca e de seus extratos, foram preparadas formulações com dois tipos de base (gel e creme), nas quais se verificou compatibilidade entre os componentes incorporados.

Quanto à atividade fotoprotetora e fotoestabilidade das formulações contendo a biomassa seca ou extratos, independentemente da base utilizada e forma de incorporação, a microalga *B. braunii* desempenhou eficácia considerada inadequada na presença dos filtros, sendo observado que a base creme acrescida dos filtros foi a que apresentou melhor desempenho em relação ao FPS da formulação.

Na análise da atividade antioxidante dos extratos e das formulações, foi constatado que não ocorreu ação antioxidante significativa, pois foram obtidos valores inferiores – 4,0; 6,6; e 6,6 respectivamente para EC, EM e EE – ao correspondente à concentração inibitória mínima de 50% do padrão (20,7 µg/mL). O mesmo ocorreu quando os extratos foram incorporados na formulação, sendo possível identificar provável interação entre a microalga e os filtros, o que pode ter interferido na ação antioxidante.

Dessa forma, constatou-se que os extratos obtidos da microalga *B. braunii* não apresentaram eficácia quanto à atividade antioxidante quando

incorporados à formulação, bem como não houve influência da microalga ou de seus extratos na fotoproteção e fotoestabilidade das formulações.

*Referências*

## 7. REFERÊNCIAS

ABUÇAFY, M. P. *et al.* Gel Based Sunscreen Containing Surface Modified TiO<sub>2</sub> Obtained by Sol-Gel Process : Proposal for a Transparent UV Inorganic Filter. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 9, 2016.

ACHITOUV, E. *et al.* C 31-C 34 methylated squalenes from a Bolivian strain of *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3159–3165, 2004.

ADRIANO, J. *et al.* Development of a topical gel containing dried extract of *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 34, p. 1074–1080, 2014.

AFONSO, S. *et al.* Photodegradation of avobenzene: Stabilization effect of antioxidants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 36–40, 2014.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143–152, 2013.

AL-HOTHALY, K. A. *et al.* The effect of nutrients and environmental conditions on biomass and oil production in *Botryococcus braunii* Race B strains. **European Journal of Phycology**, v. 51, n. 1, p. 1–10, 2016.

ALI, M. *et al.* Correlation between Sun Protection Factor and Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of some Medicinal Plants. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 1041–1047, 2014.

AL-SAIF, S. S. A.; ABDEL-RAOUF, N.; AREF, I. A. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea , Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 57–64, 2014.

AMATATONGCHAI, M. *et al.* Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 97, p. 267–272, 2012.

ANTIGNAC, E. *et al.* Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 324–341, 2011.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 14. ed. Arlington: AOAC, 1984. 1141 p.

ARAUJO, G.; ROSADO, C.; FERNANDES, A. S. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin- based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. **Pharmaceutical sciences**, v. 81, p. 1–9, 2016.

ARAUJO, T.; SOUZA, S. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2008.

BADEA, G. *et al.* Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 18–24, 2015.

BAGLA, V. P. *et al.* Antibacterial and antimetastatic potential of *Diospyros lycioides* extract on cervical cancer cells and associated pathogens. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

BALOGH, T. S. *et al.* Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732–742, 2011.

BANERJEE, A. *et al.* Botryococcus braunii: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 245–279, 2002.

BATISTA, A. P. *et al.* Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 164–173, 2013.

BAYDAR, N. G.; BAYDAR, H. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 375–380, 2013.

BISSONNETTE, R. Update on Sunscreens. **Skin Therapy Letter**, v. 13, p. 5–7, 2008.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L. *et al.* Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. **Industrial Crops & Products**, v. 49, p. 668–674, 2013.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 30, DE 1 DE JUNHO DE 2012**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

BUONO, S. *et al.* Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, p. 755–764, 2012b.

CAMPANINI, M. Z. *et al.* Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 86–95, 2014.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CEFALI, L. C. *et al.* Plant-based active photoprotectants for sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, p. 1–8, 2016.

CESTARI, T. F.; OLIVEIRA, F. B. DE; BOZA, J. C. Considerations on photoprotection and skin disorders. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 139, p. S135–S143, 2012.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013–1024, 2012.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH<sup>•</sup> assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414–420, 2013.

CHIARELLI-NETO, O. *et al.* Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **PLoS One**, v. 9, n. 11, e113266, 2014.

CHIARI, B. G. *et al.* Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 389–393, 2014.

CHOOCHOTE, W.; SUKLAMPOO, L.; OCHAIKUL, D. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 43–48, 2014.

CHOQUENET B. *et al.* 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.

COSMETICS EUROPE. ***In vitro* method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products.** Brussels, 2011, 28 p..

CRODA EUROPE. **Crodafos CES**, 2016.

CUSTÓDIO, L. *et al.* *Botryococcus braunii* and *Nannochloropsis oculata* extracts inhibit cholinesterases and protect human dopaminergic SH-SY5Y cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 839–848, 2015.

DANIELS, R. **Emulsifier-free, polymer-stabilized foam formulations**, 2012.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 2012.

DAYANANDA, C. *et al.* Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 78–91, 2007a.

DAYANANDA, C. *et al.* Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 1, p. 87–93, 2007b.

DE OLIVEIRA, C. A. *et al.* Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and**

**Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 154–159, 2015.

DE OLIVEIRA, C. A. *et al.* Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. **Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 1–9, 2016a.

DE OLIVEIRA, C. A. *et al.* Safety and efficacy evaluation of gelatin-based nanoparticles associated with UV filters. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 531–537, 2016b.

DEMURA, M. *et al.* Desiccation tolerance of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and extreme temperature tolerance of dehydrated cells. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 49–53, 2014.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430–1435, 2011.

DUEVA-KOGANOV, O. V. *et al.* Addressing technical challenges associated with the FDA's proposed rules for the UVA in vitro testing procedure. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 60, p. 587–598, 2009.

EDDINE, L.; REDHA, O. M.; LADJEL, S. Influence of solvent extraction on phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of aerial parts extract from Algerian *Artemisia Herba-alba*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 10, p. 58-64, 2016.

EROGLU, E.; OKADA, S.; MELIS, A. Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: Comparative methods in product quantification. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 4, p. 763–775, 2011.

FANG, J. Y. *et al.* Fatty acids in *Botryococcus braunii* accelerate topical delivery of flurbiprofen into and across skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, p. 163–173, 2004.

FREITAS, J. V.; LOPES, N. P.; GASPAR, L. R. Photostability evaluation of five UV-filters, trans-resveratrol and beta-carotene in sunscreens. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 78, p. 79–89, 2015.

FURUHASHI, K. *et al.* Effects of culture medium salinity on the hydrocarbon

extractability, growth and morphology of *Botryococcus braunii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 83–90, 2016a.

FURUHASHI, K. *et al.* The surface structure of *Botryococcus braunii* colony prevents the entry of extraction solvents into the colony interior. **Algal Research**, v. 16, p. 160–166, 2016b.

GAROLI, D. *et al.* Effectiveness of different substrate materials for *in vitro* sunscreen tests. **Journal of Dermatological Science**, v. 56, p. 89–98, 2009.

GASPAR, L. R. *et al.* Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 418–425, 2013.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 181–189, 2007.

GHITESCU, R. *et al.* Ultrasonics Sonochemistry Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 22, p. 535–541, 2015.

GOIRIS, K. *et al.* Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1477–1486, 2012.

GREYER-BECK, S. *et al.* Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 30, p. 167–174, 2014.

GÜLÇİN, I. *et al.* Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.

HAGINO, H.; SAITO, M. **Use of algal proteins in cosmetics**, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 704 p.

HERNANDES, L. S. **Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações**

de *Jacaranda decurrens* Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e *Piper umbellatum* L. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

HIROSE, M. *et al.* Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (race A). **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 8, p. 1132–1141, 2013.

HU, Q. *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

HUNER, N. *et al.* **Solar radiation protection composition**, 2004.

HUPEL, M.; POUPART, N.; GALL, E. Development of a new *in vitro* method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, v. 86, p. 362–371, 2011.

HUSSEIN, M. *et al.* Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops & Products**, v. 43, p. 827–831, 2013.

JANSEN, R. *et al.* Photoprotection: Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 6, p. 1–12, 2013a.

JANSEN, R. *et al.* Photoprotection: Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, p. 1–14, 2013b.

KANATT, S. R. *et al.* *Kappaphycus alvarezii*: its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2015.

KAWAKAMI, C. M.; GASPAR, L. R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 239–247, 2015.

KIM, E. J. *et al.* Photolysis of the organic UV filter, avobenzone, combined with octyl methoxycinnamate by nano-TiO<sub>2</sub> composites. **Journal of**

**Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 149, p. 196–203, 2015.

KOLLER, M. *et al.* Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 37, p. 377–388, 2012.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

J. KRUTMANN, *et al.* The skin aging exposome. **Journal of Dermatological Science**, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.09.015>.

KUMAR, V.; MURUGESAN, S.; BHUVANESWARI, S. Phytochemical analysis of red alga *Champia parvula* (C. Agardh) collected from Mandapam coast of Tamil Nadu, India. **International Journal of Advances in Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 15–20, 2015.

LEE, J.-C. *et al.* Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 55, 2013.

LEE, S. J.; YOON, B. D.; OH, H. M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 7, p. 553–556, 1998.

LEVI, K. UV damage and sun care: deciphering mechanics of skin to develop next generation therapies. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 28, p. 471–473, 2013.

LHIAUBET-VALLET, V. *et al.* Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 9, p. 552–558, 2010.

LI, W. *et al.* Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of Chinese marigold. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8478–8484, 2007.

LI, Y.; QIN, J. G. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 551–556, 2005.

LIEBEL, F. *et al.* Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1901–1907, 2012.

LOHAN, S. B. *et al.* Free radicals induced by sunlight in different spectral regions – *in vivo* versus *ex vivo* study. **Experimental Dermatology**, v, 25, p. 380–385, 2016.

LORENCINI, M. *et al.* Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 100–115, 2014.

LOTAN, A. **Biologic sunscreen composition**, 2012.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. DE. Focused microwave-assisted soxhlet extraction: devices and applications. **Talanta**, v. 64, n. 3, p. 571–577, 2004.

MA, N. L. *et al.* Optimization of cell disruption methods for efficient recovery of bioactive metabolites via NMR of three freshwater microalgae (chlorophyta). **Bioresource Technology**, v. 190, p. 536–542, 2015.

MAADANE, A. *et al.* Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

MACHU, L. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. **Molecules**, v. 20, p. 1118–1133, 2015.

MAHMOUD, B. H. *et al.* Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. **Journal of investigative dermatology**, v. 130, n. 8, p. 2092–2097, 2010.

MARTINS, A. *et al.* Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066–1101, 2014.

MARTINS, F. J. *et al.* Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34–39, 2016.

MARTORANA, M. *et al.* *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. **Fitoterapia**, v. 85, n. 1, p. 41–48, 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

METZGER, P.; LARGEAU, C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 486–496, 2005.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.

MITTAL, A. K. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 415, p. 39–47, 2014.

MODEPALLI N.; NAYAK S. Protective action of lutein against blue light on human skin cell lines, 2016.

MOTA, A. C. V; FREITAS, Z. M. F.; TODESCHINI, A. R. Inclusão do Filtro Solar *p*- Metoxicinamato de Octila em  $\beta$  -Ciclodextrina e Avaliação da Purificação dos Complexos de Inclusão por RMN 1H. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 97–99, 2009.

MUNHOZ, V. M. *et al.* Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 2, p.225-232, 2012.

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

NISHIKAWA, D. D. O. *et al.* Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 91–100, 2013.

NOIPA, T. *et al.* New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 798–806, 2011.

OLIVEIRA, J.D. *et al.* Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 502-510, 2016.

OLGUÍN, E. J. *et al.* The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 19–24, 2001.

OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? **FEMS Microbiology Letters**, v. 269, n. 1, p. 1–10, 2007.

ORESJO, C. *et al.* Antioxidants and the skin: understanding formulation and efficacy. **Dermatologic therapy**, v. 25, p. 252–259, 2012.

ÓRPEZ, R. *et al.* Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Desalination**, v. 246, n. 1-3, p. 625–630, 2009.

PALLELA, R.; NA-YOUNG, Y.; KIM, S. K. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1189–1202, 2010.

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

PELIZER, L. H. *et al.* Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Farmácia e Química**, v. 32, n. 1, p. p. 37–40, 1999.

PEREIRA, M. *et al.* Photostabilization of sunscreens by incorporation of tea as the external phase. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 107–116, 2015.

PERES, D. D. *et al.* Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility. **Skin Research and Technology**, p. 1–9, 2015.

PERES, D. D. *et al.* Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2016.

PERES, L. P. A.; DIAS, I. L. T. Desenvolvimento e avaliação de formulações em gel para veiculação de ácido salicílico. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, v. Ano III, n. 5, p. 26–36, 2011.

PÉREZ-MORA, L. S. *et al.* An investigation of producing *Botryococcus braunii* in tubular photobioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2016.

PINTO, C. A. S. D. O. **Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. L. AND; POHL, P. Biomass production, total protein, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207–216, 1984.

PLEFKA, T. G. *et al.* Effects of solar radiation on the skin. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 11, p. 134–143, 2011.

POP, A.-V. *et al.* Evaluation of Antioxidant Activity and Phenolic Content in Different *Salvia officinalis* L. Extracts. **Bulletin UASVM Food Science and Technology**, v. 71, n. 2, p. 195–199, 2015.

POPIM, R. C. *et al.* Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1331–1336, 2008.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4288–4295, 2013.

RAMOS-E-SILVA, M. *et al.* Anti-aging cosmetics: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 6, p. 750–758, 2013.

RAO, A. R. *et al.* Antioxidant Activity of *Botryococcus braunii* Extract Elucidated

in Vitro Models. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 4593–4599, 2006.

RAO, A. R. *et al.* Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 560–564, 2007.

RAO, A. R. *et al.* Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8553–8559, 2010.

RIBEIRO, C. J. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

ROJAS, J.; LONDOÑO, C.; CIRO, Y. The health benefits of natural skin UVA photoprotective compounds found in botanical sources. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 13–23, 2016.

SABEENA FARVIN, K. H.; JACOBSEN, C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1670–1681, 2013.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Natural Products as Photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 14, p. 47–63, 2015.

SAFAFAR, H. *et al.* Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.

SAKLANI, S.; CHANDRA, S.; MISHRA, A. P. Evaluation of antioxidant activity, quantitative estimation of phenols, anthocynins and flavonoids of wild edible fruits of garhwal himalaya. **Journal of pharmacy Research**, v. 4, n. 11, p. 4083–4086, 2011.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y. J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 948–960, 2012.

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

2011.

SANTI, M. M. *et al.* Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 256–261, 2014.

SARANYA, C. *et al.* Evaluation of antioxidant properties, total phenolic and carotenoid content of *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina* and *Isochrysis galbana*. **International Journal of current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 365–377, 2014.

SASIDHARAN, S. *et al.* Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **Afr J Tradit Complement AlternMed.**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 2, p. 273–278, 2010.

SCHLUMPF, M. *et al.* Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - An update. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 113–122, 2004.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202–1205, 2009.

SHICK, J. M.; DUNLAP, W. C. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. **Annual Review of Physiology**, v. 64, n. 1, p. 223–262, 2002.

SIERRA, A. F. *et al.* In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 69, n. 3, p. 202–214, 2013.

SIIPOLA, S. M. *et al.* Epidermal UV-A absorbance and whole-leaf flavonoid composition in pea respond more to solar blue light than to solar UV radiation. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 941–952, 2015.

SINHA, R. P.; SINGH, S. P.; HÄDER, D. P. Database on mycosporines and

mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, n. 1, p. 29–35, 2007.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172–215, 2012.

SKOTARCZAK, K. *et al.* Photoprotection: facts and controversies. **European Review for Medical and Pharmacological Science**, v. 19, p. 98–112, 2015.

SOHN, M. *et al.* Calculation of the sun protection factor of sunscreens with different vehicles using measured film thickness distribution — comparison with the SPF in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 74–81, 2016.

SPRINGSTEEN, A. *et al.* In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v. 380, p. 155–164, 1999.

STIEFEL, C.; SCHWACK, W. Rapid screening method to study the reactivity of UV filter substances towards skin proteins by high-performance thin-layer chromatography. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 6, p. 588–599, 2013.

STIEFEL, C.; SCHWACK, W. Reactivity of cosmetic UV filters towards skin proteins: model studies with Boc-lysine, Boc-Gly-Phe-Gly-Lys-OH, BSA and gelatin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 6, p. 561–570, 2014.

STIEFEL, C.; SCHWACK, W.; NGUYEN, Y. T. H. Photostability of cosmetic UV filters on mammalian skin under UV exposure. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 1, p. 84–91, 2015.

SUH, S. S. *et al.* Anti-inflammation activities of mycosporine-like amino acids (MAAs) in response to UV radiation suggest potential anti-skin aging activity. **Marine Drugs**, v. 12, n. 10, p. 5174–5187, 2014.

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

TOFETTII, M.; OLIVEIRA, V. A importância do uso do filtro solar na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele. **Investigação – Revista Científica da Universidade de Franca**, v. 6, n. 1, p. 59–66, 2010.

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, 2011.

UQUICHE, E; ANTILAF, I; MILLAO, S. Enhancement of pigment extraction from *B. braunii* pretreated using CO<sub>2</sub> rapid depressurization. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 497-505, 2016.

UTEX. **The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin**. Disponível em: <<http://www.sbs.utexas.edu/utex/>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

VANDERSEE, S. *et al.* Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-7, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/579675>

VELASCO, M. V. *et al.* Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 9, p. 119–130, 2012.

VELASCO, M. V. R. *et al.* 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.

VILLAÑO, D. *et al.* Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230–235, 2007.

WANG, H. M. D. *et al.* Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 355–362, 2015.

WARD, F. In vitro antioxidant activity from ethanolic extract of green alga, *mougeotia scalaris*. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive**, v. 4, n. 2, p. 1–6, 2016.

XIN, L. *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 2010.

XU, L. *et al.* Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 178–189, 2009.

ZANINI, M. Gel de ácido tricloroacético - Uma nova técnica para um antigo ácido. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 35, n. 1, p. 14–17, 2007.

YE, F. *et al.* Solvent effects on phenolic content, composition, and antioxidant activity of extracts from florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 574–581, 2015.

ZASTROW, L. *et al.* The missing link - Light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 1, p. 31–44, 2009.

ZASTROW, L.; LADEMANN, J. Light - Instead of UV Protection: New Requirements for Skin Cancer Prevention. **Anticancer Research**, v. 36, p. 1389-1394, 2016.

ZHILA, N. O.; KALACHEVA, G. S.; VOLOVA, T. G. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 47–52, 2011.

*Anexos*

## 8. ANEXOS

### Anexo I. Artigo científico publicado

DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, 2016  
<http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2016.1236809>



#### RESEARCH ARTICLE

### Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens

Daniela D'Almeida Peres<sup>a</sup>, Maira Bueno Ariede<sup>a</sup>, Thalita Marcilio Candido<sup>a</sup>, Tania Santos de Almeida<sup>b</sup>, Felipe Rebello Lourenço<sup>a</sup>, Vladi Olga Consiglieri<sup>a</sup>, Telma Mary Kaneko<sup>a</sup>, Maria Valéria Robles Velasco<sup>a</sup> and André Rolim Baby<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>b</sup>CBIOS, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, Lisbon, Portugal

#### ABSTRACT

Multifunctional formulations are of great importance to ensure better skin protection from harm caused by ultraviolet radiation (UV). Despite the advantages of Quality by Design and Process Analytical Technology approaches to the development and optimization of new products, we found in the literature only a few studies concerning their applications in cosmetic product industry. Thus, in this research work, we applied the QbD and PAT approaches to the development of multifunctional sunscreens containing bemotrizinol, ethylhexyl triazone, and ferulic acid. In addition, UV transmittance method was applied to assess qualitative and quantitative critical quality attributes of sunscreens using chemometrics analyses. Linear discriminant analysis allowed classifying unknown formulations, which is useful for investigation of counterfeit and adulteration. Simultaneous quantification of ethylhexyl triazone, bemotrizinol, and ferulic acid presented at the formulations was performed using PLS regression. This design allowed us to verify the compounds in isolation and in combination and to prove that the antioxidant action of ferulic acid as well as the sunscreen actions, since the presence of this component increased 90% of antioxidant activity *in vitro*.

#### ARTICLE HISTORY

Received 18 March 2016  
Revised 13 July 2016  
Accepted 12 September 2016  
Published online 13 October 2016

#### KEYWORDS

Ferulic acid; photoprotection; antioxidant activity; factorial experimental design

## Anexo II. Currículo Lattes



### Máira Bueno Ariede

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2967716341650025>

Última atualização do currículo em 17/11/2016

#### Resumo informado pelo autor

Mestranda na área de Produção e Controle Farmacêuticos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Farmacêutica formada em dezembro de 2012 pela Universidade de Santo Amaro.

(Texto informado pelo autor)

#### Dados pessoais

**Nome** Máira Bueno Ariede  
**Filiação** Edson Luiz Ariede e Olga Godoy Bueno Ariede  
**Nascimento** 30/04/1989 - São Paulo/SP - Brasil

#### Formação acadêmica/titulação

- 2014** Mestrado em Fármacos e Medicamentos.  
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
 Título: Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em formulações cosméticas fotoprotetoras  
 Orientador: André Rolim Baby   
 Co-orientador: João Carlos Monteiro de Carvalho  
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2012** Graduação em Farmácia.  
 Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil  
 Título: Obtenção e Caracterização Fitoquímica dos Extratos Hidroalcoólico e Hidrolipídico de Folhas de Eugenia Involucrata D.C. com Respeito ao Desenvolvimento e Avaliação da Estabilidade Preliminar de Géis Cosméticos Contendo Extrato Hidrolipídico.  
 Orientador: Fabson Miranda da Gama

#### Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Atuação do farmacêutico na UFL (Carga horária: 4h).  
 Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Uso racional de antibióticos. (Carga horária: 8h).  
 Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** 9º SEFAR. (Carga horária: 16h).  
 Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** 8º SEFAR. (Carga horária: 16h).  
 Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Pesquisa Clínica. (Carga horária: 8h).  
 Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil

#### Prêmios e títulos

- 2012** Prêmio Paulo Minami, Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo

#### Produção

Produção bibliográfica

##### Artigos completos publicados em periódicos

-  PERES, DANIELA D'ALMEIDA; ARIEDE, MAIRA BUENO; CANDIDO, THALITA MARCOLIO; ALMEIDA, TANIA SANTOS DE; LOURENÇO, FELIPE REBELLO; CONSIGLIERI, VLADI OLGA; KANEKO, TELMA MARY; VELA SCO, MARIA VALÉRIA ROBLES; BABY, ANDRÉ ROLIM  
 Quality by Design (QbD), Process Analytical Technology (PAT) and Design of Experiment Applied to the

## Eventos

---

### Eventos

#### Participação em eventos

1. Conferencista no(a) 16º SEFAR - Semana de Farmácia (UNISA), 2016. (Outra)  
Cosméticos orgânicos e verdes.
2. Workshop: Saiba como obter medições de pH confiáveis e robustas!, 2015. (Outra)  
-
3. Cosmetologia Social, 2014. (Outra)  
Aula Prático-Demonstrativa do Programa Cosmelo\_Social.
4. Seminário da Comissão de Pesquisa, 2013. (Seminário)  
-
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) XVII Congresso Paulista de Farmacêuticos e IX Seminário Internacional de Farmacêuticos, 2013. (Congresso)  
DEVELOPMENT OF GEL FORMULATIONS FOR COSMETIC USE CONTAINING HYDROGLYCOLIC EXTRACT OF LEAVES EUGENIA INVOLUCRATA D.C.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) VIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e I International Symposium of Pharmacognosy, 2012. (Simpósio)  
Phytochemical screening and antioxidant activity of alcoholic and glycolic extracts of leaves of Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae).
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) 14º Congresso de Iniciação Científica e 8ª Mostra de Pós-Graduação, 2011. (Congresso)  
Obtenção e avaliação dos perfis fitoquímicos e atividade antioxidante de extratos alcoólico e glicólico de folhas de Eugenia involucrata DC.

#### Organização de evento

1. ARIEDE, M. B.  
11ª Semana Farmacêutica da UNISA, 2011. (Outro, Organização de evento)
2. 🌟 ARIEDE, M. B.  
10ª Semana Farmacêutica da UNISA, 2010. (Outro, Organização de evento)

## Totais de produção

---

### Produção bibliográfica

|   |          |
|---|----------|
| Artigos completos publicados em periódico | <b>1</b> |
| <b>Eventos</b>                            |          |
| Participações em eventos (congresso)      | <b>2</b> |
| Participações em eventos (seminário)      | <b>1</b> |
| Participações em eventos (simpósio)       | <b>1</b> |
| Participações em eventos (outra)          | <b>3</b> |
| Organização de evento (outro)             | <b>2</b> |

## Anexo III. Ficha do Aluno

17/11/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9139 - 8713883/1 - Maira Bueno Ariede

**Email:** mbariede@usp.br  
**Data de Nascimento:** 30/04/1989  
**Cédula de Identidade:** RG - 45.584.907-9 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutica - Universidade de Santo Amaro - Brasil - 2013

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Fármaco e Medicamentos  
**Área:** Produção e Controle Farmacêuticos  
**Data de Matrícula:** 10/07/2014  
**Início da Contagem de Prazo:** 10/07/2014  
**Data Limite para o Depósito:** 10/01/2017  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 10/07/2014 até o presente. Email: andrerb@usp.br  
**Co-orientador:** Prof(a). Dr(a). Joao Carlos Monteiro de Carvalho - 11/03/2015 até o presente. Email: jcmdcarv@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 10/07/2014  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 19/08/2015  
**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 10/07/2014

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 13/07/2016

Impresso em: 17/11/2016 18:32:28

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9139 - 8713883/1 - Maira Bueno Ariede

| Sigla        | Nome da Disciplina  | Início     | Término    | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação                 |
|--------------|---|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|--------------------------|
| FBF5702-6/1  | Formulação de Produtos Cosméticos e Cosmecêuticos   | 04/08/2014 | 07/09/2014 | 75            | 5     | 100   | A     | N    | Concluída                |
| FBF5777-3/3  | Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I  | 14/08/2014 | 26/11/2014 | 45            | 3     | 93    | A     | N    | Concluída                |
| FBA5728-3/10 | Aprimoramento Didático  | 19/08/2014 | 15/09/2014 | 60            | 0     | -     | -     | N    | Pré-matricula indeferida |
| FBF5805-1/3  | Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas | 24/09/2014 | 28/10/2014 | 45            | 3     | 80    | A     | N    | Concluída                |
| 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 |
| NEC5719-3/1  | Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)                 | 11/03/2015 | 29/04/2015 | 30            | 0     | -     | -     | N    | Matrícula cancelada      |
| EDM5804-7/2  | Tópicos de Epistemologia e Didática (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)     | 13/03/2015 | 04/06/2015 | 120           | 8     | 95    | A     | N    | Concluída                |
| FBA5728-3/11 | Aprimoramento Didático  | 14/04/2015 | 11/05/2015 | 60            | 0     | -     | -     | N    | Matrícula cancelada      |
| FBF5779-2/3  | Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia  | 04/09/2015 | 05/11/2015 | 90            | 0     | -     | -     | N    | Matrícula cancelada      |

|                     | Créditos mínimos exigidos  |                              | Créditos obtidos |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|------------------|
|                     | Para exame de qualificação | Para depósito da dissertação |                  |
| <b>Disciplinas:</b> | 0                          | 25                           | 25               |
| <b>Estágios:</b>    |                            |                              |                  |
| <b>Total:</b>       | 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 13/07/2016

Impresso em: 17/11/2016 18:32:28

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9139 - 8713883/1 - Maira Bueno Ariede

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 17/11/2016 18:32:28