



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PPG CiPharma  
Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas

JÉSSICA SILVA SAMPAIO

**Análise do potencial fotoprotetor dos extratos de *Humulus lupulus* e formulação de protetor solar de amplo espectro**

OURO PRETO  
2022

JÉSSICA SILVA SAMPAIO

**Análise do potencial fotoprotetor dos extratos de *Humulus lupulus* e formulação de protetor solar de amplo espectro**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

OURO PRETO

2022

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S192a Sampaio, Jessica Silva.

Análise do potencial fotoprotetor dos extratos de *Humulus lupulus* e formulação de proteção solar de amplo espectro. [manuscrito] / Jessica Silva Sampaio. - 2022.

91 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Protetores Solares. 2. Fator de Proteção Solar. 3. *Humulus lupulus*.  
I. Santos, Orlando David Henrique dos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 687.55

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Jéssica Silva Sampaio**

### **Análise do Potencial Fotoprotetor dos Extratos de *Humulus lupulus* e Formulação de Protetor Solar de Amplo Espectro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 26 de agosto de 2022

#### Membros da banca

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Profa. Dra. Raquel Silva Araújo - Universidade Federal de Ouro Preto  
Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart - Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 20/12/2022



Documento assinado eletronicamente por **Orlando David Henrique dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/12/2022, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0448509** e o código CRC **A1EF3202**.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me guiar nesta caminhada e me conduzir à conquista dos meus sonhos.

Aos meus pais, José Luiz e Elza, por sempre me apoiarem e estarem presentes. Por todo o carinho, amor e por acreditarem tanto em meu potencial.

Aos meus irmãos, Larissa e Luiz Henrique, por todo o carinho e apoio. A Larissa por compartilhar esta jornada comigo, fomos o ponto de apoio uma da outra por tantos anos, com força e perseverança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, pelos ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pelas sugestões e ensinamentos que tanto agregaram ao trabalho.

À Prof. Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos pelo apoio na realização dos experimentos. Ao Laboratório de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica, em especial, ao Lucas Resende Dutra Sousa pela ajuda durante as análises.

Ao Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão por disponibilizar o uso do laboratório de Química Medicinal.

Aos amigos do laboratório de Fitotecnologia, pela convivência, apoio, ajuda e por terem compartilhado esta jornada comigo.

## RESUMO

Os raios solares são responsáveis por causar danos às estruturas celulares da pele humana, podendo levar à formação de rugas, descamação, manchas, pele seca e câncer de pele, se tornando uma fonte de grande preocupação para a população, sendo imprescindível o uso de filtros solares. Os filtros solares sintéticos são amplamente utilizados, mas existem estudos sugerindo que estes produtos podem estar associados a alergias de contato e danos ambientais, desta forma, o uso de filtros solares naturais seria mais vantajosos. As plantas biossintetizam metabólitos como uma forma de proteção às agressões externas e alguns destes compostos são reconhecidamente eficazes na absorção de radiação UV. O lúpulo (*Humulus lupulus*) apresenta compostos bioativos capazes de exercer esta função. Assim sendo, o objetivo deste trabalho é identificar a eficácia fotoprotetora do extrato bruto e frações de *H. lupulus* e desenvolver uma formulação para incorporá-los. A caracterização fitoquímica foi realizada por meio de testes quantitativos de identificação de compostos bioativos, com a finalidade de detectar compostos que possuam grupos cromóforos que absorvam radiação na faixa UV, como compostos fenólicos e flavonoides. Foi realizado um delineamento experimental para desenvolvimento de hidrogel a base de poloxamer para incorporação dos extratos. A citotoxicidade dos extratos e formulações foi avaliada em fibroblastos murinos. Análises do Fator de Proteção Solar e da razão UVA/UVB das formulações foram realizadas por método *in vitro*, utilizando espectrofotômetro UV-Visível. Foi avaliado o potencial antioxidante do extrato bruto e frações e formulações, a partir das metodologias de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS. Dentre os extratos testados, a fração butanólica foi a que apresentou o maior teor de compostos fenólicos e flavonoides totais (83,64 EAG/g e 7,21 ER/g, respectivamente). Foram desenvolvidas formulações utilizando o extrato etanólico bruto e fração butanólica, resultando em produtos com FPS 4,68 e 9,38, respectivamente. As formulações apresentaram melhor atividade antioxidante quando comparadas com os respectivos extratos e foi capaz de alterar sua atividade citotóxica. Este trabalho demonstrou a capacidade de produção de formulação fotoprotetora de amplo espectro e com atividade antioxidante a partir de folhas de *H. lupulus*.

**Palavras-chave:** Proteção solar, fotoprotetor natural, *Humulus lupulus*

## **ABSTRACT**

The solar radiation is responsible for causing damage to the cellular structures of the human skin, which can lead to the formation of wrinkles, peeling, spots, dry skin and skin cancer, becoming a source of great concern for the population, and the use of sunscreens is essential. Synthetic sunscreens are widely used, but there are studies suggesting that these products may be associated with contact allergies and environmental damage, so natural sunscreens can be more beneficial. Plants biosynthesize metabolites as a form of protection from external aggressions and some of these compounds are known to be effective in absorbing UV radiation. Hops (*Humulus lupulus*) have bioactive compounds capable of performing this function. Therefore, the objective of this work is to identify the photoprotective efficacy of the crude extract and fractions of *H. lupulus* and to develop a formulation to incorporate them. The phytochemical characterization was carried out through quantitative tests to identify bioactive compounds, with the aim of detecting compounds that have chromophore groups that absorb radiation in the UVR range, such as phenolic compounds and flavonoids. An experimental design was carried out to develop a poloxamer-based hydrogel for incorporation of extracts. The cytotoxicity of extracts and formulations was evaluated in murine fibroblasts. Analyzes of the Sun Protection Factor and the UVA/UVB ratio of the formulations were carried out by in vitro method, using a UV-Visible spectrophotometer. The antioxidant potential of the crude extract, fractions and formulations was evaluated using the free radical scavenging methodologies DPPH and ABTS. Among the tested extracts, the butanolic fraction was the one with the highest content of phenolic compounds and total flavonoids (83.64 GAE/g and 7.21 RE/g, respectively). Formulations were developed using the crude ethanolic extract and butanolic fraction, resulting in products with SPF 4.68 and 9.38, respectively. The formulations showed better antioxidant activity when compared to the respective extracts and was able to change their cytotoxic activity. This work demonstrated the ability to produce a broad-spectrum photoprotective formulation with antioxidant activity from leaves of *H. lupulus*.

**Keywords:** Sun protection, natural sunscreen, *Humulus lupulus*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual de proteção UVB oferecido por diferentes FPS

Tabela 2: Classificação dos fototipos cutâneos segundo Fitzpatrick

Tabela 3: Desenho experimental fatorial  $2^3$  para as formulações de hidrogel

Tabela 4: Composição das formulações de hidrogel

Tabela 5: Correlação entre o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) para cada comprimento de onda

Tabela 6: Sistema de classificação da proteção UVA conforme razão UVA/UVB pelo sistema Boot's Star Racing

Tabela 7: Caracterização da folha de *H. lupulus* pulverizada

Tabela 8: Percentual de amostra vegetal retida no tamis em diferentes malhas durante análise granulométrica

Tabela 9: Teor de compostos fenólicos presentes no extrato bruto e frações

Tabela 10: Teor de flavonoides totais presentes no extrato bruto e frações

Tabela 11: Valores de FPS calculados para extrato bruto e frações a partir das absorvâncias obtidas na concentração de 0,2 mg/mL.

Tabela 12: Caracterização das formulações no tempo de 24 horas

Tabela 13: Caracterização das formulações no tempo de 7 dias

Tabela 14: Avaliação do impacto do carbopol no tamanho de partícula da formulação

Tabela 15: Valores de tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as formulações de EEB e BUT nos tempos de 24 horas e 7 dias.

Tabela 16: Valores de FPS obtidos através de espectrofotometria para as formulações de extrato etanólico bruto e fração butanólica, branco e solução padrão.

Tabela 17: Razão da proteção UVA/UVB para as formulações testadas

Tabela 18: Valores de IC50 obtidos para extrato bruto, frações e formulações encontrados pelos métodos de eliminação dos radicais DPPH e ABTS.

Tabela 19: Diferença significativa a um nível de 5% avaliada para as amostras analisadas em relação ao padrão rotina e em relação umas às outras.

Tabela 20: Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante (ABTS e DPPS) e os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais encontrados nas amostras.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do mecanismo de ação dos filtros orgânicos e inorgânicos

Figura 2: Estrutura geral e padrão de numeração para flavonoides

Figura 3: Esquema do fracionamento do extrato etanólico bruto

Figura 4: Distribuição granulométrica do pó da folha de *H. lupulus*

Figura 5: Avaliação da absorção na região do UV do extrato bruto e frações nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL

Figura 6: Gráficos representando a curva de viabilidade celular conforme a concentração em mg/mL para o extrato bruto e formulação, fração butanólica e formulação e formulação branco.

Figura 7: Tamanho de partícula das formulações obtidas pelo desenho experimental no tempo de 24 horas

Figura 8: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de DMSO e Poloxamer no tamanho de partícula das formulações.

Figura 9: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de Carbopol e Poloxamer no tamanho de partícula das formulações.

Figura 10: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de DMSO e Poloxamer no Índice de Polidispersão das formulações.

Figura 11: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de Carbopol e Poloxamer no Índice de Polidispersão das formulações.

Figura 12: Gráfico de otimização do Delineamento experimental

Figura 13: Comparativo entre os tamanhos de partícula da formulação de EEB sem carbopol, os brancos da formulação contendo 0,05% e 0,15% de carbopol e soluções aquosas contendo 0,05% e 0,15% de carbopol, evidenciando o impacto da concentração de carbopol no tamanho de partícula da formulação.

Figura 14: As imagens 1 e 3 retratam as formulações de extrato bruto e fração butanólica, respectivamente, antes da centrifugação, logo após serem retiradas da geladeira. As imagens 2 e 4 retratam as formulações de extrato bruto e fração butanólica, respectivamente, após a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos.

Figura 15: Absorbâncias das formulações de extrato etanólico bruto e fração butanólica e padrão na concentração de 2,0 mg/mL no intervalo de comprimento de onda de 260 a 400 nm.

Figura 16: Gráfico de barras representando os valores de CI50 obtidos para o extrato bruto, frações e formulações derivadas do *H. lupulus*.

Figura 17: Gráficos representando o comportamento reológico da formulação de extrato etanólico bruto com o aumento gradual da temperatura, a temperatura representada no título do gráfico equivale à média das temperaturas atingidas durante cada ensaio.

Figura 18: Gráficos representando o comportamento reológico da formulação da fração butanólica com o aumento gradual da temperatura, a temperatura representada no título do gráfico equivale à média das temperaturas atingidas durante o ensaio.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

nm - nanômetro  
UV – ultravioleta  
IV - infravermelho  
VIS – visível  
UVA – fração A da radiação ultravioleta  
UVA1 – fração A1 da radiação ultravioleta  
UVA2 – fração A2 da radiação ultravioleta  
UVB – fração B da radiação ultravioleta  
UVC – fração C da radiação ultravioleta  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
% - porcentagem  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
MEC – membrana extra celular  
ZnO – óxido de zinco  
TiO<sub>2</sub> – dióxido de titânio  
TCR – reparo acoplado à transcrição  
GGR – reparo de genoma  
FPS – fator de proteção solar  
 $\pi$  – pi  
p53 – gene supressor tumoral nomeado p53  
mg/cm<sup>2</sup> – miligrama por centímetro quadrado  
DEM – dose eritematosa mínima  
25 (OH) D – 25 hidroxivitamina D  
1,25 (OH) 2D - 1,25-di-hidroxivitamina D  
PABA – ácido paraaminobenzoico  
J/cm<sup>3</sup> – Joule por centímetro cúbico  
UVR – radiação ultravioleta  
Da – Dalton  
g - gramas  
°C – graus Celsius  
min - minutos

h - horas

± - mais ou menos

mm - milímetro

°GL – graus Gay-Lussac

mL - mililitro

DPPH - 2,2-difenil-1-piril-hidrazil

Abs - absorbância

mg - miligrama

p/v – peso-volume

v/v – volume-volume

PMMA – polimetilmetacrilato

EEB – extrato etanólico bruto

HM – fração hidrometanólica

AQUO – fração aquosa

BUT – fração butanólica

CLOR – fração clorofórmica

HEX – fração hexânica

Form EEB – Formulação do extrato etanólico bruto

Form BUT – Formulação butanólica

CI – Concentração inibitória

nm – nanometro

µg - micrograma

mV – milivolt

IPD – índice de polidispersão

DPPH – radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ABTS – radical 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1.	<b>Objetivo Geral:</b> .....	15
2.2.	<b>Objetivos Específicos:</b> .....	15
3.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1.	<b>Efeitos da radiação solar e uso de fotoprotetores</b> .....	16
3.2.	<b>Câncer de pele</b> .....	19
3.3.	<b>Fator de Proteção Solar (FPS)</b> .....	21
3.4.	<b>Impactos dos protetores solares na saúde e meio-ambiente</b> .....	23
3.5.	<b>Fotoprotetores naturais</b> .....	24
3.6.	<b>Utilização de extratos vegetais</b> .....	25
3.7.	<b>Biossíntese vegetal de substâncias ativas</b> .....	26
3.7.1.	<b>Compostos fenólicos</b> .....	27
3.7.2.	<b>Flavonoides</b> .....	27
3.8.	<b><i>Humulus lupulus</i></b> .....	29
3.9.	<b>Bases para protetor solar</b> .....	30
4.	<b>METODOLOGIA:</b> .....	32
4.1.	<b>Material vegetal</b> .....	32
4.2.	<b>Caracterização do material vegetal</b> .....	32
4.2.1.	<b>Teor de umidade</b> .....	32
4.2.2.	<b>Determinação do resíduo por incineração (cinzas)</b> .....	32
4.2.3.	<b>Perda por dessecação em estufa</b> .....	32
4.2.4.	<b>Análise granulométrica</b> .....	33
4.3.	<b>Obtenção do extrato bruto</b> .....	33
4.4.	<b>Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto</b> .....	33
4.5.	<b>Caracterização fitoquímica dos extratos de <i>H. lupulus</i></b> .....	34
4.5.1.	<b>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</b> .....	34
4.5.2.	<b>Determinação do teor de flavonoides totais</b> .....	35
4.6.	<b>Avaliação da absorção dos extratos na região do UV</b> .....	35
4.6.1.	<b>Delineamento experimental fatorial para seleção da formulação</b> .....	35
4.7.	<b>Preparo das formulações</b> .....	36
4.8.	<b>Caracterização físico-química das formulações</b> .....	37
4.9.	<b>Otimização da formulação</b> .....	37

4.10.	Obtenção da formulação de interesse .....	37
4.11.	Teste de centrifugação da formulação .....	37
4.12.	Avaliação do Fator de Proteção Solar.....	38
4.13.	Avaliação da razão UVA/UVB.....	39
4.14.	Avaliação da citotoxicidade dos extratos e formulações .....	40
4.14.1.	Cultivo celular .....	40
4.14.2.	Citotoxicidade em células L929 .....	40
4.15.	Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e formulação.....	41
4.15.1.	Determinação da atividade sequestrante do radical DPPH.....	41
4.15.2.	Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS .....	42
4.16.	Avaliação do comportamento reológico das formulações .....	42
4.17.	Análise estatística .....	43
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1.	Extrato bruto e frações.....	44
5.2.	Caracterização do material vegetal.....	44
5.3.	Compostos Fenólicos Totais.....	46
5.4.	Flavonoides Totais .....	48
5.5.	Avaliação da absorção na região do UV .....	49
5.6.	Obtenção das formulações do delineamento experimental .....	52
5.7.	Caracterização físico-química das formulações.....	52
5.8.	Obtenção da formulação de interesse .....	59
5.9.	Teste de centrifugação .....	61
5.10.	Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS).....	61
5.11.	Razão UVA/UVB.....	64
5.12.	Avaliação da citotoxicidade do extrato e formulações .....	64
5.13.	Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e formulações .....	67
5.14.	Correlação entre atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e flavonoides totais .....	72
5.15.	Avaliação da temperatura de gelificação .....	73
6.	Conclusão .....	76
	REFERÊNCIAS .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

A radiação solar que atinge o planeta terra compreende os comprimentos de onda de 290 nm a 2500 nm, e é responsável por causar danos às estruturas celulares da pele humana, podendo levar à formação de rugas, descamação, manchas, pele seca e câncer de pele, se tornando uma fonte de grande preocupação para a população (DIFFEY; CADARS, 2016; MCDANIEL; FARRIS; VALACCHI, 2018).

A luz solar compreende todo o espectro eletromagnético, porém, a faixa de radiação predominante é composta pelos raios ultravioleta (UV), luz visível (Vis) e radiação infravermelha (IV). A radiação UV é composta por UVA, dividido em UVA1 (320 – 340 nm), de comprimento de onda longo, e UVA2 (340 – 400 nm), de comprimento de onda curto, que representam 95% da radiação ultravioleta que atinge a terra; UVB (290 – 320 nm), que representa os restante da radiação que atinge a terra, cerca de 4 – 5 %; e UVC (100 - 290 nm), que é barrada pela camada de ozônio, portanto, não é uma preocupação em termos de dano celular (MCDANIEL; FARRIS; VALACCHI, 2018). Toda a luz ultravioleta que alcança a terra, equivale a cerca de 6,8% da radiação solar, e a luz visível e radiação infravermelho, equivalem juntas, a cerca de 93,2% (NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2013; HUDSON *et al.*, 2020).

Foi estabelecido que aproximadamente 50% dos danos causado pela radiação UV ocorrem devido à formação de radicais livres (MCDANIEL; FARRIS; VALACCHI, 2018), podendo vir a danificar o DNA e material genético, oxidar lipídeos, causar inflamação, romper a comunicação celular, modificar a resposta dos genes em função do estresse e enfraquecer a resposta imune da pele (ARAUJO; SOUZA, 2008).

Dentre os impactos causados pela radiação solar está o processo de envelhecimento extrínseco da pele, relacionado aos efeitos cumulativos da radiação violeta e outros fatores, como poluição, alimentação ou o ato de fumar. É importante salientar que existe também o processo intrínseco de envelhecimento, que é geneticamente determinado, e ocorre como uma resposta às mudanças fisiológicas ao longo do tempo. Durante o processo natural de envelhecimento, a quantidade de colágeno na derme reduz aproximadamente 1% por ano durante a vida adulta, sendo esta redução responsável pela formação de rugas na pele. (NAIDOO; BIRCH-MACHIN, 2017; SEO; CHUNG, 2006).

Grande parte da superfície demográfica do Brasil está situada entre o trópico de capricórnio e a linha do equador, sendo uma região que recebe uma grande intensidade de radiações solares. Desta forma, se torna imprescindível o uso de filtros solares com o intuito

de evitar o câncer de pele, e até mesmo o envelhecimento precoce da pele (CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2011).

O câncer de pele vem sendo considerado como uma epidemia nas últimas décadas. Cânceres de pele são classificados em melanoma e não melanoma, sendo o último, o tipo de tumor maligno mais diagnosticado na população de pele branca. O melanoma, apesar de apresentar menor incidência que os tumores não melanoma, é responsável por mais de 90% de todas as mortes causadas por câncer de pele (ACEITUNO-MADERA *et al.*, 2010).

A indústria alega que os filtros solares sintéticos são seguros, sendo eles amplamente utilizados. Porém, estudos vem mostrando serem a causa de determinados casos de dermatites de contato ou urticária, além do fato de serem formulados de forma que o produto permaneça sobre a pele por um longo período, possibilitando que estes materiais sejam levados para os rios e oceanos no momento do enxágue e possam vir a prejudicar espécies aquáticas. (DINARDO; DOWNS, 2017).

Preocupado com os potenciais efeitos ambientais, o Havaí banuiu recentemente dois ativos muito utilizados na fotoproteção, a oxibenzona e o octinoxato, que, por serem lipofílicos são capazes de se acumular em animais aquáticos. Suspeita-se que estes filtros causem danos aos recifes de corais e, conseqüentemente, afetem a biodiversidade marinha (RAFFA *et al.*, 2019).

Os protetores solares naturais, bem como os produtos cosméticos naturais em geral, são considerados mais vantajosos por proporcionarem menos efeitos adversos e serem menos agressivos ao meio ambiente. Alguns metabólitos secundários encontrados em plantas são capazes de absorver a radiação UV e podem ser usados com esta finalidade em produtos cosméticos, ou como adjuvantes, reforçando a ação dos filtros sintéticos. O lúpulo (*H. lupulus*), planta amplamente conhecida devido a sua aplicação na indústria cervejeira, apresenta compostos bioativos como terpenos, alcaloides e compostos fenólicos, biossintetizados como uma forma de proteção e eficazes na absorção de radiação UV (POLONINI; BRANDÃO; RAPOSO, 2014; NUNES *et al.*, 2018; ALONSO-ESTEBAN *et al.*, 2019).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Avaliar a eficácia fotoprotetora dos extratos de *Humulus lupulus* e incorporá-lo em uma formulação para protetor solar.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- Caracterização fitoquímica dos extratos de *Humulus lupulus*
- Avaliação do potencial fotoprotetor dos extratos de *Humulus lupulus*
- Desenvolvimento de formulação para incorporação dos extratos
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos e formulações
- Avaliação do Fator de Proteção Solar da formulação
- Avaliação da atividade antioxidante do extrato e formulação
- Avaliação das características físico-químicas da formulação

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Efeitos da radiação solar e uso de fotoprotetores

A radiação UV é o principal foco dos produtos fotoprotetores, uma vez que é a fração mais energética do espectro solar que atinge a terra, podendo apresentar maiores riscos ao corpo humano ao penetrar mais profundamente na pele e atingir a camada basal, responsável pela reprodução de células epidérmicas. Tais riscos advêm do dano oxidativo gerado à lipídeos, proteínas e ao DNA da pele, originando espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres prejudiciais, como o óxido nítrico, que ativam múltiplas enzimas relacionadas a doenças cutâneas, resultando, conseqüentemente, em danos ao tecido conjuntivo dérmico e envelhecimento prematuro da pele. E, ainda que as células cutâneas possuam antioxidantes, enzimas de reparo do DNA e sinalização de estresse para minimizar estes danos, a exposição excessiva aos raios UV pode levar à mutações e instabilidade genética (SAMBANDAN; RATNER, 2011; POLONINI; BRANDÃO; RAPOSO, 2014; BAKER *et al.*, 2017; BOSE *et al.*, 2017; BERNSTEIN *et al.*, 2020).

Dependendo da lesão primária ao DNA, uma ou mais vias de reparo se tornam ativas, como reparo direto, reparo de excisão de base, reparo de incompatibilidade, reparo de ruptura de cadeia dupla e reparo de excisão de nucleotídeo. Os danos nos genes ativamente transcritos são removidos por reparo acoplado à transcrição (TCR) e os danos prevalentes no genoma são removidos por reparo de genoma (GGR). Se o dano gerado for muito grave e não puder ser reparado, as vias apoptóticas são ativadas para eliminar as células defeituosas. Porém, as exposições excessivas e rotineiras ao sol podem resultar em um dano cumulativo ao DNA, devido às lesões agudas e recorrentes ao mesmo e dos efeitos da inflamação crônica, ocasionando degradação gradual da estrutura e função cutâneas (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

Ultimamente, a influência da luz visível, principalmente da luz azul, no processo de fotoenvelhecimento vem sendo amplamente estudada, e tem sido demonstrado que até metade da produção de radicais livres pode ser ocasionada por esta faixa do espectro solar. Em estudo realizado por Mahmoud *et al.* (2010), foram usadas fontes de luz visível emitindo 98,3% de luz visível, 0,19% de UVA e 1,5% de IV, e fonte de luz UVA1 emitindo 99,7% de UVA1, 0,12% de UVA2, 0,17% de luz visível e menos de 0,00001% de UVB, onde voluntários saudáveis foram irradiados em locais distintos e foi observado que ambas as radiações eram capazes de induzir a pigmentação em fototipos cutâneos de IV a VI, porém, a luz visível foi

capaz de estimular uma pigmentação mais escura e mais duradoura que a radiação UVA1 ( MAHMOUD *et al.*, 2010; BERNSTEIN *et al.*, 2020).

Sabe-se que a exposição crônica à radiação infravermelha também pode ser prejudicial à pele. Foi observado que trabalhadores frequentemente expostos a fontes intensas de calor, como fornalhas, podem vir a apresentar envelhecimento severo nas áreas expostas e risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias cutâneas, como carcinoma de células escamosas e de células de Merkel. Porém, alguns estudos relatam que um aumento relativamente pequeno na temperatura já é capaz de aumentar a degradação de colágeno e gerar EROs (BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016).

Os riscos da exposição inadequada ao sol são comumente ignorados pela população. No entanto, a sociedade deve estar alerta quanto aos benefícios da exposição moderada ao sol, mas também aos malefícios da exposição excessiva. Um dos riscos mais preocupantes relacionados à radiação solar é o desenvolvimento de melanoma, um tipo de câncer de pele, cujo mecanismo é desconhecido. Estudos indicam uma forte relação com fatores genéticos, contudo, o principal fator de risco não genético já identificado foi a exposição à radiação UV, estando a queimadura solar associada com o aumento deste risco em duas vezes. Nos cânceres de pele não melanoma, carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas, as queimaduras solares também são associadas a um aumento no risco. Já a relação entre a frequência de exposição ao sol e o risco difere entre eles, a exposição cumulativa faz com que o risco de desenvolvimento de melanoma diminua, e, aparentemente, aumenta o risco de desenvolvimento câncer de pele não melanoma (HOEL *et al.*, 2016).

Portanto, algumas estratégias precisam ser adotadas a fim de minimizar os efeitos adversos, agudos e crônicos, da exposição à radiação UV proveniente da luz solar. Estas estratégias incluem: evitar a exposição ao sol e procurar andar pela sombra sempre que possível, uso de roupas e chapéus cobrindo as superfícies expostas e o uso de protetores solares, que apresentam a capacidade de evitar eritemas provenientes da exposição solar mesmo com alta incidência de raios UV (PASSERON *et al.*, 2019).

Os protetores solares começaram a ser aplicados nos anos de 1930 e, desde então, foram desenvolvidos vários fotoprotetores, sempre procurando melhorar a proteção à radiação UV. Tal fato ocasionou uma grande heterogeneidade de produtos no mercado, levando a Comissão Europeia, em 2010, a classificar os filtros solares de acordo com seu Fator de Proteção Solar (FPS), sendo categorizados em filtros de “proteção baixa” (FPS 6, 10), “proteção média” (FPS 15, 20, 25), “proteção alta” (FPS 30, 50) e “proteção muito alta” (FPS 50+) (SINGER; KARRER; BERNEBURG, 2019).

Entretanto, a classificação em FPS refere-se somente à proteção na faixa de radiação UVB, não englobando a faixa UVA. Para que o produto seja considerado um protetor solar, deve apresentar FPS no mínimo 6 e, caso possua apelo de proteção UVA, esta deve ser equivalente à um terço do FPS reivindicado para atender aos requisitos. No entanto, apesar de estudos indicarem a influência da luz visível e infravermelha nos danos cutâneos, a maioria dos produtos não fornece tal proteção (SINGER; KARRER; BERNEBURG, 2019; BERNSTEIN *et al.*, 2020).

Os filtros solares são comumente classificados em orgânicos e inorgânicos. Os filtros orgânicos são moléculas que absorvem a radiação ultravioleta incidente, atuando como um cromóforo exógeno. Desta maneira, a molécula evolui para o estado excitado, e ao retornar para o estado de repouso libera a energia na forma de luz visível ou radiação infravermelha, e o processo se repete a partir do mecanismo de ressonância. Os filtros inorgânicos, ou físicos, são compostos por partículas de óxidos metálicos, principalmente óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), que são capazes de refletir ou dispersar a radiação incidente, e são caracterizados por sua baixa permeabilidade cutânea e elevada fotoestabilidade (SCHALKA; DOS REIS, 2011).

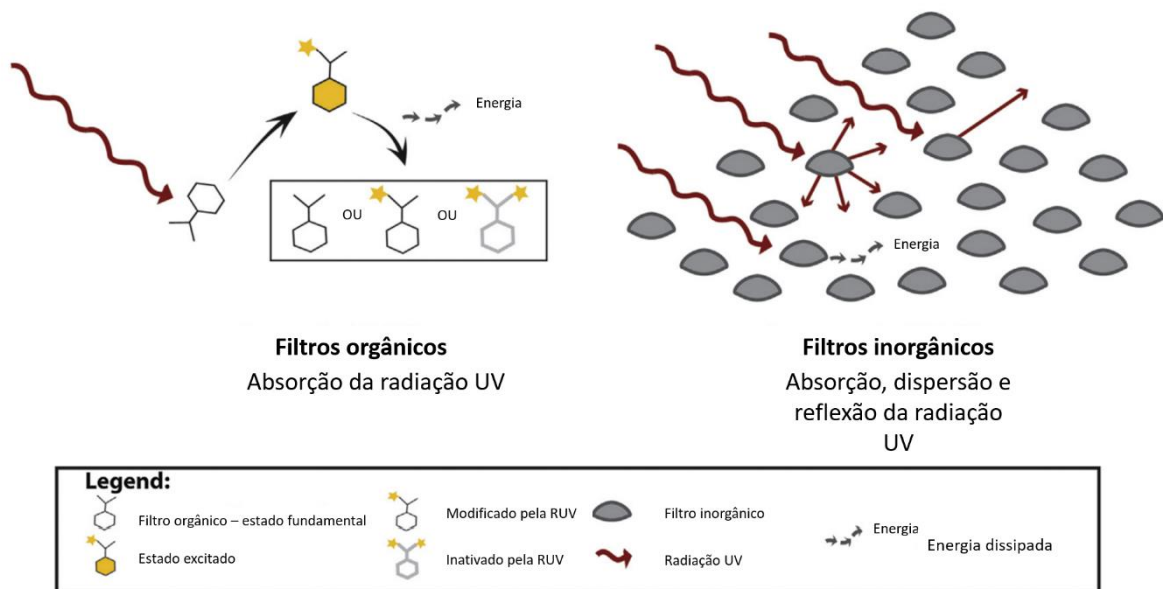


Figura 1: Representação do mecanismo de ação dos filtros orgânicos e inorgânicos (MANCERO; HU; WANG, 2014, com adaptações).

O uso exclusivo de filtros solares inorgânicos, como óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), não permite valores de FPS acima de 30, para alcançar um nível de proteção “alto” ou “muito alto” é necessária a associação com filtros orgânicos. Além do mais, combinações apropriadas de filtros orgânicos e inorgânicos podem oferecer uma proteção de

amplo espectro. Os filtros orgânicos são compostos aromáticos com sistemas de elétrons  $\pi$  conjugados em seus anéis aromáticos que permitem a absorção de fótons dos raios UVA e UVB. Já os filtros inorgânicos empregados em protetores solares são partículas opacas insolúveis que agem principalmente absorvendo a radiação UV e, em menor proporção, atuam na reflexão e dispersão dos raios UV e luz visível, porém, originam um efeito esbranquiçado indesejável na pele (COUTEAU *et al.*, 2012; COLE; SHYR; OU-YANG, 2015; BAKER *et al.*, 2017; MANCUSO *et al.*, 2017).

Uma alternativa encontrada para reduzir o efeito esbranquiçado antiestético dos fotoprotetores inorgânicos foi a micronização e nanonização de partículas de dióxido de titânio e óxido de zinco, já que reduz a reflexão da luz visível. Todavia, apesar da absorção de raios UV abaixo de 370 nm continuar constante, principalmente para as partículas de dióxido de titânio, esta medida resultou em menor proteção contra UVA e pouca, ou nenhuma, proteção contra a luz visível. A distribuição espectral de absorbância do óxido de zinco não é afetada pela micronização, apresentando uma curva de absorbância em todo o espectro de radiação UV, em todos os tamanhos de partícula. As partículas micronizadas, no entanto, tendem a agregar, levando à diminuição da eficácia e para evitar que isto aconteça, são revestidas com dimeticona ou sílica, aumentando também sua fotoestabilidade. Devido à maior fotoestabilidade, os agentes inorgânicos são os mais indicados para crianças e indivíduos alérgicos à filtros solares (SAMBANDAN; RATNER, 2011; MANCUSO *et al.*, 2017).

Sob a perspectiva de promoção da saúde e prevenção do câncer de pele, a forte dependência do filtro solar é problemática, e estratégias alternativas como o uso de roupas cobrindo a pele e busca por sombras se mostram bastante eficientes em classificações hierárquicas de proteção solar. A estratégia ideal para a proteção seria o uso de filtro solar como um complemento para as demais estratégias, já que, mesmo tendo eficácia comprovada, esta depende da aplicação correta por parte do consumidor (KOCH *et al.*, 2017).

### **3.2. Câncer de pele**

A radiação UV é considerada um carcinógeno ambiental e está estreitamente relacionada ao desenvolvimento de câncer de pele em humanos, juntamente com outros fatores de risco já estabelecidos, como o fototipo cutâneo e histórico familiar de câncer de pele. É considerado o câncer mais comum em populações caucasianas de todo o mundo, com incidência aproximada de 1/3 do total de novos casos. Têm sido observada uma incidência crescente ao longo das últimas décadas, principalmente na Austrália e Nova Zelândia, que

pode ser explicada pelo aumento na intensidade de radiação UV recebida na Terra, devido à diminuição da camada de ozônio e ao aquecimento global (BODE; ROH, 2020; MAHAMAT-SALEH; AUNE; SCHLESINGER, 2020).

O câncer de pele pode ser classificado em melanoma ou carcinoma (não-melanoma), que pode ser subdividido em carcinoma basocelular e carcinoma escamoso. A partir de evidências acumuladas de epidemiologia e estudos genômicos foi possível relacionar a influência da radiação UV em cada câncer, desta forma, estima-se que entre 65% e 90% dos casos de melanoma e aproximadamente 100% dos casos de carcinoma apresentem relação com a radiação UV. Melanoma é a forma mais letal de câncer de pele e, apesar das duas formas de carcinoma apresentarem uma menor taxa de mortalidade, representam uma grande porcentagem dos novos casos, impactando diretamente na qualidade de vida das pessoas acometidas e nos custos em saúde pública (WHITEMAN *et al.*, 2019; MAHAMAT-SALEH; AUNE; SCHLESINGER, 2020).

Em 2003, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que ocorrem cerca de 2 a 3 milhões de casos de câncer de pele não-melanoma (sendo cerca de 80% dos casos de carcinoma basocelular e 16% dos casos de carcinoma de células escamosas) e 132 mil casos de melanoma ocorrem anualmente em todo o mundo. Já em 2012, o número de casos de melanoma mundialmente foi maior que 200 mil e o número de mortes estimado chegou a 55 mil. Acredita-se que as razões para tal aumento estejam relacionadas a um maior tempo de exposição recreacional ao sol, maior uso de câmaras de bronzeamento e detecção precoce dos casos de câncer, juntamente com o envelhecimento da população. Sendo a maior taxa de diagnóstico de câncer de pele em mulheres do que em homens, porém com os diagnósticos em homens crescendo cada vez mais (CHUCHU *et al.*, 2018).

Atualmente, a incidência de câncer de pele vem aumentando mundialmente. Porém, mesmo com esse aumento, a taxa de mortalidade continua diminuindo. Na maior parte das vezes, as mortes acontecem em pacientes imunossuprimidos, com comorbidades graves, idosos ou que não receberam o tratamento (CAINI *et al.*, 2021).

O mecanismo de ação da radiação UV nas células da epiderme envolve inflamação, estresse oxidativo, dano ao DNA e seu sistema de reparo, especialmente na formação dos dímeros de pirimidina e também causa mutações nos genes supressores de tumor p53, agindo na iniciação, promoção e progressão dos tumores (SANCHEZ *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2019).

Tendo claro o impacto que a exposição solar excessiva e frequente representa à saúde, torna-se imprescindível a proteção contra esta radiação. As defesas naturais do corpo humano

contra os efeitos imunossupressores e mutagênicos da radiação, como espessamento da camada córnea da pele e mecanismos antioxidante e de reparo ao DNA, não são suficientes para promover uma proteção segura, desta forma são necessárias outras formas de proteção. O uso de protetores solares é visto como a opção mais eficaz para promover esta proteção, pois são cosméticos capazes de absorver, dispersar ou refletir a radiação incidente (D’AVILA, 2020).

Como uma forma de garantir a eficácia destes produtos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que o valor mínimo do fator de proteção solar (FPS) seja de 6, apesar de a agência norteamericana “*Food and Drug Administration*” (FDA) exigir que este fator mínimo seja igual a 2. Porém, mesmo que seja possível o registro de produtos com valores de FPS mais baixos, o mínimo recomendado para uma proteção eficaz é o uso regular de fotoprotetores de FPA 15 (CEFALI *et al.*, 2016).

### 3.3. Fator de Proteção Solar (FPS)

O FPS de um protetor solar indica em quantas vezes o tempo que uma pessoa pode se expor ao sol sem se queimar é aumentado, comparado à exposição sem proteção solar, quando aplicado na pele com uma espessura de 2 mg/cm<sup>2</sup>. No entanto, pesquisadores observaram que a espessura média aplicada na realidade varia de 0,5 a 0,8 mg/cm<sup>2</sup>, isso significa que um protetor solar de FPS 50 aplicado incorretamente apresentará, na verdade, FPS 3 a 5, aumentando o tempo de exposição ao sol de forma segura em apenas 3 a 5 vezes, e não em 50 vezes como idealizado (SARKANY, 2017). É importante salientar que o aumento do valor de FPS não indica um aumento linear na proteção UVB, mesmo que aplicado corretamente, como pode ser observado na tabela abaixo:

Tabela 1: Percentual de proteção UVB oferecido por diferentes FPS

<b>FPS</b>	<b>Proteção UVB aproximada (%)</b>
<b>2</b>	50
<b>4</b>	75
<b>8</b>	87
<b>15</b>	93
<b>30</b>	96

Fonte: NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR (2013)

O FPS dos protetores solares é usualmente medido por distintas metodologias, *in vitro* e *in vivo*. As análises *in vivo* vêm sendo cada vez mais substituídas por métodos *in vitro*, em

razão do menor custo e maior rapidez destes, enquanto são capazes de apresentar excelente correlação com os métodos *in vivo*. Entretanto, análises *in vitro* podem sofrer interferências relacionadas à espessura insuficiente do filme do produto ou de compostos oleosos e pigmentos que podem estar presentes (SANTOS CAETANO *et al.*, 2016).

O objetivo de metodologias *in vitro* é a substituição de testes invasivos em voluntários humanos, mas para que isto seja possível elas devem ser validadas e reproduzirem os resultados que seriam observados *in vivo*. Medidas dos espectros de transmitância ou absorbância da fórmula do protetor solar, usando fontes de irradiação de UV, e sua dinâmica de comportamento são capazes de simular o desempenho do produto na pele. Ainda, a fim de validar a análise *in vitro* da fotoestabilidade de filtros solares, deve-se avaliar os espectros de transmitância e absorbância antes e após várias doses de irradiação de UV, com doses apropriadas selecionadas em concordância com o FPS *in vivo*. Ademais, os espectros de transmitância ou absorbância estimados e o FPS podem ser determinados usando método *in silico*, ou seja, cálculos computacionais baseados em espectros de absorção de UV dos ingredientes disponíveis em bancos de dados, assim como as fotoinstabilidades podem ser determinadas usando constantes de fotodegradação, tornando possível simular a dinâmica dos espectros de absorbância de forma muito semelhante à abordagem *in vitro* (STANFIELD; OSTERWALDER; HERZOG, 2010).

Um dos testes *in vivo* mais frequentemente utilizados, é a determinação da dose eritematosa mínima (DEM), que é definida como a dose mínima de radiação UV capaz de induzir eritema perceptível na pele, e que é comumente avaliado 24 horas após a irradiação. Por ser uma avaliação visual, o resultado é subjetivo e pode ser afetado por diversos fatores, tais como a fonte de luz, a área irradiada, uma exposição prévia à radiação UV, a temperatura da pele, definição da DEM, entre outros. Alguns países estipularam a determinação da DEM levando em conta os fototipos cutâneos, devido às suas diferentes sensibilidades à formação de eritema a partir da exposição à radiação UV, porém, alguns pesquisadores argumentam que não existe uma boa correlação entre as duas variáveis (VALBUENA MESA; NOVA VILLANUEVA; SÁNCHEZ VANEGAS, 2020).

Os fototipos cutâneos de Fitzpatrick são apurados a partir de um questionário onde o indivíduo relatava sua tendência a se queimar e a capacidade de se bronzear, respectivamente, 24 horas e 7 dias após sua primeira exposição desprotegida ao sol no início do verão, em condições padronizadas, tais como tempo e local de exposição. Os tipos de pele são então classificados de I a VI. Existem quatro tipos possíveis para pessoas de pele branca (tipos I, II,



III e IV), pessoas morenas são classificadas como tipo V, e negras como tipo VI (RAVNBAK, 2010). De acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2: Classificação dos fototipos cutâneos segundo Fitzpatrick:

<b>Fototipo cutâneo</b>	<b>Reação à exposição solar</b>
<b>I</b>	Sempre se queima, nunca se bronzeia
<b>II</b>	Normalmente se queima, se bronzeia levemente
<b>III</b>	Se queima moderadamente se bronzeia uniforme e gradualmente
<b>IV</b>	Raramente se queima, se bronzeia facilmente
<b>V</b>	Pele morena
<b>VI</b>	Pele negra

Fonte: RAVNBAK (2010)

### **3.4. Impactos dos protetores solares na saúde e meio-ambiente**

A preocupação dos consumidores relativa aos impactos que podem ser causados pelos ingredientes presentes em produtos cosméticos, tanto à saúde quanto ao meio-ambiente, vem aumentando significativamente nos últimos anos. Filtros orgânicos podem ser ativados a partir da absorção de raios UV e, conseqüentemente, interagir com moléculas cutâneas, causando reações adversas na pele. Ademais, alguns pesquisadores observaram a presença destes ingredientes em águas superficiais ou estações de tratamento de água, que podem provir do uso de cosméticos em ambientes aquáticos recreativos ou ambientes domésticos. (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013; TASHIRO; KAMEDA, 2013; DINARDO; DOWNS, 2017).

Há uma forte apreensão quanto ao uso de oxibenzona como agente fotoprotetor. Alguns médicos expressam preocupação de que um aumento nos índices de pacientes com câncer de pele possa estar relacionado com o uso de oxibenzona como filtro de raios UV e alegam que os estudos de segurança à saúde e ao meio-ambiente oferecido pelas indústrias estão desatualizados por datarem de 20 a 40 anos atrás. Oxibenzona e PABA são filtros solares que apresentam altas taxas de reações alérgicas, sendo a oxibenzona considerada com o maior potencial alergênico. Somando-se a isto, foi observado que cerca de 4% de

oxibenzona é absorvido pela pele, isto significa que 96% do ativo contido no produto é enxaguado, podendo ocasionar riscos ecológicos para o ecossistema marinho, incluindo o branqueamento de corais e prejuízo à reprodução de peixes (DINARDO; DOWNS, 2017).

Mesmo que não existam evidências de que as nanopartículas de óxido de zinco sejam capazes de prevenir câncer em humanos, estas são frequentemente usadas em protetores solares, muitas vezes misturados com filtros orgânicos. No entanto, algumas das vantagens apontadas para o uso de filtros inorgânicos nanoparticulados é uma alta proteção contra raios UV sem prejuízo ao efeito estético, e uma redução da dependência de filtros orgânicos, que podem ser sistemicamente absorvidos. Apesar de, até então, estudos mostrarem que as nanopartículas de óxido de zinco não são absorvidas pela pele, ainda existe a preocupação de que possa induzir citotoxicidade, estresse oxidativo e danos ao DNA, como foi observado em estudos realizados em culturas celulares (MOHAMMED *et al.*, 2019).

### **3.5. Fotoprotetores naturais**

Desde a antiguidade, as plantas vêm sendo usadas como uma forma de proteção contra queimaduras solares, os extratos vegetais aplicados na pele são capazes de refletir, dispersar e absorver a radiação UV, além de atuarem como antioxidantes devido à ação dos metabólitos naturalmente presentes (DANGWAL; UNİYAL, 2020).

Atualmente, os protetores solares naturais vêm ganhando atenção significativa de pesquisadores e são caracterizados por possuírem um ou mais ativos de origem natural com capacidade fotoprotetora e propriedades antioxidantes. Os fitoconstituintes vegetais são vantajosos por exercerem múltiplas ações sobre a pele e proporcionarem amplo espectro de absorção de radiação UV, proteção contra estresse oxidativo, inflamação e câncer, além de possíveis efeitos rejuvenescedores e protetores contra a poluição. Além do mais, são vistos como uma solução para indivíduos alérgicos que apresentem restrições ao uso de filtros solares sintéticos (MISHRA; MISHRA; CHATTOPADHYAY, 2011; GOSWAMI; SAMANT; SRIVASTAVA, 2013).

Dentre estas substâncias naturais comumente estudadas, os polifenóis, flavonoides, terpenos, catequinas e alcaloides são algumas das classes que apresentam efeitos fotoquimiopreventivos e antioxidantes, podendo ser eficazes nas estratégias de redução dos danos oxidativos da pele mediados pela radiação UV. Compostos como a curcumina, resveratrol, ácido cafeico e quercetina são alguns exemplos de substâncias que compõem estes grupos (NAPAGODA *et al.*, 2016).

O uso de extratos vegetais nos filtros solares se torna vantajoso por, além do efeito de proteção contra os raios UV, também possuírem propriedades bioativas como a eliminação de radicais livres, hidratação da pele, restauração da função de barreira e promoção da síntese de colágeno. Os extratos também podem ter seu uso aliado ao uso de vitaminas, como as A, E e C, que possuem propriedades hidratantes, antioxidantes e antienvhecimento (MERCURIO *et al.*, 2015).

No entanto, existem alguns desafios relacionados à produção de filtros solares naturais. A maioria dos produtos naturais não é capaz de bloquear todo o espectro de raios UV e, em adição à isto, a extração de ingredientes ativos de matérias brutas é cara, tornando o processo de produção de protetores naturais caro e limitado (QIAN; QIU; ZHU, 2015).

### **3.6. Utilização de extratos vegetais**

Os fitocosméticos são preparações de variadas formas farmacêuticas, compostos por substâncias de origem natural destinadas a serem aplicadas em diversas partes superficiais do corpo humano. Porém existem inúmeras desvantagens para o uso direto de partes da planta, como a presença de partículas sólidas na formulação, necessidade de grandes quantidades de material para a obtenção de quantidades significativas de substâncias ativas, além de potenciais problemas microbiológicos, por estas razões, seu uso é substituído pelo uso de extratos purificados, por serem mais favoráveis e seguros (RUIVO, 2012).

A busca do mercado por produtos contendo matérias primas de origem natural vem crescendo a cada ano, e o Brasil, por apresentar uma grande biodiversidade, possui incontáveis plantas com potencial fotoprotetor que podem ter suas substâncias ativas extraídas e utilizadas para proteger a pele de fatores extrínsecos, absorvendo a radiação ultravioleta incidente ou eliminando os radicais livres e minimizando os danos celulares causados pela radiação. Podendo ser incorporadas em produtos cosméticos para maximizar seus resultados, além de auxiliar na prevenção do fotoenvelhecimento extrínseco (SOUSA; LIMA; LIMA, 2020).

Entretanto, nem sempre os efeitos produzidos pelos extratos vegetais no organismo serão vantajosos, alguns extratos naturais são capazes de irritar e sensibilizar a pele, comprometendo assim a saúde. Frente a uma lesão tecidual, o organismo gera uma resposta inflamatória como uma primeira forma de defesa, objetivando a remoção do estímulo lesivo e a recuperação tecidual local, por este motivo é imprescindível avaliar o potencial citotóxico

destas substâncias a fim de possibilitar o uso seguro de produtos de origem natural, viabilizando a obtenção de produtos eficazes e de baixa toxicidade (HIGA *et al.*, 2019).

### 3.7. Biossíntese vegetal de substâncias ativas

O metabolismo vegetal pode ser dividido em primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pela síntese de metabólitos envolvidos nos processos geradores de energia, essenciais para seu crescimento, divisão e propagação, tais como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, que compõem a unidade fundamental de toda matéria viva, além da síntese de intermediários para outras vias metabólicas. Já os metabólitos secundários, expressam individualidade entre famílias, gêneros ou espécies, gerando diversidade entre eles e permitindo adaptações à variadas circunstâncias, como por exemplo, atrair ou repelir polinizadores, proteger contra radiação UV, altas temperaturas, toxinas orgânicas e poluição, dissuadir herbívoros, entre outros (REZENDE *et al.*, 2016; KORKINA *et al.*, 2018).

A biossíntese da grande maioria dos metabólitos secundários é ativada a partir da exposição das plantas à radiação UV, visto que o excesso de UVR pode danificar estruturas fotossintéticas vitais e reduzir a eficácia da fotossíntese. Desta forma, as plantas empregam estes metabólitos como forma de defesa à superexposição à luz solar, devido às suas propriedades fotoprotetoras de amplo espectro. Esta proteção acontece graças à capacidade da estrutura química destes compostos, denominados cromóforos, ser capaz de absorver a radiação solar e a dissipar sob a forma de energia térmica ou luminosa fluorescente/fosforescente (propriedades do filtro solar), ou convertê-la em energia para reações químicas (propriedades fotossensibilizantes) (BAKER *et al.*, 2017; KORKINA *et al.*, 2018).

Os principais compostos com tais propriedades capazes de absorver a radiação UV são os polifenóis e, de fato, são muito similares aos filtros UV sintéticos. Acredita-se que a verdadeira função destes compostos para as plantas é a proteção aos danos fotooxidativos através de sua natureza antioxidante, e não a defesa contra herbívoros (POLONINI; BRANDÃO; RAPOSO, 2014).

Contudo, a quantidade, ou até mesmo a natureza, dos constituintes ativos em uma planta não são constantes durante todo o ano. Foram observadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, entre outros. Estudos têm mostrado que esta variação também pode se dar durante o ciclo dia/noite, variação no conteúdo de água, podendo resultar em uma maior concentração

do metabólito, idade e desenvolvimento da planta, sendo possível observar maior taxa biossintética de metabólitos em tecidos mais jovens (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

### 3.7.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes em vegetais, que podem ser subdivididos em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos), exercem, como principal função nas plantas, uma atividade protetora contra microrganismos e pragas e constituem os antioxidantes mais abundantes na maioria dos vegetais. São compostos de grande interesse por exercerem forte ação antioxidante, protegendo as células contra agressões de radicais livres e prevenindo o estresse oxidativo, indicado como causa de diversas doenças, incluindo o câncer (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ROCHA *et al.*, 2011; SOUZA; VIEIRA; PUTTI, 2018).

A estrutura básica dos compostos fenólicos contém pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila. Por existirem muitos compostos fenólicos diferentes encontrados em plantas, sua estrutura sofre grande variabilidade, podendo ser classificados como fenóis ou polifenóis, sendo mais comumente encontrados os fenóis simples, cumarinas, ligninas, lignanas, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H., 2013).

### 3.7.2. Flavonoides

Os flavonoides são compostos onipresentes em células vegetais verdes, este termo denota um coletivo para pigmentos vegetais, principalmente derivados de benzo- $\gamma$ -pirona. O grupo compreende estruturas como antocianidinas, hidroflavonois, flavonóis, isoflavonas, hidroxicromonas (catequinas), isoflavonois, cumarinas, entre outros, sendo qualitativa e quantitativamente, um dos maiores grupos de substâncias naturais conhecidos. A maioria dos flavonoides atua como pigmentos, englobando todo o espectro de cores, incluindo a região do UV, e possuem diversas funções nas plantas, desde a atração de polinizadores à ativação de genes de crescimento sensíveis à luz, por apresentarem propriedades eletrônicas de captura e transferências de elétrons, ademais da seletividade biológica (HAVSTEEN, 2002).

Flavonoides são uma subclasse de polifenóis, que são caracterizados por conter dois ou mais anéis aromáticos, cada um contendo pelo menos um hidroxil aromático e conectado a uma ponte de carbono, que consiste em três carbonos que combinam com um oxigênio e dois carbonos de um dos anéis aromáticos (anel A), para formar um terceiro anel de seis membros (anel C) (Figura 1). Os flavonoides são divididos em seis subclasses com base na conexão do

anel B ao anel C, bem como o estado de oxidação e grupos funcionais do anel C, sendo elas: flavonas, flavonóis, flavanonóis, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (SPENCER, 2003; SAEWAN; JIMTAISONG, 2013).

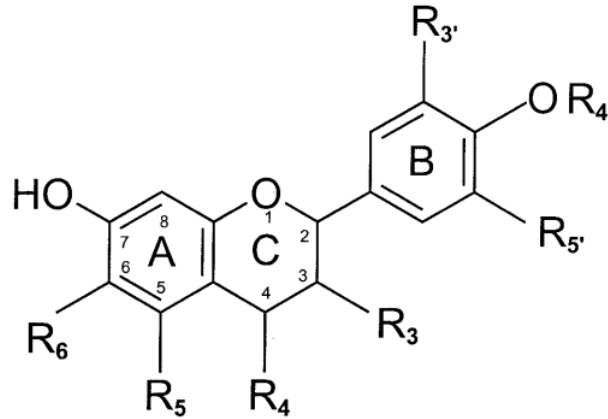


Figura 2: Estrutura geral e padrão de numeração para flavonoides

Fonte: SPENCER (2003)

Alguns estudos vêm mostrando que as plantas podem ter sua composição de pigmentos alterada pela radiação UV, exercendo um mecanismo de defesa e buscando atenuar os efeitos da radiação nos tecidos. Deste modo, provaram que a síntese de tais pigmentos nas plantas ocorre por consequência de um estresse exógeno ou da adaptação ecológica às mudanças ambientais, como o excesso da radiação UV (KLEIN *et al.*, 2018).

Os flavonoides prenilados são umas das substâncias bioativas que contribuem para as aplicações médicas da planta, sendo o xantohumol, o tipo mais comum presente no lúpulo, sendo comumente encontrado nos tricomas, na parte inferior das folhas jovens (LIU *et al.*, 2015).

SILVA (2020), realizou uma identificação dos flavonoides presentes nas folhas de *H. lupulus* por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o extrato bruto e a fração hidrometanólica e encontraram os flavonoides astragalina, nicotiflorina, robinina, hiperina, rutina e mangaslina (SILVA, 2020).

Estas substâncias apresentam propriedades antioxidantes e quelantes significativas, são encontradas em frutas, vegetais, grãos, sementes, nozes, especiarias e diferentes plantas medicinais. Seus efeitos protetores em sistemas biológicos são atribuídos à sua capacidade de transferir radicais livres de elétrons, catalisar quelatos metálicos, ativar enzimas antioxidantes, reduzir os radicais alfa-tocoferol e inibir as oxidases. Desta forma, são capazes de proteger as plantas dos raios UV e eliminar as EROs geradas, sendo vantajosas por atuarem de três

formas distintas na fotoproteção: na absorção de raios UV, propriedades antioxidantes direta e indireta e modulação de várias vias de sinalização (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013).

### 3.8. *Humulus lupulus*

O gênero *Humulus* pertence à família Cannabaceae e é representado por três espécies principais *H. lupulus*, *H. scandens* e *H. yunnanensis*. O *H. lupulus*, comumente conhecido como lúpulo, é uma planta trepadeira perene e dioica, que ocorre naturalmente em regiões temperadas como Europa, Ásia e América do Norte (BOCQUET *et al.*, 2018).

O caule do lúpulo pode atingir até 10 metros de altura quando enrolado a um suporte, suas folhas são posicionadas de maneira oposta, apresentam forma de coração e bordas dentadas. As inflorescências femininas são compostas por brácteas foliáceas embutidas em cones, enquanto as masculinas possuem flores pequenas e organizadas em cachos. Os cones femininos apresentam glândulas de lupulina, onde alguns metabólitos secundários são biossintetizados (OLŠOVSKÁ *et al.*, 2016; BOCQUET *et al.*, 2018).

O lúpulo é amplamente conhecido pelo uso das inflorescências femininas na produção de cerveja, responsável por conferir amargor, aroma e preservação. Além disso, já foi abundantemente utilizado devido às suas propriedades medicinais e recomendado para o alívio de distúrbios ginecológicos, o que sugere um mecanismo de ação estrogênico. (KEILER; ZIERAU; KRETZSCHMAR, 2013).

Diante de seu uso já consagrado na cervejaria, grande parte das pesquisas que envolvem o lúpulo são voltadas às propriedades que permitem tal aplicação, cuja relevância está relacionada, principalmente, aos metabólitos secundários presentes na inflorescência feminina. Os principais grupos de metabólitos encontrados na planta são polifenóis (catequina, epicatequina, rutina, cumarina, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, quercetina e outros), óleos essenciais ( $\beta$ -mirceno, cariofileno, humuleno,  $\beta$ -farneseno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -selineno),  $\alpha$ - e  $\beta$ -ácidos (humulona, cohumulona, lupulona, colupulona), entre outros. (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015; MALIAR *et al.*, 2017).

A planta também é usada na medicina tradicional, desde os tempos antigos, para controlar os sintomas de ansiedade, espasmos, tosse, febre, inflamação e dor de dente. Estudos mostram outras atividades biológicas do lúpulo como, antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral, antidiurética, sedativa, dentre outras, relacionadas, principalmente, à grande quantidade de humulonas, lupulonas, isohumulonas e xantohumol presentes (KESKIN *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019).

Devido à grande quantidade de metabólitos presentes e às atividades biológicas atribuídas ao lúpulo, vem crescendo o interesse em um possível uso da planta para propósitos além da cervejaria, principalmente na indústria farmacêutica e nutracêutica, mas também em produtos cosméticos. Os extratos vegetais são ricos em compostos bioativos, como terpenos, alcaloides e compostos fenólicos que conferem diversos benefícios à pele. Além das inflorescências, também existem metabólitos de interesse em outras partes da planta, o que favorece o uso de partes da planta descartadas durante a produção de cerveja (ALONSO-ESTEBAN *et al.*, 2019; GUIOMAR, 2020).

Ainda que existam estudos descrevendo sua atividade biológica e uso na área da saúde, a maior parte da produção de lúpulo é destinada à indústria cervejeira, por ser o seu uso mais comum. Porém, a parte da planta de interesse desta indústria é o grânulo de lupulina presente nos cones de inflorescência femininos, as outras partes do lúpulo não apresentam uma função direta na produção de cerveja. Após a colheita das inflorescências é realizada uma poda total, restando apenas, aproximadamente, 5 cm do ramo principal, como uma forma de permitir um maior armazenamento de energia nas raízes e nos rizomas, desta forma, as demais partes podadas da planta podem ser reaproveitadas com outras finalidades (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019; SILVA, 2020).

Graças à vantagem de aproveitamento de partes do lúpulo que contenham concentrações significativas de compostos bioativos capazes de absorver a fração ultravioleta da radiação, ressalta-se sua aplicabilidade em formulações fotoprotetoras de origem natural baseadas nos extratos da planta.

### **3.9. Bases para protetor solar**

O protetor solar é uma formulação cosmética com capacidade de proteger a pele da radiação UV, podendo apresentar diferentes formas farmacêuticas (loções, géis, cremes e etc.) e texturas segundo sua composição. Desta forma, além da avaliação dos filtros solares, a escolha das matérias-primas também é um passo importante para a formulação, já que podem influenciar significativamente nos parâmetros de estabilidade, toxicidade, eficácia, viscosidade, percepção sensorial e aceitabilidade (INFANTE *et al.*, 2021).

Hidrogéis são redes poliméricas produzidas a partir de um ou mais monômeros, que possuem capacidade de reter grandes quantidades de água em sua estrutura tridimensional, sem se dissolver no meio aquoso devido à existência de ligações cruzadas entre as cadeias da rede (AHMED, 2015).



Os hidrogéis compostos por poloxamer 407 vêm sendo amplamente estudados devido à sua ampla gama de aplicações, que vai desde o uso em soluções orais e suspensões, até formulações tópicas, oftálmicas, inalatórias e intravenosas (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017).

Os poloxâmeros são uma classe de copolímeros hidrossolúveis não iônicos, constituídos por três blocos monoméricos, sendo um núcleo hidrofóbico de polioxipropileno (POP) entre dois blocos hidrofílicos de polioxietileno (POE). Por apresentarem uma estrutura anfifílica, são bastante úteis como surfactantes, estabilizantes, solubilizantes e agentes de revestimento e frequentemente utilizados na formação de micelas poliméricas (GIULIANO *et al.*, 2018).

As soluções aquosas de poloxamer passam por um fenômeno reversível de transição entre solução e gel com a variação da temperatura, conhecido como propriedade termogelificante. Abaixo de uma determinada temperatura, a amostra permanece líquida, com o aumento da temperatura as moléculas de poloxamer se agregam em micelas e tomam a forma semi-sólida de gel quando a formulação apresenta concentração suficiente do copolímero. Concentrações mais altas de poloxamer levam a géis mais viscosos e de lentadissolução, facilitando a incorporação de ativos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Tais características permitem diversas aplicações como, aditivos alimentares, transportadores de ativos em cosméticos, ingredientes farmacêuticos, encapsulamento de medicamentos para transporte aumentando sua biodisponibilidade e, até mesmo, uso em engenharia de tecidos e tratamento de feridas (DUMORTIER *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2018).

## 4. METODOLOGIA:

### 4.1. Material vegetal

Foi obtida muda da espécie *Humulus lupulus* na região do Vale do Gamarra (21° 57' 32" S 44° 53' 24" O), no município de Baependi/MG em janeiro/ 2018, com excisata depositada no Herbário Prof, José Badini DEBIO/ICEB/UFOP, sob número de registro OUPR 29768 e registro no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob número A07DBB0 (SILVA, 2020). A partir da muda recebida, foi realizada a coleta das folhas em dezembro/2020 e secagem em temperatura ambiente. Após a completa secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas.

### 4.2. Caracterização do material vegetal

#### 4.2.1. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado a partir da pesagem em triplicata de 1g de folhas secas e pulverizadas, seguida de secagem em estufa pré-aquecida a 105 °C por 15 min. O resfriamento da amostra se deu em dessecador com sílica e a amostra foi pesada, calculando o teor de umidade utilizando a fórmula a seguir (Farmacopeia Brasileira, 2019):

$$\text{Teor de umidade \%} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

#### 4.2.2. Determinação do resíduo por incineração (cinzas)

Foram pesadas triplicatas de 5g de folhas secas e pulverizadas e em seguida submetidas à incineração em mufla a 600 ± 50 °C por 3h. Ao final do processo, o resíduo obtido foi resfriado em dessecador e pesado (Farmacopeia Brasileira, 2019). A porcentagem de resíduo é expressa em % e calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Teor de cinzas \%} = \frac{\text{Resíduo do cadinho (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100$$

#### 4.2.3. Perda por dessecação em estufa

Foram pesados em triplicata 1g de folhas secas e pulverizadas, transferidos para cadinhos de porcelana e deixados em estufa pré-aquecida a 105 °C por 2 h. Em seguida as amostras foram deixadas em dessecador com sílica até o resfriamento e foi realizada a pesagem para determinação da perda de água (PIERRI *et al.*, 2017). O teor de perda por dessecação é expresso em porcentagem e calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Perda por dessecação \%} = \frac{\text{Resíduo do cadinho (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100$$

#### 4.2.4. Análise granulométrica

Foram pesados 25g das folhas de *H. lupulus* secas e pulverizadas. Esta amostra foi submetida à tamisação em um tamisador vibratório por 30 min e o material que passou através de tamises de malhas 0,125; 0,180; 0,420, 0,850 e 1,000 mm foi pesado para determinar o perfil granulométrico das amostras (PIERRI *et al.*, 2017).

#### 4.3. Obtenção do extrato bruto

O método de escolha para a obtenção do extrato de *H. lupulus* foi a percolação ou lixiviação, procedimento mais comumente utilizado para a produção de extratos fluidos, utilizando-se um percolador. As folhas pulverizadas foram umedecidas com uma quantidade adequada de etanol 92,8° GL e deixadas em repouso por 48 horas em recipiente bem fechado. Após este período, a torneira do percolador foi aberta, permitindo o gotejamento do líquido. O líquido obtido após o gotejamento foi seco em rotaevaporador até a evaporação do solvente. Quantidade extra de solvente foi adicionada ao percolador, conforme necessário, e passando novamente pelo processo de gotejamento, até a exaustão do material vegetal. O extrato bruto obtido foi então deixado em dessecador com vácuo até a secagem completa do material (PANDEY; TRIPATHI, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016).

#### 4.4. Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto

As frações foram obtidas através do particionamento líquido-líquido do extrato etanólico bruto em um funil de separação, onde os compostos bioativos presentes no extrato são separados de acordo com a polaridade do solvente adicionado, utilizando uma ordem crescente de polaridade (MOURA, 2008). Foram pesados 8g do extrato etanólico bruto seco e ressuspendidos em 104 mL de metanol, a solução foi transferida para o funil de separação e foram adicionados 26 mL de água, totalizando 130 mL de solução hidrometanólica (8:2), após a mistura da solução foram adicionados 50 mL de hexano e realizada a separação através do gotejamento da fração hidrometanólica, a fração hexânica foi despejada em um erlenmeyer. O processo foi repetido por 5 vezes, até que a fase hexânica se mostrasse translúcida. As frações obtidas foram evaporadas em rotaevaporador e foram mantidas em dessecador com vácuo até a secagem completa.

A fração hidrometanólica remanescente da partição anterior foi novamente levada a um funil de separação, acrescida de água, a fim de tornar a proporção entre metanol e água equivalente a 7:3 e particionada com clorofórmio (80 mL), repetindo o processo até observar certa transparência na fração clorofórmica.

Para o novo particionamento com butanol, a fração hidrometanólica foi evaporada em rotaevaporador até a eliminação do metanol, foi transferida para o funil de separação e saturada com água para facilitar a separação, foram necessários 2 ciclos de 100 mL de butanol para a separação das frações.

As frações obtidas foram evaporadas em rotaevaporador e mantidas em dessecador com vácuo até a secagem completa. Para a secagem da fração hidrometanólica foi necessária a utilização de banho maria a aproximadamente 60 °C para a evaporação de todo o solvente e para a fração butanólica, foram sendo construídas finas camadas de extrato em uma placa de petri mantida em dessecador até a total evaporação do solvente.

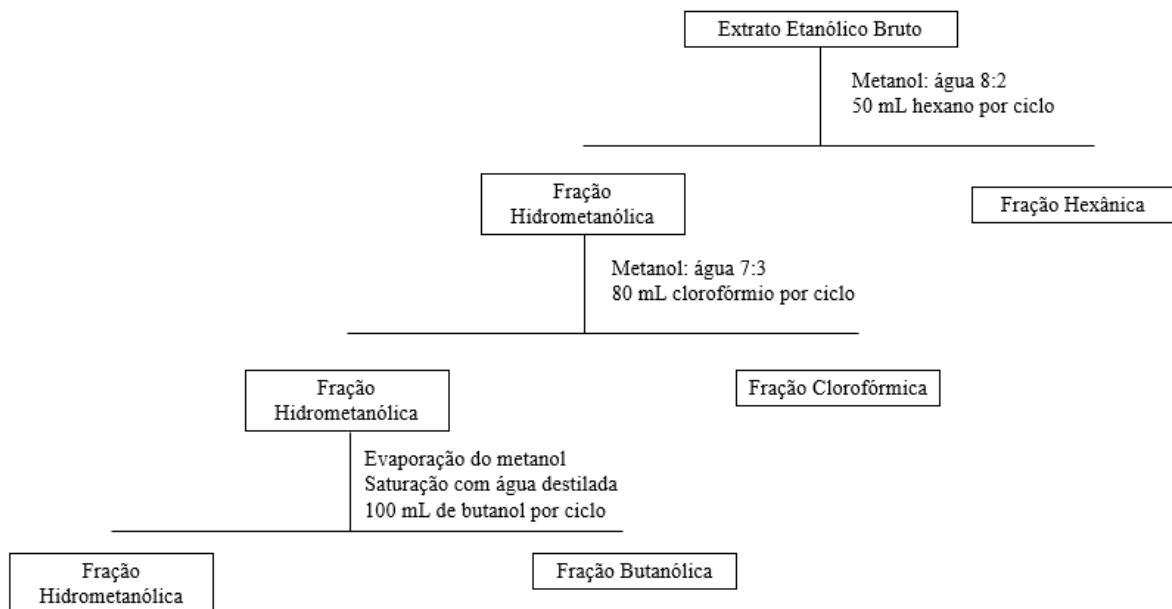


Figura 3: Esquema do fracionamento do extrato etanólico bruto

## 4.5. Caracterização fitoquímica dos extratos de *H. lupulus*

### 4.5.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Para avaliar o teor de fenólicos totais presente na amostra foi utilizado o método do Reagente de Folin-Ciocalteu (BONOLI *et al.*, 2014 modificado). O método consiste na quantificação espectrométrica dos metabólitos presentes em cada fração do extrato. Utilizou-se uma placa de 96 poços para o preparo da curva padrão, amostras e branco. A curva padrão contou com 7 pontos, de concentrações, 5; 10; 20; 40; 50; 60 e 70 µg/mL. Foi utilizado ácido gálico em concentração 0,2 mg/mL como padrão para o preparo da curva e o extrato bruto e frações foram preparados em concentração 0,5 mg/mL em metanol. Foram utilizados reagente de Folin-Ciocalteu e Carbonato de sódio 15% para reação com os compostos fenólicos na

curva e nas amostras, os brancos foram preparados somente com água destilada e extrato, por se tratarem de amostras coloridas. Foi realizada a leitura em leitor de ELISA (THERMO PLATE®) a 650 nm, após 2h de incubação em ambiente protegido da luz. A partir da curva padrão foi obtida a equação da reta por regressão linear, o cálculo da concentração de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (EAG/g) foi realizado de acordo com as absorvâncias observadas em cada amostra.

#### **4.5.2. Determinação do teor de flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais foi determinado a partir do método do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (CHANG *et al.*, 2002 modificado), utilizando leitor de microplacas para a obtenção das absorvâncias e posterior quantificação dos metabólitos presentes no extrato bruto e frações. O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços. A curva padrão foi preparada nas concentrações 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45  $\mu\text{g/mL}$  utilizando como padrão rotina na concentração de 0,2 mg/mL. Foram preparadas soluções de extrato bruto e frações na concentração de 2,5 mg/mL. O reagente cloreto de alumínio foi adicionado na curva e nas amostras, e os brancos foram preparados somente com água destilada, álcool etílico absoluto, acetato de potássio e os respectivos extratos. Foi realizada a leitura da absorvância em leitor de Elisa (THERMO PLATE®) a 405 nm, após 40 min de incubação em ambiente protegido da luz. A equação da reta foi obtida através da curva padrão e o cálculo do teor de flavonoides foi expresso como equivalente de rutina por grama da amostra (ER/g) a partir da absorvância das amostras.

#### **4.6. Avaliação da absorção dos extratos na região do UV**

Para a determinação da absorvância na região do UV, os extratos foram solubilizados em álcool etílico absoluto nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL e foi realizada uma varredura de 5 em 5 nm, na faixa de 260 a 400 nm, com leitura fixa a 290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm, em espectrofotômetro UV-Vis, para avaliar a absorção dos extratos na região do UVA e do UVB (VIOLANTE *et al.*, 2009).

##### **4.6.1. Delineamento experimental fatorial para seleção da formulação**

Foi idealizado um delineamento experimental fatorial  $2^3$ , utilizando três variáveis diferentes e variando em dois níveis, descritos como mínimo (-) e máximo (+), segundo o seguinte planejamento:

Tabela 3: Desenho experimental fatorial 2<sup>3</sup> para as formulações de hidrogel.

Fatores	Níveis	
	-	+
<b>Poloxamer (%)</b>	19	20
<b>Carbopol (%)</b>	0,05	0,15
<b>DMSO (%)</b>	1	2

Para o desenvolvimento das formulações foram mantidas fixas as concentrações de extrato etanólico bruto (5%) e PEG 400 (SYNTH<sup>®</sup>) (2%) e variadas as concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) (DINÂMICA<sup>®</sup>), poloxamer 407 (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>) e suspensão aquosa de acrilato (CARBOPOL<sup>®</sup> ULTREZ 21) previamente preparada a 1%. Foi delineado um desenho experimental 2<sup>3</sup>, desta forma, foram obtidas 8 formulações no ensaio, com níveis variando entre (-) e (+), representadas na tabela 4.

Tabela 4: Composição das formulações de hidrogel

Formulação	Extrato Etanólico Bruto (%)	PEG400 (%)	DMSO (%)	Poloxamer (%)	Carbopol (%)
<b>1</b>	5	2	1	19	0,05
<b>2</b>					0,15
<b>3</b>				20	0,05
<b>4</b>					0,15
<b>5</b>			2	19	0,05
<b>6</b>					0,15
<b>7</b>				20	0,05
<b>8</b>					0,15

#### 4.7. Preparo das formulações

As formulações foram preparadas pesando-se, primeiramente, as concentrações previamente selecionadas de extrato bruto e fração butanólica para as diferentes formulações, PEG 400, poloxamer e DMSO. As matérias-primas foram solubilizadas em álcool etílico absoluto e acetona P.A., até que fosse possível observar a total homogeneização da solução.

Após a completa solubilização do extrato, a solução foi mantida em dessecador a vácuo até a completa evaporação dos solventes. Para a finalização da formulação, foram adicionadas a suspensão de carbopol e a água destilada, com a formulação em um banho de gelo de forma a facilitar a mistura dos componentes, e o pH foi neutralizado com aminometil propanol (AMP-95).

#### **4.8. Caracterização físico-química das formulações**

A caracterização físico-química das formulações foi realizada avaliando os parâmetros tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta de forma a selecionar a formulação com o menor tamanho de partícula ( $< 200$  nm) e índice de polidispersão ( $< 0,5$ ). Para as determinações, foi utilizada uma diluição 1:100 das amostras em água purificada e analisadas pelo equipamento Zetasizer (PN3702) - Software: Zetasizer, utilizando-se cubeta de quartzo, as medidas foram realizadas em um ângulo de retroespalhamento de  $173^\circ$ , à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (REGISTRE, 2020).

#### **4.9. Otimização da formulação**

A análise do experimento fatorial foi realizada pelo programa estatístico Minitab<sup>®</sup>, a fim de determinar a melhor combinação entre os diferentes níveis, que resultasse em uma formulação com o menor tamanho de partícula e menor índice de polidispersão (IPD) possíveis.

#### **4.10. Obtenção da formulação de interesse**

A partir dos resultados obtidos em estudos realizados com o extrato etanólico bruto e frações, a fração butanólica foi selecionada para o prosseguimento do desenvolvimento da formulação devido ao melhor desempenho nos testes. Após a realização do delineamento experimental, a formulação que apresentou a melhor performance foi repetida utilizando a fração butanólica e os testes de caracterização foram realizados nos tempos de 24 horas e 7 dias.

#### **4.11. Teste de centrifugação da formulação**

O teste de centrifugação é realizado para avaliar os sinais iniciais de instabilidade que uma formulação pode apresentar. Para a execução do teste, as formulações foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, 15 dias após o preparo. Após o teste foram

observados os sinais visuais de instabilidade como separação de fases, formação de precipitado e mudança de coloração (ANVISA, 2004).

#### 4.12. Avaliação do Fator de Proteção Solar

A eficácia da formulação de protetor solar, com base em extratos de *H. lupulus*, foi determinada por método *in vitro*, usando o espectrofotômetro UV-Visível (THERMO SCIENTIFIC). Usando um filtro solar Cetaphil® Sun spray loção lipossomal (FPS 30), na concentração de 2,0 mg/mL em etanol a 92,6° GL, como solução padrão. A solução estoque foi preparada pesando-se uma quantidade suficiente da formulação e solubilizando-a em etanol a 92,6° GL de forma a preparar uma solução a 4 mg/mL. A partir da solução estoque, outras soluções na concentração de 2,0 mg/mL foram preparadas para o estudo de determinação *in vitro* do FPS. Posteriormente, os valores de absorvância de cada alíquota foram determinados, na faixa de 260 a 400 nm, com intervalos de 1 nm e usando etanol a 92,6° GL como branco (SINGH; SHARMA, 2016). Para o cálculo do Fator de Proteção Solar foram utilizadas as absorvâncias obtidas no intervalo de 290 a 320 nm de 5 em 5 nm, segundo a seguinte equação:

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

Onde: FC = fator de correção (igual a 10);

EE ( $\lambda$ ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda  $\lambda$ ;

I ( $\lambda$ ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda  $\lambda$ ;

Abs ( $\lambda$ ) = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da amostra no comprimento de onda ( $\lambda$ );

(PINHO *et al.*, 2014).



Tabela 5: Correlação entre o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) para cada comprimento de onda

$\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ )
<b>290</b>	0,0150
<b>295</b>	0,0817
<b>300</b>	0,2874
<b>305</b>	0,3278
<b>310</b>	0,1864
<b>315</b>	0,0839
<b>320</b>	0,0180

Fonte: MANSUR *et al.* (1989)

#### 4.13. Avaliação da razão UVA/UVB

Para a determinação da razão UVA/UVB foi realizada uma leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm, com intervalo de 1 em 1 nm, em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC), na concentração de 2,0 mg/mL conforme análise realizada para o cálculo de FPS. A partir das absorvâncias obtidas foi calculada a razão das áreas sob a curva UVA/UVB conforme a equação e classificada segundo o sistema Boot's Star Racing mostrado na Tabela 6 (SILVA, 2017):

$$\frac{UVA}{UVB} = \frac{\int_{320\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A(\lambda), d\lambda}{\int_{290\text{ nm}}^{320\text{ nm}} A(\lambda), d\lambda}$$

Tabela 6: Sistema de classificação da proteção UVA conforme razão UVA/UVB pelo sistema Boot's Star Racing:

Razão UVA/UVB	Estrelas	Descrição
<b>0,0 até &lt;0,2</b>	-	Muito baixa
<b>0,2 até &lt; 0,4</b>	*	Moderada
<b>0,4 até &lt;0,6</b>	**	Boa
<b>0,6 até &lt;0,8</b>	***	Superior
<b>0,8 até &lt;0,9</b>	****	Máxima
<b>≥ 0,9</b>	*****	Ultra

#### **4.14. Avaliação da citotoxicidade dos extratos e formulações**

##### **4.14.1. Cultivo celular**

Foi avaliada a citotoxicidade do extrato bruto, fração butanólica e respectivas formulações em culturas de fibroblastos murinos L929, utilizando meio RPMI 1640 (Sigma®) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e gentamicina 60 µg/L, pH 7,22 para o cultivo das células. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas ou até o tempo necessário para obter 80% ou mais de crescimento celular, trocando o meio quando era possível observar a mudança da coloração róseo-laranja para amarela.

Após o crescimento e expansão das células, foi preparada a solução estoque ( $5 \times 10^5$  de células/ mL) em meio RPMI com fenol completo, o meio de cultura foi descartado e as células foram desprendidas do frasco de cultura celular por raspagem com auxílio do suporte plástico (*cell scraper*), em seguida, foram adicionados aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização e preparo da solução estoque. A solução foi centrifugada por 07 minutos a 1300 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização em vórtex.

As células foram diluídas 20x em meio RPMI completo para a quantificação. Foi adicionada uma alíquota de 10 µL à câmara de Neubauer para a contagem e realizada uma diluição para obtenção de uma solução com  $5 \times 10^5$  células/mL de meio RPMI, pipetou-se 100 µL em cada poço da placa de cultura de 96 poços estéril. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas para possibilitar a adesão nas placas. Após esse período, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com meio RPMI sem fenol completo.

##### **4.14.2. Citotoxicidade em células L929**

Após o cultivo celular e o plaqueamento das células, 100 µL das amostras previamente solubilizadas em meio RPMI nas concentrações de 50 a 0,08 mg/mL, foram adicionadas em triplicata às placas. Foi utilizado meio RPMI contendo 10% de DMSO de forma a facilitar a solubilização do extrato. Posteriormente, as placas foram incubadas nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. O meio foi removido e os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com PBS pH 7,2. As células foram fixadas por adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 20% frio durante 1 h a 4 °C. Após este tempo, a placa foi lavada com água destilada e seca.

As células fixadas foram coradas durante 30 min com 40 µL de SRB 0,1 % solubilizado em ácido acético a 1 %. A placa foi lavada com ácido acético a 1 % e seca para

posterior adição de 200 µL de tampão Tris 10 mM (pH 10,5) para solubilizar a coloração, sob abrigo de luz. Após 30 min em temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 490 nm em leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES®, SPECTRA MAX). Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas), calculados a partir da seguinte fórmula (SKEHAN et al., 1990):

$$\% \text{ da viabilidade celular} = 100 - \left\{ \left[ \frac{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100 \right\}$$

#### **4.15. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e formulação**

##### **4.15.1. Determinação da atividade sequestrante do radical DPPH**

O radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos e óleos vegetais através da metodologia fotolorimétrica *in vitro* descrita por SOUSA *et al.* (2007). Foi preparada solução estoque de rutina de 12 µg/mL em metanol, soluções estoque de 120 µg/mL de extrato bruto, frações e formulações e a solução de DPPH na concentração de 0,004 % p/v. O padrão foi pipetado em placa de 96 poços de forma a obter as concentrações 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 µg/mL. Foram pipetadas as soluções de extrato bruto, fração aquosa, clorofórmica, hexânica e formulação de extrato bruto nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0; 70,0 µg/mL e as soluções de fração e formulação butanólica nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 µg/mL. O branco foi preparado substituindo a solução de DPPH por 100 µL de metanol. Foi realizada a leitura em leitor de microplacas a 490 nm após 30 min de incubação ao abrigo da luz. As análises foram realizadas em triplicatas. Foi construída uma curva de inibição para as amostras e para o padrão e a capacidade de inibição do radical livre DPPH foi calculada a partir da equação:

$$CI \text{ (Concentração Inibitória)} = \left[ \frac{(\text{AbsControle} - \text{AbsAmostra})}{\text{AbsControle}} \right] \times 100$$

Onde, AbsControle é a absorbância do controle e AbsAmostra é a absorbância das amostras e do padrão.

Os resultados foram expressos em CI50, quantidade de antioxidante necessária para atingir 50% da concentração inicial do radical DPPH.

#### 4.15.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

Também foi testada a capacidade do extrato, frações e formulações sequestrarem radicais livres pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS), segundo metodologia descrita por DU *et al.* (2009), com modificações.

Para a formação do radical, foram misturados 5 mL do sal ABTS (7,4 mmol/L) com 5 mL de persulfato de potássio ( $K_8O_2H_8$ ) (2,6 mmol/L) em água. A solução foi armazenada ao abrigo da luz por 12 horas e em seguida diluída, em aproximadamente 50 vezes, em metanol de forma a alcançar absorvância de  $0,7 \pm 0,02$  a 650 nm.

Foram preparadas soluções estoque do extrato bruto, frações e formulações obtidas a partir do extrato bruto e fração butanólica, bem como do padrão rutina. As soluções estoque de padrão, nas concentrações de 15 e 45  $\mu\text{g/mL}$  em metanol, foram pipetadas em placa de 96 poços de forma a obter as concentrações 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,75 e 4,5  $\mu\text{g/mL}$ . Foram preparadas soluções dos extratos e formulações nas concentrações de 12,5; 75 e 300  $\mu\text{g/mL}$  para a obtenção das concentrações 0,5; 1,0; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 60,0  $\mu\text{g/mL}$  nas placas de 96 poços. O branco foi preparado substituindo a solução de ABTS por 120  $\mu\text{L}$  de metanol. Foi realizada a leitura em leitor de microplacas a 650 nm após 6 min de incubação ao abrigo da luz. As análises foram realizadas em triplicatas. Foi construída uma curva de inibição para as amostras e para o padrão e a capacidade de inibição do radical livre ABTS foi calculada a partir da equação:

$$CI (\text{Concentração Inibitória}) = [(AbsControle - AbsAmostra) / AbsControle] \times 100$$

Onde, AbsControle é a absorvância do controle e ABSAmostra é a absorvância das amostras e do padrão.

Os resultados foram expressos em CI50, quantidade de antioxidante necessária para atingir 50% da concentração inicial do radical ABTS.

#### 4.16. Avaliação do comportamento reológico das formulações

A avaliação do comportamento reológico das formulações foi realizada em reômetro Brookfield® DV-III Ultra, utilizando o aparato *Cone Plate* (CP-52), variando as rotações por minuto (RPM) de 0-100, com intervalo de 20 segundos para a mudança de velocidade de rotação, utilizando 0,5 mL de formulação e faixa de temperatura de 8 a 20°C com variações de 4°C. O teste foi realizado em triplicata para cada formulação.

#### 4.17. Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Foi avaliada a normalidade dos resultados e constatada uma amostra não paramétrica, desta forma, foi realizado o teste *One way* ANOVA para avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, seguido pelo pós-teste de *Tukey* para verificar entre quais amostras se encontram, as diferenças foram consideradas significativas para os valores de  $P \leq 0,05$ .

Para a análise de correlação entre as metodologias antioxidantes adotadas e o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides foi adotada a correlação de Spearman e classificada segundo MUKAKA (2012), onde o valor de  $r$  pode variar de -1 a +1, sendo o valor de -1 considerado a correlação negativa perfeita, 0 sem correlação e +1 a correlação positiva perfeita (MUKAKA, 2012).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extrato bruto e frações

Foram necessários 10 ciclos de percolação para a produção do extrato etanólico bruto e foi obtido um rendimento final de 19,44%. Foi realizado o fracionamento do extrato bruto e foram obtidos rendimentos de 49,07% para a fração hidrometanólica, 10,11% para a fração butanólica, 7,02% para a fração clorofórmica e 21,86% para a fração hexânica.

### 5.2. Caracterização do material vegetal

A caracterização farmacognóstica do pó pulverizado é de grande importância para controlar a qualidade do material vegetal obtido. Os resultados encontrados para teor de umidade, teor de cinzas e perda por dessecação estão expressos na Tabela 7, e os resultados encontrados na análise granulométrica encontram-se na Tabela 8.

Tabela 7: Caracterização da folha de *H. lupulus* pulverizada

Ensaio	(%) ± DP
Teor de umidade	9,59 ± 0,135
Teor de cinzas	14,77 ± 0,15
Perda por dessecação	10,45 ± 1,44

Os teores de umidade e de perda por dessecação do material vegetal foram de 9,59 e 10,45%, respectivamente, indicando uma baixa quantidade de água presente nas folhas secas e pulverizadas, considerando o limite máximo de 14% para drogas vegetais. A água pode estar presente na amostra em duas diferentes formas, sendo ela livre ou quimicamente ligada. A água livre é a mais abundante e disponível para reações de degradação e é a forma mais fácil de ser eliminada, a água ligada compõe a estrutura da folha, estando ligada a proteínas, açúcares e adsorvida na superfície, desta forma, é necessário uma maior temperatura e tempo de exposição para a sua remoção. É importante o conhecimento destes parâmetros ao se considerar a conservação deste material, pois uma menor taxa de água leva a uma maior estabilidade e menor crescimento bacteriano e atividade enzimática, que podem levar à degradação do produto (ALCÂNTARA, 2006; MACÊDO *et al.*, 2020).

Altos teores de cinzas evidenciam a presença de grandes quantidades de matéria inorgânica não volátil, que podem estar presentes como constituintes ou contaminantes no material vegetal, com um teor de 14,76%, espera-se uma quantidade abundante de substâncias inorgânicas presentes no material. O teor de cinzas elevado sugere uma grande quantidade de

minerais presentes na estrutura da planta, possivelmente cálcio, e pode significar uma parede celular bem estruturada, demonstrando que a planta obtém uma nutrição satisfatória no solo em que está alocada. Tal fato também pode ser explicado pela composição do solo, a planta coletada se encontrava em Ouro Preto/MG, segundo ANDRADE, LEITE e BACELLAR (2012), a região apresenta elevado teor de minerais no solo que pode ser influenciado pela litologia local. (ALMEIDA *et al.*, 2003; ANDRADE, L. N.; LEITE, M. G. P.; BACELLAR, L. A. P., 2013; MARCHESAN, 2020).

Tabela 8: Percentual de amostra vegetal retida no tamis em diferentes malhas durante análise granulométrica

#Tamis	Amostra retida (%)
1,19	0,12
0,59	25,96
0,5	13,28
0,42	18,80
0,210	33,68
0,125	5,40
Fundo	2,64
Total	99,88

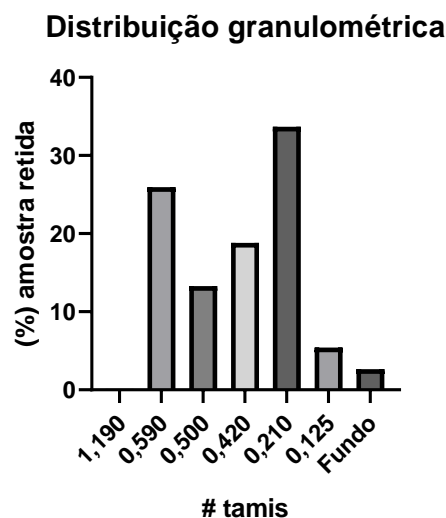


Figura 4: Distribuição granulométrica do pó da folha de *H. lupulus* em diferentes malhas de tamis

O tamanho da partícula obtida na pulverização das folhas influencia na área superficial e, conseqüentemente, na interação com o solvente extrator e solubilidade da amostra, sendo capaz de interferir significativamente nas características do produto final e, de forma a

possibilitar este controle, foi realizada a análise granulométrica em tamisador automático. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2019), o pó obtido é classificado como moderadamente grosso, considerando que a quase totalidade do pó atravessou o tamis de malha 1,19 mm e menos de 40% ficou retido no tamis de malha 210  $\mu\text{m}$ , se aproximando da descrição oferecida em que, a totalidade dos pós passariam por uma malha de 710  $\mu\text{m}$  e, no máximo 40%, passam pelo tamis de malha 250  $\mu\text{m}$  (MACÊDO *et al.*, 2020).

Estas análises são importantes como conhecimento básico e possibilitam a padronização do material vegetal, de forma a garantir as especificações utilizadas no controle de qualidade e facilitar a reprodutibilidade do produto final (COUTO *et al.*, 2009).

### 5.3. Compostos Fenólicos Totais

O método de Folin-Ciocalteu é amplamente utilizado para a determinação do teor de compostos fenólicos, porém não se trata de uma metodologia específica, já que é capaz de detectar todos os grupos fenólicos presentes na amostra, incluindo proteínas extraíveis (SANTOS, 2018).

O ensaio é um método espectrofotométrico simples, baseado na coloração formada a partir da reação do reagente de Folin-Ciocalteu com substâncias redutoras presentes na amostra. O reagente é composto pelos ácidos fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), que são reduzidos pelas substâncias presentes nos extratos. O ensaio é realizado em pH alcalino para que torne propícia a dissociação das substâncias redutoras, formando o ânion fenolato, capaz de reduzir o reagente, formando os óxidos de tungstênio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) e de molibdênio ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ), que possuem coloração azul detectável por espectrofotômetro, possibilitando a quantificação das substâncias redutoras ali presentes (PIRES *et al.*, 2017).

O teor de compostos fenólicos encontrado no extrato bruto e frações está expresso na Tabela 9 como equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.



Tabela 9: Teor de compostos fenólicos presentes no extrato bruto e frações, expresso em Equivalente de Ácido Gálico por grama de amostra.

<b>Amostra</b>	<b>Valor médio mg EAG/g extrato ± DP</b>
<b>EEB</b>	43,97 ± 6,35
<b>AQUO</b>	28,7 ± 5,88
<b>BUT</b>	83,64 ± 13,34
<b>CLOR</b>	66,76 ± 27,11
<b>HEX</b>	57,42 ± 26,11

Onde, EEB (Extrato Etanólico Bruto); AQUO (Fração Aquosa); BUT (Fração Butanólica); CLOR (Fração Clorofórmica); HEX (Fração Hexânica).

A partir da curva padrão foi obtida a seguinte equação da reta:  $y = 0,012x + 0,2788$ ,  $r^2 = 0,9938$ . Analisando os resultados, a fração butanólica apresentou o maior teor de fenólicos totais, seguido pela fração clorofórmica. Sabe-se que a fração hexânica comumente apresenta menores teores de compostos fenólicos, visto que estes compostos possuem maior afinidade com solventes mais polares, porém este não foi o resultado encontrado, possivelmente devido à não especificidade do teste e/ou influência de compostos coloridos presentes na amostra, já que se trata de uma fração de coloração mais escura que as demais (SANTOS *et al.*, 2019).

O menor teor de fenólicos totais foi observado na fração hidrometanólica, provavelmente devido ao esgotamento sofrido pelo fracionamento, já que todas as demais frações derivaram desta.

O lúpulo é uma planta com reconhecida presença de compostos fenólicos, MARQUES *et al.* (2014) encontraram um teor de fenólicos de 4,75% em pellets contendo flores de lúpulo, utilizados na fabricação de cerveja artesanal (MARQUES *et al.*, 2014).

SILVA (2020) encontrou teor de compostos fenólicos no extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *H. lupulus* em quantidade significativamente mais alta ( $75,5053 \pm 8,0443$  mg EAG/g amostra), bem como na fração hidrometanólica (HM) ( $91,8497 \pm 7,2925$  mg EAG/g amostra), porém, neste caso não é possível fazer tal comparação, já que o referido estudo obteve somente duas frações a partir do extrato bruto, as frações hidrometanólica e hexânica. A fração hexânica não foi analisada devido à afinidade dos compostos fenólicos por frações de polaridade média a alta (SILVA, 2020).

PROESTOS *et al.* (2006) avaliou o teor de compostos fenólicos presentes no extrato metanólico de folhas do lúpulo, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação das estruturas. Obtiveram um teor de  $2,9 \pm 0,1$  mg EAG/g amostra. Valor inferior aos obtidos nestes estudos tanto para o extrato bruto, quanto para as frações (PROESTOS *et al.*, 2006).

#### 5.4. Flavonoides Totais

O método do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) é amplamente utilizado para a quantificação de flavonoides em extratos vegetais devido à formação de complexos estáveis com os flavonoides presentes no meio, formando uma coloração amarelada que possibilita a leitura da absorvância por espectrofotometria. Com a formação do complexo com os flavonoides ocorre uma intensificação da absorvância e deslocamento para maiores comprimentos de onda, desta forma é possível determinar a quantidade de flavonoides sem a interferência dos demais compostos fenólicos que possam estar presentes no extrato. O teor de flavonoides encontrado está expresso na Tabela 10 como equivalente de rutina (ER) por grama de extrato (MARCUCCI *et al.*, 2021).

Tabela 10: Teor de flavonoides totais presentes no extrato bruto e frações, expresso em Equivalentes de Rutina por grama de amostra.

<b>Amostra</b>	<b>Valor médio mg ER/g extrato <math>\pm</math> DP</b>
<b>EEB</b>	$0,26 \pm 1,08$
<b>AQUO</b>	$0,01 \pm 0,24$
<b>BUT</b>	$7,21 \pm 0,12$
<b>CLOR</b>	$2,12 \pm 1,56$
<b>HEX</b>	$-1,43 \pm 1,61$

EEB (Extrato Etanólico Bruto); AQUO (Fração Aquosa); BUT (Fração Butanólica); CLOR (Fração Clorofórmica).

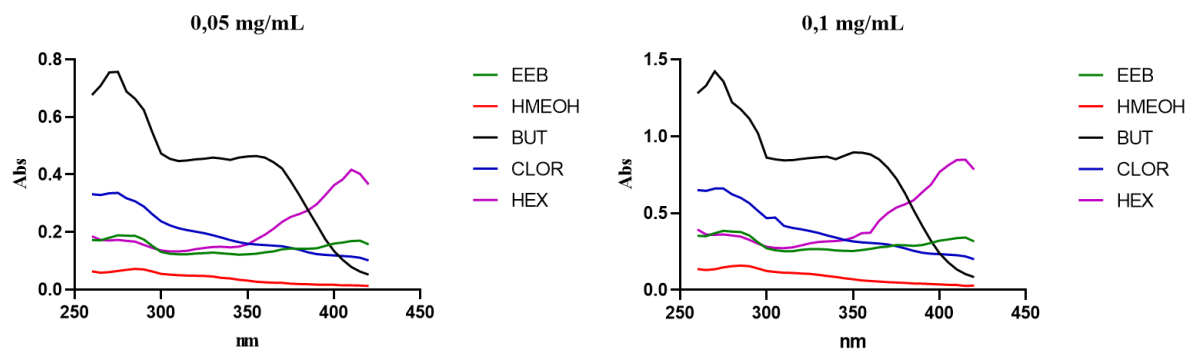
A partir da curva padrão foi obtida a equação da reta ( $y = 0,085x + 0,1233$ ;  $r^2 = 0,9979$ ). A fração butanólica foi a única com teor de flavonoides significativamente mais alto que as demais. Da mesma forma que acontece com os compostos fenólicos, os flavonoides são encontrados em frações de polaridade média a alta, não sendo esperada uma concentração relevante na fração hexânica.

O teor de flavonoides encontrado por SILVA (2020) nas folhas de *H. lupulus* também foi relativamente mais alto do que o encontrado neste trabalho. O teor para o EEB foi de  $0,9659 \pm 0,1276$  mg ER/g amostra, enquanto o da fração hidrometanólica foi de  $4,6712 \pm 0,6747$  mg ER/g amostra. Lembrando que não é possível realizar uma comparação confiável entre as duas frações hidrometanólicas devido aos diferentes fracionamentos, visto que este trabalho realizou outras duas partições partindo da fração hidrometanólica, o que pode ter contribuído para a dispersão dos compostos entre as diferentes frações (SILVA, 2020).

ÜRGEOVÁ e POLÍVKA (2009) analisaram o teor de flavonoides em extratos metanólicos de folhas de *H. lupulus* de diferentes variedades e em diferentes períodos, utilizando a quercetina como padrão. Foram observados os maiores valores durante o ano de 2007, no início do período vegetal, em que o teor esteve entre 2,13 e 6,37 mg flavonoides/g amostra, já no final do período vegetal, ainda em 2007, os valores decresceram e foram obtidos teores entre 0,48 e 0,76 mg flavonoides/g amostra. Desta forma, é possível observar que o período de coleta do material vegetal pode influenciar significativamente no teor de metabólitos secundários encontrados (ÜRGEOVÁ; POLÍVKA, 2009).

### 5.5. Avaliação da absorção na região do UV

Os valores de absorbância obtidos através da varredura em espectrofotômetro na região do UVA e UVB (260 a 400 nm), para as diferentes concentrações de extrato foram plotadas em gráficos, como é possível observar na Figura 5, para facilitar a visualização da atividade de cada extrato em cada concentração diferente ao longo do intervalo da radiação UV.



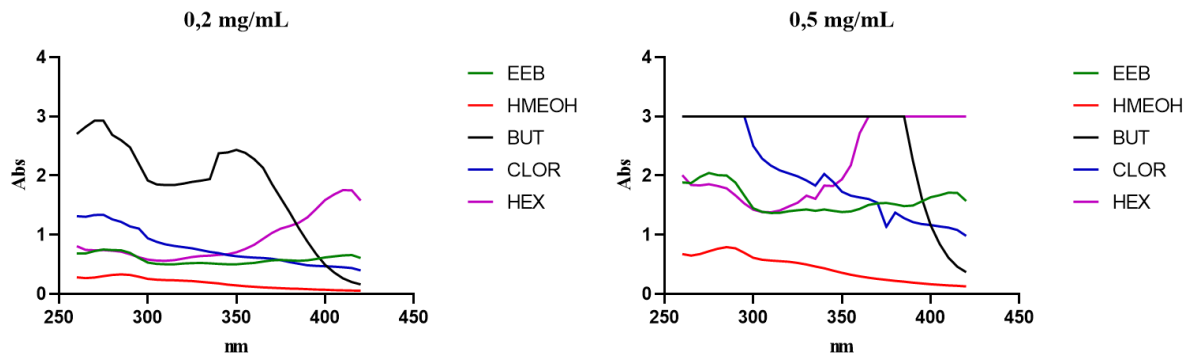


Figura 5: Avaliação da absorção na região do UV do extrato bruto e frações nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL

É possível observar que a fração butanólica apresenta a maior absorção na região do UV, se tornando a fração de maior interesse para incorporação na formulação de protetor solar. No entanto, a fração hexânica mostrou uma interessante absorbância ao final da faixa do UV, compreendendo parte da região UVA e, aparentemente, esta absorção continua alta também na região do visível, desta forma, a associação de ambas as frações em um protetor solar seria interessante para promover uma proteção de amplo espectro, desde que não haja excesso de absorção no espectro da luz visível, o que causa desenvolvimento de cor no produto sendo, às vezes, inconveniente ao usuário.

Não foram encontrados na literatura estudos que envolvem o potencial fotoprotetor do *H. lupulus*. Porém, existem relatos do uso do óleo da semente de *Cannabis sativa*, pertencente à mesma família, como forma de proteção solar de uso tópico por grupos étnicos, oferecendo proteção contra queimaduras solares e pigmentação cutânea (DANGWAL; UNIYAL, 2020).

Flavonoides, taninos, alcaloides, antraquinonas e polifenóis são os metabólitos secundários considerados como protetores solares naturais por serem capazes de proteger as plantas contra danos ao absorverem a radiação UV. Os extratos contendo flavonoides apresentam bom desempenho na proteção solar devido a seus três mecanismos de ação diferentes: absorção na região do UV, ação antioxidante e modulação de várias vias de sinalização. A fração butanólica, que apresentou o melhor desempenho quanto a absorção da radiação UV, é também a fração que apresentou o maior teor de flavonoides e de fenólicos totais em relação às demais frações (NUNES *et al.*, 2018).

É válido ressaltar que os resultados encontrados no estudo demonstram uma capacidade absorptiva de amplo espectro, com a curva se mantendo praticamente constante durante todo o intervalo analisado. Tais resultados são difíceis de serem observados em extratos de outras espécies de plantas, um exemplo é o estudo realizado por RAY, GUPTA e

GOSH (2013), onde foi avaliada a absorção dos extratos de gel de *Aloe vera*, sendo observados três picos de absorção, próximos de 260 nm, 300 nm e 360 nm, com a absorção aumentando na região do UVA, entre 350 nm e 400 nm (RAY; GUPTA; GOSH, 2013).

Mesmo os extratos que não apresentam absorção significativa na região do UV podem ser incorporados em fórmulas cosméticas e atuar tanto como adjuvantes aos filtros solares sintéticos, quanto como ativos que beneficiam a pele, podendo oferecer efeitos antienvhecimento, antioxidante, anti-inflamatório e hidratante (SARKER; NAHAR, 2018).

A partir dos resultados obtidos para os diferentes extratos de concentração 0,2 mg/mL após a leitura nos comprimentos de onda 290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 foi realizado o cálculo do valor de FPS para os extratos a partir da metodologia de MANSUR.

Tabela 11: Valores de FPS calculados para extrato bruto e frações a partir das absorbâncias obtidas na concentração de 0,2 mg/mL.

<b>Extrato</b>	<b>FPS</b>
<b>EEB</b>	5,24
<b>AQU</b>	2,48
<b>BUT</b>	19,06
<b>CLOR</b>	9,06
<b>HEX</b>	5,76

Valores de Fator de Proteção Solar (FPS) encontrados para o extrato etanólico bruto (EEB), fração aquosa (AQUO), fração butanólica (BUT), fração clorofórmica (CLOR) e fração hexânica (HEX).

Conforme resultados apresentados na Tabela 11, foram obtidos valores de FPS satisfatórios para as frações butanólica e clorofórmica, principalmente para a butanólica, que foi significativamente maior que as demais. Para o extrato bruto e frações os valores foram inferiores a 6 e, desta forma, não poderiam ser considerados como fotoprotetores segundo a RDC 30/2012 (BRASIL, 2012).

Apesar de muitos extratos vegetais apresentarem uma certa atividade fotoprotetora devido aos metabólitos secundários produzidos como forma de proteção, nem sempre um extrato será útil para este propósito. SILVA e COSTA (2020) avaliaram a atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato etanólico de *Psidium guajava* e não obtiveram resultados satisfatórios, já que todos os valores de FPS calculados foram inferiores a 6 (SILVA; COSTA, 2020).

## 5.6. Obtenção das formulações do delineamento experimental

A formulação de hidrogel com poloxamer é também estudada por outros projetos do grupo de pesquisa. Em testes anteriores foi verificado uma capacidade máxima de solubilização de 5% de extrato vegetal e, desta forma, esta foi a concentração escolhida para iniciar os testes. Ao verificar-se que era possível também a solubilização desta concentração de extrato bruto de *H. lupulus* e que as características macroscópicas da formulação eram satisfatórias, esta concentração foi mantida no delineamento experimental.

Para a solubilização completa de toda a massa de extrato e poloxamer, foi necessário duas vezes o volume final da formulação com solvente 1:1 álcool etílico absoluto 99,8% e acetona P.A. que foi completamente evaporado após a solubilização, até a formação de um filme polimérico que foi reidratado de forma a obter o hidrogel.

Como o poloxamer não possui uma boa propriedade de adesão e retenção local, o carbopol foi adicionado à formulação como uma tentativa de melhorar a performance de aderência da formulação (FERREIRA, 2019), principalmente devido ao fato de que um protetor solar precisa formar um filme sobre a pele para que se torne uma camada efetiva de proteção contra a radiação.

O polietilenoglicol (PEG) também foi adicionado à formulação por ser um bloco amplamente utilizado em estruturas poliméricas, biocompatível, flexível, altamente solúvel em água, atóxico e útil no revestimento de diferentes tipos de nanopartículas (SANTOS, 2018).

As formulações permaneceram armazenadas em geladeira ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) por 30 dias e todas mantiveram as mesmas características macroscópicas iniciais, com aparência uniforme, sem separação de fases e com completa solubilização do extrato.

## 5.7. Caracterização físico-química das formulações

A caracterização da formulação em termos de tamanho de partícula mostrou uma tendência de redução no tamanho das partículas com o aumento da concentração de poloxamer, como é possível observar na Tabela 12 e Figura 6.

Tabela 12: Caracterização das formulações no tempo de 24 horas

Formulação	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	681,9 ± 9,58	557,6 ± 4,20	117,2 ± 0,40	139,0 ± 16,97	484,8 ± 9,11	405,2 ± 4,96	154,3 ± 3,37	370,5 ± 1,31
<b>Índice de polidispersão (IPD)</b>	0,324 ± 0,05	0,370 ± 0,06	0,861 ± 0,01	0,530 ± 0,05	0,517 ± 0,01	0,579 ± 0,01	0,406 ± 0,04	0,461 ± 0,02
<b>Potencial zeta</b>	-15,0 ± 0,12	-14,4 ± 0,84	-27,3 ± 0,92	-22,4 ± 0,32	-17,3 ± 0,98	-15,6 ± 0,15	-20,4 ± 0,95	-15,7 ± 1,06

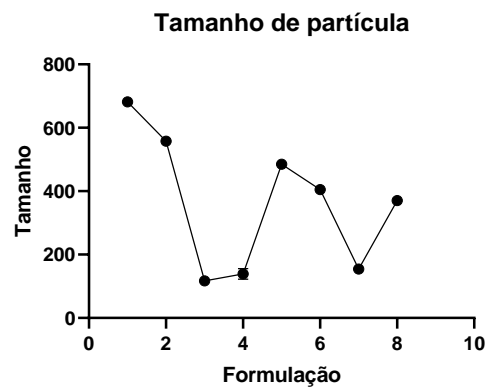


Figura 7: Tamanho de partícula das formulações obtidas pelo desenho experimental no tempo de 24 horas

Para a seleção da formulação conforme os parâmetros estabelecidos pelo delineamento experimental foram avaliados os resultados de tamanho de partícula e IPD após 24 horas. Com o auxílio do software Minitab® foram elaborados os gráficos de superfície representados pelas Figuras 7, 8, 9 e 10 possibilitando uma melhor análise do comportamento das formulações frente às alterações na composição.

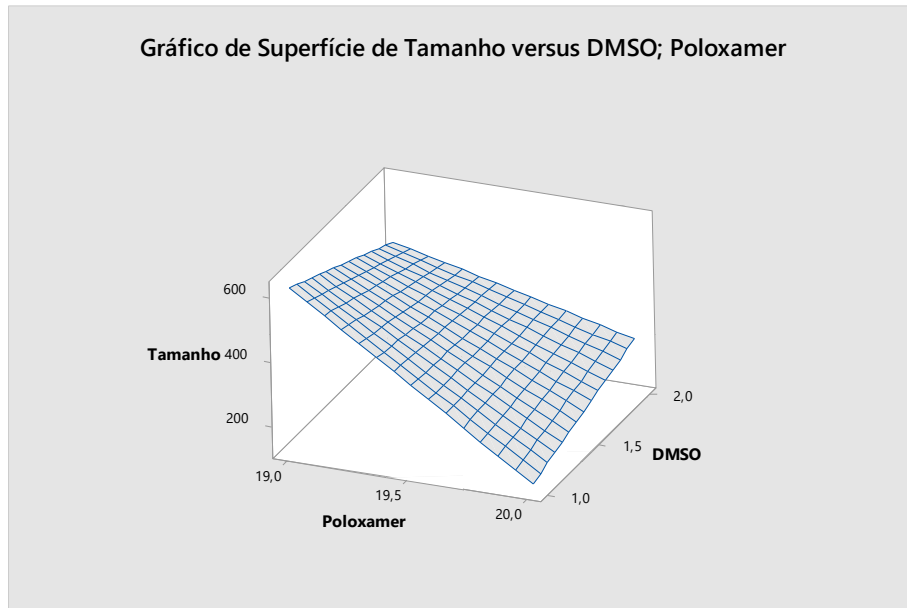


Figura 8: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de DMSO e Poloxamer no tamanho de partícula das formulações.

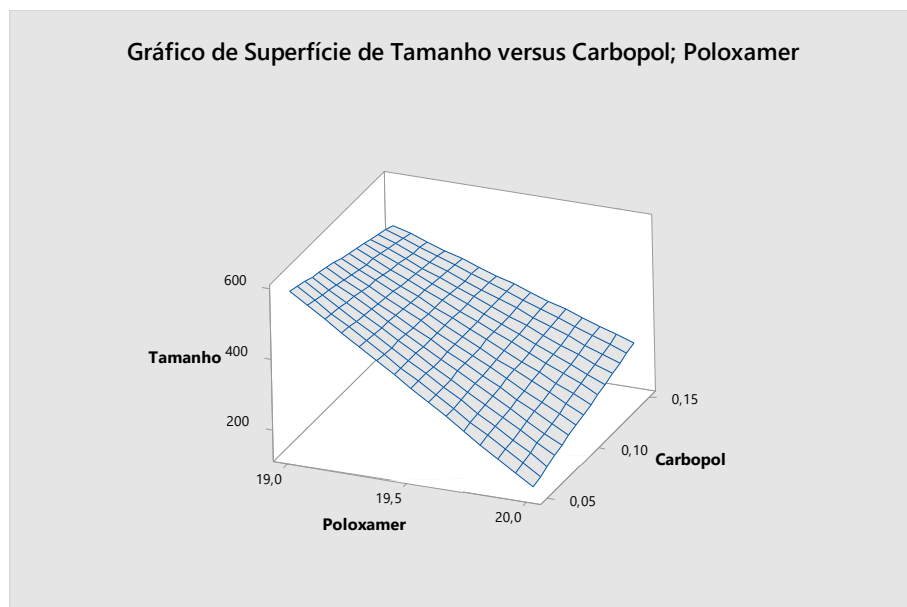


Figura 9: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de Carbopol e Poloxamer no tamanho de partícula das formulações.

Observando os gráficos representados pelas Figuras 8 e 9, é possível avaliar o impacto causado pela variação nas concentrações de poloxamer, DMSO e carbopol no tamanho de partícula das formulações. Nota-se que quanto menor as concentrações de DMSO e carbopol, menor será o tamanho de partícula observado, o contrário, portanto, é observado para a concentração de poloxamer, reduzindo o tamanho de partícula à medida em que sua concentração é aumentada nas formulações. No estudo foram obtidos valores de 117,2 a 681,9



nm para o tamanho de partícula e somente as formulações com 20% de poloxamer apresentaram o comportamento esperado de tamanho de partícula  $< 200$  nm.

Poloxamer é um surfactante não-iônico utilizado para encapsular ativos, sendo capaz de estabilizar suspensões de nanopartículas. ARFAN, ILMIAWATI E SUGITA (2022) avaliaram o impacto da adição de poloxamer 188 em formulações de nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular carregadas com etoricoxib, onde as formulações sem poloxamer obtiveram os maiores tamanhos de partícula médio (796,25 nm), enquanto as formulações com poloxamer apresentaram tamanhos de partícula significativamente menores (178 – 391 nm) (ARFAN; ILMIAWATI; SUGITA, 2022).

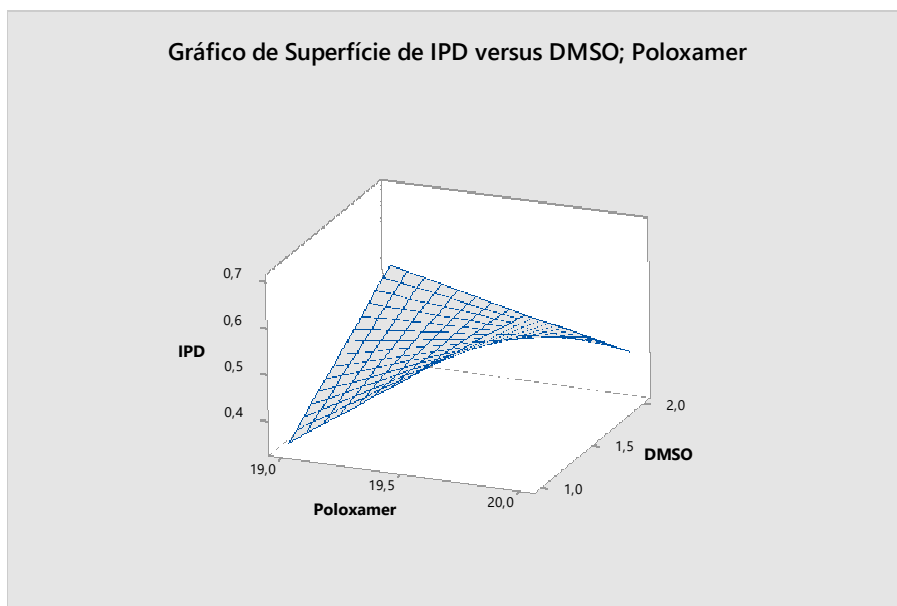


Figura 10: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de DMSO e Poloxamer no Índice de Polidispersão das formulações.

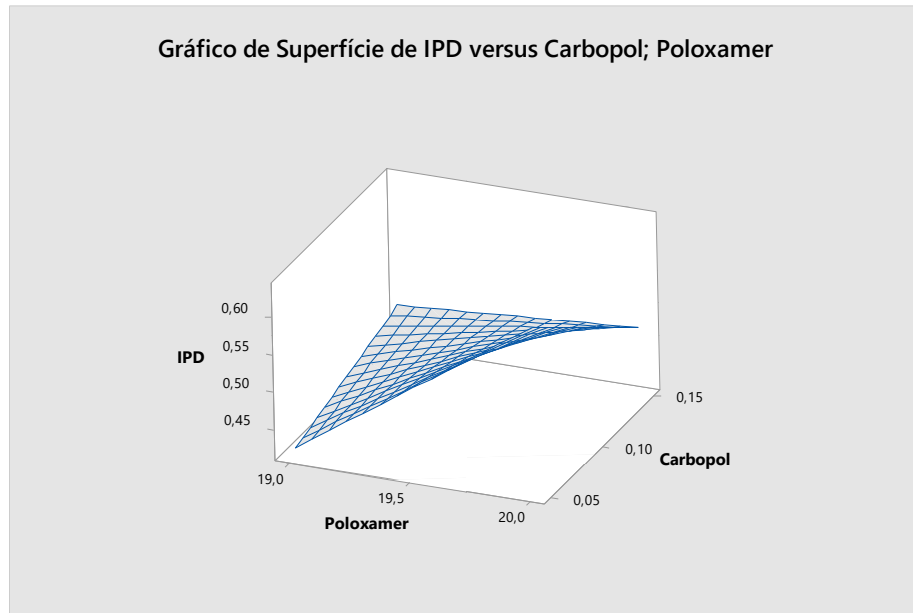


Figura 11: Gráfico de superfície representando o impacto das concentrações de Carbopol e Poloxamer no Índice de Polidispersão das formulações.

A partir das Figuras 10 e 11 é possível observar o impacto das variações nas concentrações de carbopol, DMSO e poloxamer sobre os valores de IPD das partículas da formulação. Nota-se uma correlação entre maiores concentrações de DMSO e carbopol e menores IPDs, ao contrário, as maiores concentrações de poloxamer são responsáveis por maiores índices de polidispersão.

O índice de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade observada na distribuição dos tamanhos de partícula, seus valores podem variar de 0 a 1, com valores próximos de 0 representando menores índices de polidispersão e altos índices observados quando são encontrados valores próximos a 1 (NEMEN; LEMOS -SENN, 2011). Os valores esperados para o hidrogel neste trabalho eram  $<0,5$  para a caracterização de um sistema monodisperso. No delineamento experimental, no entanto, nem todas as formulações apresentaram este comportamento, as formulações com maiores valores de IPD podem apresentar uma maior instabilidade, devido à maior agregação viabilizada pelos diferentes tamanhos de partícula ali presentes.

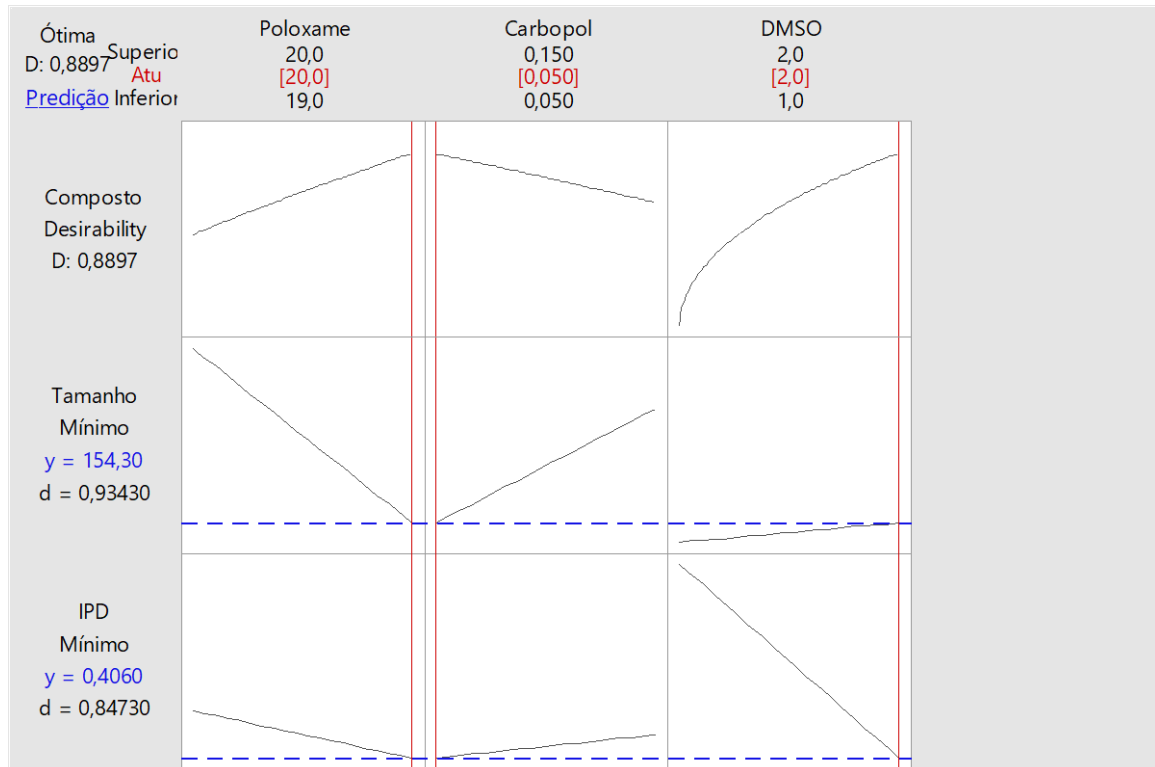


Figura 12: Gráfico de otimização do Delineamento experimental

Pode-se observar, a partir do gráfico de otimização das formulações representado pela Figura 12 obtido pelo software Minitab®, que a formulação de maior estabilidade dentre as variáveis testadas apresenta concentrações de poloxamer igual a 20%, carbopol 0,05% e DMSO 2%, correspondendo aos parâmetros esperados da formulação, com tamanho de partícula <200 nm e índice de polidispersão <0,5.

Tabela 13: Caracterização das formulações no tempo de 7 dias

Formulação	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	1199,0 ± 99,05	1145,0 ± 119,90	502,3 ± 80,39	324,4 ± 81,92	920,2 ± 48,88	788,5 ± 9,36	169,7 ± 3,46	624,4 ± 14,12
<b>Índice de polidispersão (IPD)</b>	0,242 ± 0,038	0,270 ± 0,015	0,722 ± 0,236	0,626 ± 0,117	0,416 ± 0,083	0,460 ± 0,110	0,384 ± 0,024	0,456 ± 0,038
<b>Potencial zeta</b>	-16,8 ± 1,070	-14,7 ± 0,289	-26,3 ± 2,190	-24,9 ± 1,820	-18,3 ± 0,802	-18,9 ± 1,880	-19,9 ± 3,040	-17,6 ± 0,306

A partir do acompanhamento das características da formulação no tempo de 7 dias, foi possível observar uma grande agregação das partículas, impactando diretamente no tamanho

de partícula observado, bem como no desvio padrão da análise. Por ser uma característica comumente encontrada no gel de carbopol, devido a seu grande peso molecular (de aproximadamente 3500000 daltons) e capacidade de intumescimento dependente do pH do meio (IGLESIAS, 2003), foram selecionadas duas formulações e realizados os testes de tamanho de partícula e IPD com as respectivas diluições centrifugadas a 9.000 rpm por 15 minutos, nas quais foram observadas reduções significativas (aproximadamente 35%) no tamanho de partícula das formulações avaliadas. Foram avaliadas também uma formulação sem carbopol, dois brancos relativos à mesma composição da formulação, com as duas diferentes concentrações de carbopol testadas e duas soluções contendo apenas carbopol e água destilada, conforme representação na Tabela 14 e Figura 13, onde é possível observar uma correlação direta entre o aumento da concentração de carbopol nas formulações e o respectivo aumento nos tamanhos de partícula.

Tabela 14: Avaliação do impacto do carbopol no tamanho de partícula da formulação

	<b>Formulação EEB</b>	<b>Branco 0,05% carbopol</b>	<b>Branco 0,15% carbopol</b>	<b>Solução carbopol 0,05%</b>	<b>Solução carbopol 0,15%</b>
<b>Tamanho de partícula</b>	144,6 ± 28,59	149,6 ± 83,85	456,8 ± 499,20	224,8 ± 40,85	664,1 ± 158,80
<b>IPD</b>	0,372 ± 0,040	0,317 ± 0,043	0,571 ± 0,297	0,282 ± 0,055	0,615 ± 0,040
<b>Potencial zeta</b>	-16,2 ± 2,48	-16,8 ± 8,86	-28,7 ± 4,92	-28,8 ± 7,07	-26,7 ± 10,50

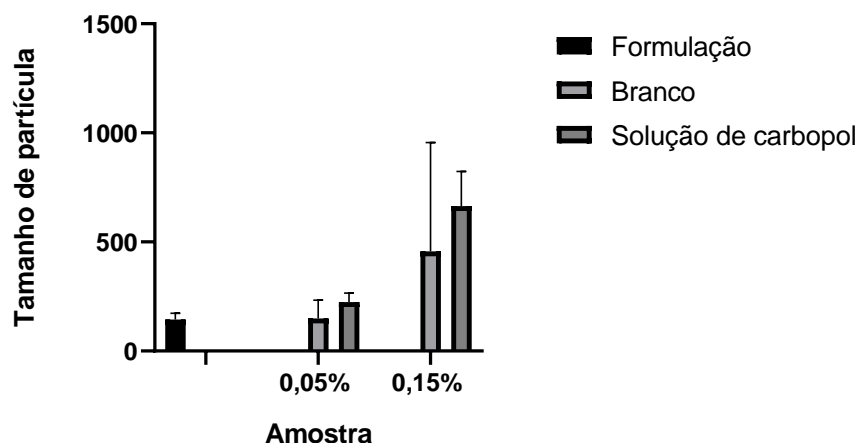


Figura 13: Comparativo entre os tamanhos de partícula da formulação de EEB sem carbopol, os brancos da formulação contendo 0,05% e 0,15% de carbopol e soluções aquosas contendo 0,05% e 0,15% de carbopol, evidenciando o impacto da concentração de carbopol no tamanho de partícula da formulação.

O potencial zeta é uma propriedade que mede o potencial eletrocinético de sistemas coloidais, sendo calculado a partir da diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária ligada à partícula dispersa. Seu valor pode estar relacionado com a estabilidade das dispersões coloidais, indicando o grau de dispersão entre as partículas adjacentes e carregadas em uma dispersão. Um alto valor de potencial zeta confere uma maior estabilidade à formulação e um valor mais baixo reflete uma maior atração entre as partículas, tendendo a coagular ou flocular. Quando os valores encontrados são iguais ou maiores que  $\pm 30$  mV os sistemas são estáveis em tamanho e carga (MAYORAL; MORENO; MARTÍN-MARTÍNEZ, 2014).

Os valores de potencial zeta obtidos durante o delineamento experimental se encontraram entre -14,4 a -27,3 mV, com grande parte das formulações com valores bem abaixo de  $\pm 30$  mV. Os géis poliméricos são compostos por uma rede tridimensional, o que faz com que as partículas ali dispersas se mantenham estáveis por um longo período devido ao movimento browniano ou interações entre os constituintes da formulação, sem apresentar sedimentação ou floculação. Portanto, mesmo que o potencial zeta seja um fator importante para a estabilidade das soluções coloidais, tais valores não representam um aspecto crítico (BENOSO, 2021).

### **5.8. Obtenção da formulação de interesse**

Após a otimização da formulação, foi selecionada a formulação de número 7, segundo a Tabela 12 e preparada em duas versões, contendo extrato etanólico bruto exatamente como a utilizada no delineamento experimental e uma segunda versão contendo fração butanólica, por ser a fração que apresentou o melhor desempenho nos testes anteriores. Entretanto, o rendimento da fração butanólica durante o fracionamento foi muito baixo, por esta razão, o delineamento experimental para a escolha da formulação foi realizado com o extrato bruto. Foram obtidos os resultados de tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para os tempos de 24 horas e 7 dias como pode ser observado na Tabela 15:

Tabela 15: Valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta para as formulações de EEB e BUT nos tempos de 24 horas e 7 dias.

	Formulação EEB		Formulação BUT	
	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias
<b>Tamanho de partícula</b>	188,80 ± 20,81	325,80 ± 63,07	36,61 ± 9,14	37,28 ± 11,13
<b>IPD</b>	0,437 ± 0,080	0,623 ± 0,081	0,198 ± 0,047	0,273 ± 0,085
<b>Potencial zeta</b>	-13,1 ± 1,950	-16,6 ± 0,862	- 13,3 ± 0,814	-13,6 ± 2,740

Apesar da estratégia utilizada ter sido a realização do delineamento experimental apenas com o extrato bruto devido ao baixo rendimento da fração butanólica, já era esperado que houvesse uma diferença significativa entre as formulações devido aos diferentes componentes em cada extrato. O extrato bruto contém uma série de compostos que durante a separação tiveram afinidade por outros solventes, ou seja, desde compostos de alta polaridade até compostos apolares, de difícil solubilização. Já a fração butanólica apresenta apenas componentes de média a alta polaridade.

No momento de reidratação do filme polimérico e formação da solução micelar, os compostos de baixa polaridade e apolares são aprisionados no interior das micelas de poloxamer (FERREIRA, 2019), como existem maiores quantidades destas substâncias no extrato etanólico bruto, as partículas formadas apresentam um tamanho mais elevado. Ao contrário do que ocorre com a formulação butanólica, que apresenta compostos polares, solúveis no veículo e que não serão aprisionados no interior das micelas, contribuindo para os menores tamanhos de partícula observados.

Porém, acredita-se que a redução do tamanho de partícula seja capaz de direcionar os ativos para os folículos pilosos e aumentar a penetração na pele (MATOS, 2014). Desta forma, apesar de a formulação com a fração butanólica apresentar um maior valor de FPS *in vitro*, seriam necessários testes cutâneos para avaliação da fotoproteção, já que a penetração das partículas na pele poderia reduzir a barreira formada na pele capaz de absorver a radiação ultravioleta. De qualquer forma, a redução do tamanho de partícula e consequente absorção pela pele pode ser capaz de aumentar a eficácia antioxidante e de certa forma auxiliar indiretamente no combate aos danos da radiação UV (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICCOLO, 2007).

### 5.9. Teste de centrifugação

Após o teste de centrifugação não foi possível observar alterações visíveis em ambas as formulações testadas. A coloração permaneceu a mesma e não houve precipitação do extrato incorporado ou separação de fases da formulação, indicando que não houve instabilidade nas formulações neste período. Como a centrifugação foi realizada em temperatura ambiente, houve a gelificação da amostra, como pode ser observado na Figura 14 a seguir:

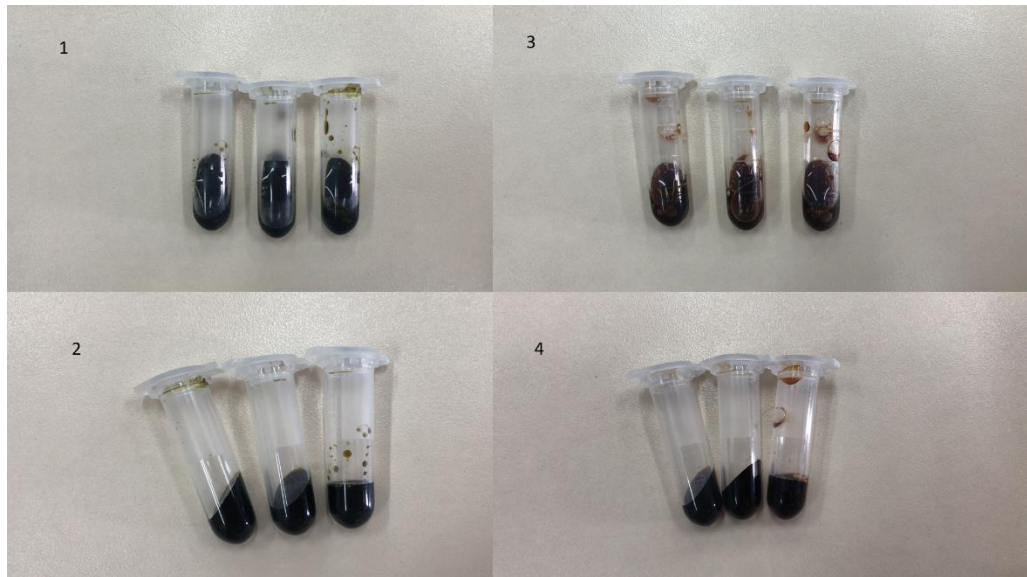


Figura 14: As imagens 1 e 3 retratam as formulações de extrato bruto e fração butanólica, respectivamente, antes da centrifugação, logo após serem retiradas da geladeira. As imagens 2 e 4 retratam as formulações de extrato bruto e fração butanólica, respectivamente, após a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos.

### 5.10. Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS)

De acordo com a RDC n ° 30 de 01 de junho de 2012, para um produto ser considerado um protetor solar deve apresentar um FPS de no mínimo 6 (BRASIL, 2012).

As análises de FPS neste estudo foram realizadas seguindo a concentração proposta por MANSUR *et al.* (2016) para a eficácia de formulações contendo extratos vegetais, onde avaliaram a associação de extratos antioxidantes a formulações contendo filtros solares. Observaram o aumento do FPS *in vitro* nas formulações com extratos vegetais quando em comparação com a formulação contendo somente filtros sintéticos (MANSUR *et al.*, 2016). A curva de absorbância x comprimento de onda e os valores de FPS obtidos estão apresentados na Figura 15 e Tabela 16.

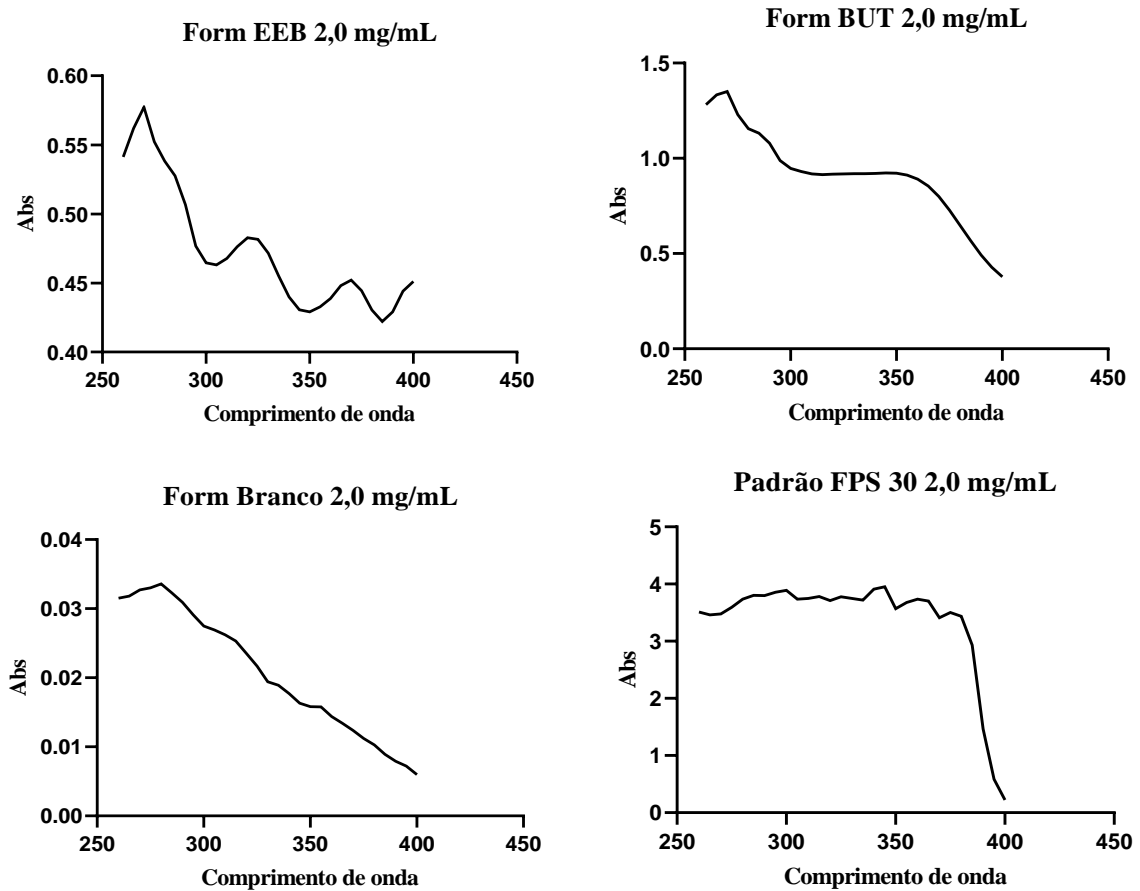


Figura 15: Absorbâncias das formulações de extrato etanólico bruto e fração butanólica e padrão na concentração de 2,0 mg/mL no intervalo de comprimento de onda de 260 a 400 nm. Onde Form EEB (formulação de extrato etanólico bruto), Form BUT (formulação butanólica), Form branco (formulação branco).

Tabela 16: Valores de FPS obtidos através de espectrofotometria para as formulações de extrato etanólico bruto e fração butanólica, branco e solução padrão.

<b>Formulação</b>	<b>FPS</b>
EEB 2,0 mg/mL	4,68
BUT 2,0 mg/mL	9,38
Branco 2,0 mg/mL	0,27
Padrão 2,0 mg/mL	37,97

Considerando a definição da RDC 30/2012 para um protetor solar, apenas a formulação produzida a partir da fração butanólica pode ser considerada fotoprotetora por apresentar um FPS de 9,38. A formulação obtida a partir do extrato bruto, apesar de também apresentar uma certa absorbância na região do UV, não pode ser considerada um fotoprotetor devido ao valor de FPS encontrado ser menor que 6,0 (BRASIL, 2012).



Esta diferença de FPS entre as duas formulações já era esperada devido aos resultados encontrados nos demais ensaios, com a fração butanólica apresentando concentrações significativamente maiores de compostos fenólicos e flavonoides, que são capazes de absorver na região do UV e, conseqüentemente, aumentam a performance desta fração em relação às demais (NUNES *et al.*, 2018).

Apesar de a formulação de extrato bruto não ser considerada um protetor solar, sua associação a outros filtros solares pode ser vantajosa, contribuindo para o aumento do valor de FPS e agregando outras funções ao produto devido à composição diversificada dos extratos vegetais. Assim como esta associação seria vantajosa também para a formulação da fração butanólica, para a obtenção de formulações com alto FPS, como pode ser observado em outros estudos a partir de extratos naturais.

MUNHOZ *et al.* (2012) analisaram o potencial fotoprotetor dos extratos da flora brasileira *Guazuma ulmifolia*, *Maytenus ilicifolia*, *Stryphnodendron adstringens* e *Trichilia catigua* e identificaram importante atividade antioxidante, assim como muitos outros extratos vegetais ricos em compostos fenólicos que vem sendo estudados, porém não avaliaram atividade nos extratos avaliados que os configurem como ativos fotoprotetores, sugerindo o uso em associação à filtros sintéticos como uma forma de reduzir sua concentração de uso e potencializar os efeitos (MUNHOZ *et al.*, 2012).

Os metabólitos secundários presentes nas plantas possuem estruturas químicas similares às estruturas químicas dos filtros solares sintéticos e por este motivo são capazes de absorver a radiação na região do UV. Uma das alternativas para reduzir o uso de filtros sintéticos é a associação em sinergismo com filtros naturais, que são capazes de potencializar a atividade fotoprotetora e antioxidante dos produtos. AGUIAR e NOVELLI (2020) avaliou a associação de um gel com atividade fotoprotetora FPS 8,81 com gel de curcumina 0,25% e 0,5% e obtiveram os FPSs 9,1 e 11,76, respectivamente (AGUIAR; NOVELLI, 2020).

Vários estudos vêm mostrando a capacidade de produtos naturais aumentarem os valores de FPS ao serem adicionados a formulações, sendo os extratos, em muitos casos indicados para complementar formulações fotoprotetoras devido à propriedade absorviva da radiação UV. Muitos desses extratos, ricos em polifenóis e flavonoides, atribuem propriedades multifuncionais aos produtos (HAILUN *et al.*, 2021).

### 5.11. Razão UVA/UVB

Foi utilizado o software Graphpad Prism<sup>®</sup> para calcular a área sob a curva das curvas UVA (320 – 400 nm) e UVB (290 – 320 nm), as razões entre elas estão expressas na Tabela 17.

Tabela 17: Razão da proteção UVA/UVB para as formulações testadas

<b>Formulação</b>	<b>UVA/UVB</b>
<b>Form BUT</b>	2,20
<b>Form EEB</b>	2,50
<b>Padrão</b>	2,35

Onde Form BUT (formulação butanólica), Form EEB (formulação de extrato etanólico bruto).

Segundo o Sistema Boot's Star de classificação, relacionando as duas curvas, pode-se observar que todas as formulações apresentaram um grande potencial de proteção na região do UVA, já que a razão obtida foi  $> 0,9$ , sendo descrita como ultra proteção e classificada como 5 estrelas (\*\*\*\*\*) (SILVA, 2017).

ZOCOLER *et al.* (2019) encontraram um FPS de 7,02, razão UVA/UVB 0,1461 e comprimento de onda crítico de 325,09 nm para creme contendo 20% de extrato de umbucajá, na concentração de 2,0 mg/mL, ou seja, obtiveram um produto com proteção UVA muito baixa, não sendo caracterizado como um produto de amplo espectro. Nota-se que nas mesmas concentrações de análise, porém com a formulação contendo diferentes quantidades de extrato, este trabalho apresentou resultados mais satisfatórios para a formulação butanólica em relação ao valor de FPS e proteção UVA (ZOCOLER *et al.*, 2019).

Já FARIAS *et al.* (2017), avaliaram os valores de FPS e razão UVA/UVB do extrato bruto, frações e óleos essenciais de galhos e folhas de *Aniba canelilla*, encontraram valores de FPS variando de 5,49 a 122,60 e razão UVA/UVB variando entre 0,44 e 4,19, representando formulações com boa a ultra proteção UVA. O extrato etanólico bruto das folhas de *A. canelilla* apresentou um FPS de 42,8 com razão UVA/UVB de 2,82, neste caso a proteção foi superior tanto ao extrato bruto puro quanto à formulação obtida neste trabalho (FARIAS *et al.*, 2017).

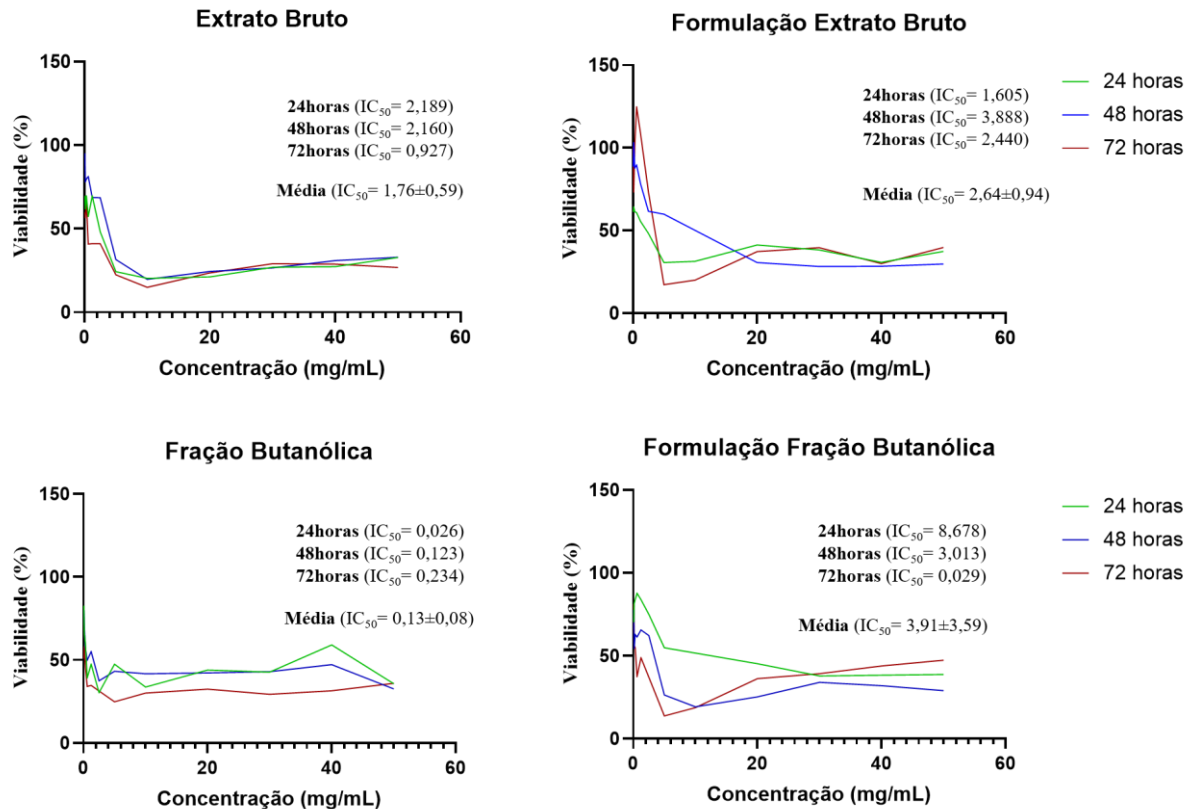
### 5.12. Avaliação da citotoxicidade do extrato e formulações

O uso de produtos à base de plantas é muito comum, principalmente no Brasil, onde existe uma enorme biodiversidade, além de ser um ambiente propício para o cultivo de plantas exóticas. Estes produtos podem trazer diversos benefícios devido a suas inúmeras

propriedades. No entanto, é preciso garantir que estes extratos são seguros para o uso proposto, sem causar irritação, sensibilidade ou outros danos à saúde. Com esta finalidade, foi realizado um estudo de citotoxicidade em fibroblastos murinos, de forma a avaliar a capacidade dos extratos e formulações utilizados de provocar danos ou quaisquer alterações fisiológicas nas células durante o estudo (MORENO, 2018).

Testes de citotoxicidade em culturas celulares são importantes por demonstrarem como determinadas linhagens celulares se comportam na presença de agentes externos, possibilitando a análise da atuação destas substâncias em diferentes tecidos do corpo, ou seja, é possível prever sua atividade em diferentes tecidos, principalmente nas membranas celulares com boa sensibilidade, reprodutibilidade e custo acessível (WERKMAN, 2009).

Durante o teste, o corante SRB se liga às proteínas das células viáveis, sua concentração é medida através da absorbância dos poços e o resultado final é expresso em IC50, ou seja, a concentração da amostra que é capaz de inibir o crescimento celular em 50% em relação à quantidade inicial de células (NADAL; KANUFRE, 2019). Foi avaliada a resposta das células frente às amostras nos períodos de 24, 48 e 72 horas, como pode ser observado na Figura 5.



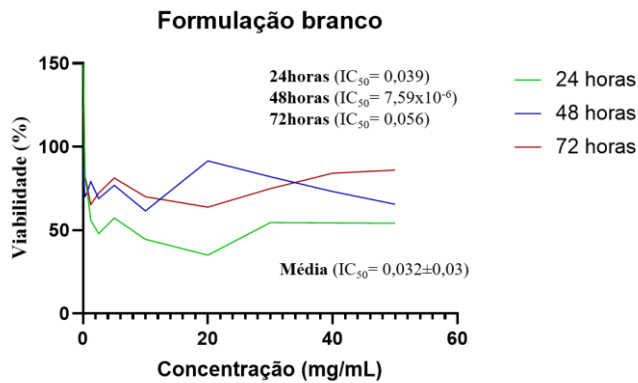


Figura 6: Gráficos representando a curva de viabilidade celular conforme a concentração em mg/mL para o extrato bruto e formulação, fração butanólica e formulação e formulação branco, nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

As curvas realizadas obtinham concentrações de até 50 mg/mL de extrato ou fração, tanto para as amostras puras quanto para as formulações, onde a quantidade calculada para utilização no ensaio foi baseada na concentração de extrato ali presente.

A concentração média de  $IC_{50}$  para o extrato etanólico bruto foi de  $1,76 \pm 0,59$  mg/mL, enquanto para a formulação contendo o mesmo extrato foi de  $2,64 \pm 0,94$  mg/mL. Sendo assim, é possível observar que a formulação foi capaz de alterar a atividade citotóxica do extrato, conferindo uma certa proteção às células, já que foi necessária uma maior concentração da formulação para comprometer a viabilidade de 50% das células testadas. Outro dado importante em questão é a alteração dos valores de  $IC_{50}$  para cada tempo de teste, para o extrato bruto, foi possível observar uma redução da concentração de  $IC_{50}$  à medida em que o tempo de exposição aumentava, indicando uma maior citotoxicidade. Já para a formulação, foi observado o aumento da concentração de  $IC_{50}$  com o tempo de exposição, indicando uma adaptação celular à presença da formulação. Acredita-se que tal fato ocorra devido ao encapsulamento do extrato nas micelas e liberação mais lenta para o meio, possibilitando esta adaptabilidade e menor citotoxicidade.

A fração butanólica, no entanto, foi significativamente mais citotóxica que o extrato bruto, com concentração média de  $IC_{50}$  de  $0,13 \pm 0,08$  mg/mL, possivelmente devido à maior concentração de metabólitos secundários devido ao processo de fracionamento. Neste caso, foi observada uma maior citotoxicidade a princípio e uma adaptação à fração, com menor citotoxicidade no tempo de 72 horas. A formulação butanólica, no entanto, foi menos citotóxica que a formulação de extrato bruto, com uma concentração média de  $IC_{50}$  de  $3,91 \pm 3,59$  mg/mL, porém, com um comportamento contrário à própria fração, a princípio a concentração de  $IC_{50}$  foi de 8,68 mg/mL e com a liberação da fração e maior tempo de

contato ocorreu uma diminuição significativa desta concentração, com citotoxicidade equivalente à fração butanólica pura.

É possível observar também que a associação do extrato e fração à formulação é vantajosa. A formulação diminui a citotoxicidade dos extratos ao possibilitar a liberação lenta dos metabólitos e estes mesmos metabólitos são capazes de conferir uma certa proteção às células. O poloxamer adicionado à formulação pode se comportar como um surfactante, em soluções diluídas sofre um processo de micelização, formando agregados com núcleos hidrofóbicos e cadeias superficiais hidrofílicas (NEVES, 2019). Uma possibilidade para a maior citotoxicidade da formulação branco é a micelização de componentes hidrofóbicos presentes na membrana celular e consequente comprometimento da viabilidade celular.

Apesar de os valores de IC<sub>50</sub> terem sido encontrados nas concentrações iniciais da curva testada, estes resultados são comumente observados em testes de viabilidade celular com extratos vegetais. QUEIROZ (2018) encontrou o IC<sub>50</sub> de  $200,6 \pm 0,09$  µg/mL para o extrato bruto de *Equisetum* com a metodologia de viabilidade celular por redução por MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] no tempo de 48 horas, concentração esta significativamente inferior à concentração de IC<sub>50</sub> encontrada para o extrato bruto de *Humulus lupulus* neste estudo (QUEIROZ, 2018).

### 5.13. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e formulações

A geração de radicais livres no organismo está ligada ao aparecimento de doenças, incluindo o câncer, fontes vegetais ricas em polifenóis são capazes prevenir a formação destes radicais livres e desempenhar uma importante atividade antioxidante benéfica para a saúde (SRIDHAR; CHARLES, 2019).

Os grupos hidroxila conjugados a um hidrocarboneto aromático estão relacionados à capacidade antioxidante de compostos fenólicos e flavonoides, tendo uma maior ou menor atividade a depender do número e posição destes grupos. ALMEIDA *et al.* (2020) encontraram uma alta atividade antioxidante para extratos de lúpulo e correlacionaram aos principais flavonoides identificados, como isoquercetrina, quercetina, xantohumol, entre outros (ALMEIDA *et al.*, 2020).

O ensaio antioxidante pelo método do radical livre DPPH foi desenvolvido por Blois em 1958 e é baseado na medição do decréscimo do radical livre estável  $\alpha$ ,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil, que leva a uma mudança na coloração e decréscimo da absorbância a 518 nm (DPPH) (SILVA, 2020).

O DPPH é caracterizado como um radical livre devido à deslocalização dos elétrons em sua molécula, que dá origem a uma coloração violeta escura. Na presença de substâncias antioxidantes, a doação de elétrons estabiliza a molécula, provocando uma perda na intensidade da coloração violeta e possibilitando a leitura da absorbância por espectrometria (KEDARE; SINGH, 2011).

O método de sequestro de radicais ABTS permite a determinação do poder antioxidante de substâncias hidrofílicas e lipofílicas devido a sua solubilidade em água e solventes orgânicos (MUNTEANU; APETREI, 2021).

Na determinação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *H. lulupus* e formulações pelos métodos DPPH e ABTS foram obtidos os seguintes resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, representados na Tabela 18:

Tabela 18: Valores de IC50 obtidos para extrato bruto, frações e formulações encontrados pelos métodos de eliminação dos radicais DPPH e ABTS.

<b>Amostra</b>	<b>CI50 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	
	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>
<b>Rutina</b>	1,91 $\pm$ 0,04	4,19 $\pm$ 0,30
<b>EEB</b>	19,00 $\pm$ 1,24	18,21 $\pm$ 0,32
<b>Form EEB</b>	10,74 $\pm$ 0,66	3,46 $\pm$ 2,31
<b>AQUO</b>	4,85 $\pm$ 2,23	18,76 $\pm$ 0,37
<b>BUT</b>	24,72 $\pm$ 0,87	6,86 $\pm$ 0,14
<b>Form BUT</b>	10,85 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,01
<b>CLOR</b>	9,22 $\pm$ 1,43	4,28 $\pm$ 0,14
<b>HEX</b>	57,69 $\pm$ 20,99	19,35 $\pm$ 2,35

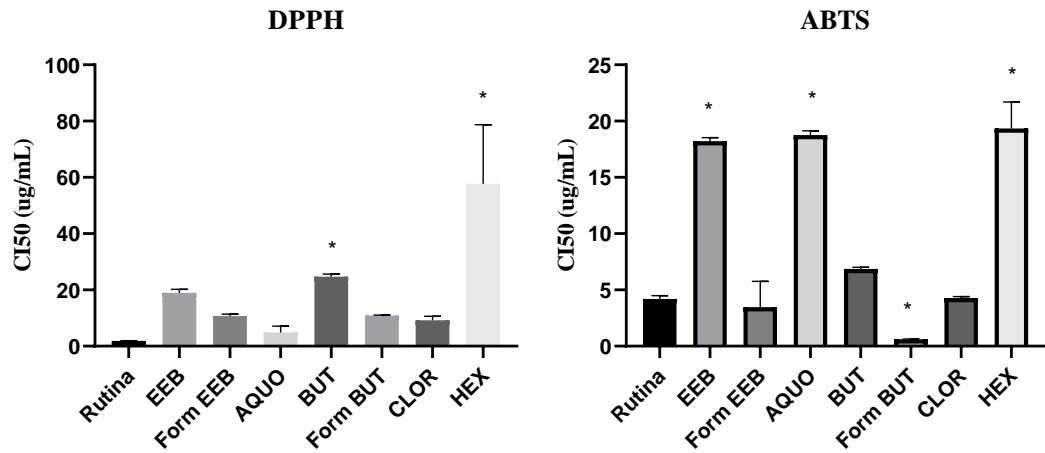


Figura 16: Gráfico de barras representando os valores de CI50 obtidos para o extrato bruto, frações e formulações derivadas do *H. lupulus*, em que as siglas representam, respectivamente, EEB (extrato etanólico bruto), Form EEB (formulação de extrato etanólico bruto), AQUO (fração aquosa), BUT (fração butanólica), Form BUT (formulação butanólica), CLOR (fração clorofórmica) e HEX (fração hexânica). O “\*” acima das colunas indica uma amostra com diferença estatisticamente significativa quando comparada ao padrão rutina.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism<sup>®</sup>, utilizando o teste *One way* ANOVA e foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras tanto pelo método DPPH quanto pelo método ABTS, em seguida as amostras foram avaliadas pelo pós teste de *Tukey*, foram avaliadas as diferenças significativas, a nível de 5% entre as amostras, conforme demonstrado na Tabela 19.

Tabela 19: Diferença significativa a um nível de 5% avaliada para as amostras analisadas em relação às diferentes amostras.

<b>Diferença significativa (P &lt; 0,05)</b>		
	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>
<b>EEB versus</b>		
<b>Form EEB</b>	Não	Sim
<b>AQUO</b>	Não	Não
<b>BUT</b>	Não	Sim
<b>Form BUT</b>	Não	Sim
<b>CLOR</b>	Não	Sim
<b>HEX</b>	Sim	Não
<b>Form EEB versus</b>		
<b>AQUO</b>	Não	Sim
<b>BUT</b>	Não	Sim
<b>Form BUT</b>	Não	Não
<b>CLOR</b>	Não	Não
<b>HEX</b>	Sim	Sim
<b>AQUO versus</b>		
<b>BUT</b>	Não	Sim
<b>Form BUT</b>	Não	Sim
<b>CLOR</b>	Não	Sim
<b>HEX</b>	Sim	Não
<b>BUT versus</b>		
<b>Form BUT</b>	Não	Sim
<b>CLOR</b>	Não	Não
<b>HEX</b>	Não	Sim
<b>Form BUT versus</b>		
<b>CLOR</b>	Não	Sim
<b>HEX</b>	Sim	Sim
<b>CLOR versus</b>		
<b>HEX</b>	Sim	Sim

Nota-se que não houve diferença significativa entre a atividade antioxidante do Extrato Bruto (EEB), frações aquosa (AQUO) e clorofórmica (CLOR) e formulações (Form EEB e Form BUT) em relação ao padrão rotina, pelo método do radical DPPH, indicando atividade antioxidante semelhante entre elas. Diferentemente do que foi observado para as frações butanólica (BUT) e hexânica (HEX), onde houve diferenças significativas entre os resultados obtidos e o padrão analisado, indicando uma menor capacidade de reduzir o radical livre DPPH.



Pela metodologia de sequestro dos radicais ABTS foi observado que não houve diferença significativa, a um nível de 5%, para a formulação de extrato etanólico bruto (Form EEB) e frações butanólica (BUT) e clorofórmica (CLOR), com valores de CI50 de  $3,46 \pm 2,31 \mu\text{g/mL}$ ,  $6,86 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$  e  $4,28 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para a formulação butanólica (Form BUT), no entanto, houve diferença significativa, porém, nota-se que o valor de CI50 neste caso, foi significativamente menor que o valor obtido para o padrão, sendo  $0,62 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$  e  $4,19 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, ou seja, a formulação butanólica apresentou uma atividade antioxidante ainda maior que a da rutina. Para as demais amostras que apresentaram diferenças significativas, entretanto, os valores de CI50 foram consideravelmente maiores que o do padrão, indicando uma menor atividade antioxidante.

A partir das análises demonstradas na Tabela 19, é possível observar também que não existem diferenças estatisticamente significativas na atividade antioxidante tanto pelo método DPPH quanto pelo método ABTS entre as duas formulações desenvolvidas neste estudo, utilizando o extrato etanólico bruto e a fração butanólica, ou seja, ambas as formulações apresentaram potencial antioxidante equivalente, mesmo com as diferenças estatísticas observadas entre a atividade antioxidante dos extratos pela metodologia do radical DPPH.

Nota-se, no entanto, diferenças significativas entre o extrato bruto e fração butanólica e suas respectivas formulações, para as duas metodologias, com uma diminuição do IC50 para as formulações, ou seja, houve um aumento na atividade antioxidante dos extratos com a incorporação na formulação. Segundo OLIVEIRA (2020), as nanoformulações são capazes de aumentar a solubilidade do extrato no meio e também potencializar o efeito antioxidante dos extratos, como observaram no extrato de carotenoides de melão cantaloupe (*Cucumis melo* L.) nanoencapsulado (OLIVEIRA, 2020).

Na literatura, foram encontrados estudos avaliando o potencial antioxidante dos extratos de inflorescência de lúpulo e os resultados de CI50 obtidos pelo método DPPH mostraram concentrações na faixa de 124,25 a 342,29  $\mu\text{g/mL}$  e de 192,41 a 324,60  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos etanólicos e aquosos, respectivamente, com resultados semelhantes para o método do radical ABTS (LYU *et al.*, 2022).

ALMEIDA *et al.* (2020) encontraram valores de CI50 de  $3,91 \pm 0,17 \mu\text{L/mL}$  e  $5,79 \pm 0,05 \mu\text{L/mL}$  para extratos da inflorescência de lúpulo originários do Brasil e dos Estados Unidos, respectivamente, pelo método do radical DPPH, indicando uma boa atividade antioxidante destes extratos (ALMEIDA *et al.*, 2020).

#### 5.14. Correlação entre atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e flavonoides totais

O coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) para a correlação entre as metodologias antioxidantes pelos radicais DPPH e ABTS foi de 0,1143, indicando uma correlação fraca entre elas e não significativa ( $P > 0,05$ ). Tal fato demonstra que diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos entre os compostos antioxidantes presentes nas amostras e os reagentes utilizados em cada metodologia, justificando os diferentes resultados observados e a baixa correlação entre as duas metodologias (DUARTE *et al.*, 2014). Desta forma, nota-se uma maior capacidade das formulações de extrato bruto e fração butanólica sequestrarem radicais livres pelo método ABTS, onde apresentaram menores valores de CI50.

Tabela 20: Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante (ABTS e DPPS) e os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais encontrados nas amostras.

	ABTS		Correlação $r$	DPPH		
	R	P		P	Correlação	
<b>Fenólicos Totais</b>	-0,3750	0,1692	Fraca negativa	0,5179	0,0506	Fraca
<b>Flavonoides Totais</b>	-0,6893	0,0057	Moderada negativa	-0,02143	0,9438	Fraca negativa

Onde o valor de  $r$  é o coeficiente de correlação de Spearman;  $p$  é a significância estatística ( $p < 0,05$ ) e a classificação de correlação  $0,0 \leq r < 0,5$ : fraca;  $0,5 \leq r < 0,7$ : moderada;  $0,7 \leq r \leq 1,0$ : forte;  $-0,0 \leq r \leq -0,5$ : fraca negativa;  $-0,5 \leq r \leq -0,7$ : moderada negativa;  $-0,7 \leq r \leq -1,0$ : forte negativa, conforme modificações realizadas por COSTA (2017) para as classificações de MUKAKA (2012).

Segundo a Tabela 20, foram observadas correlações fracas entre as metodologias antioxidantes e os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, não sendo possível atribuir esta atividade à concentração observada dos metabólitos secundários. Com exceção da correlação moderada entre flavonoides e o potencial antioxidante pela metodologia ABTS, que mostrou as frações com maiores concentrações destes compostos apresentando uma maior capacidade de sequestro de radicais livres.

Valores negativos para o coeficiente de correlação de Spearman indicam que as variáveis são inversamente relacionadas, ou seja, à medida que uma variável tende a aumentar, o valor da outra tende a diminuir. Tal comportamento é esperado para as concentrações de compostos fenólicos e flavonoides totais e a atividade antioxidante, já que a literatura mostra que maiores concentrações destes compostos estariam correlacionadas à menores valores de CI50 pelas metodologias de DPPH e ABTS e, conseqüentemente, maiores atividades antioxidantes (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; MUKAKA, 2012).

### 5.15. Avaliação da temperatura de gelificação

A avaliação do comportamento reológico de formulações é importante para avaliar a sua influência na fabricação, armazenamento e uso, principalmente no caso de formulações à base de poloxamer, que apresentam o comportamento diferenciado de gelificação dependente da temperatura e concentração de polímero (FREITAS *et al.*, 2006).

Devido à elevada concentração do polímero na formulação, foi possível observar a formação de um gel viscoso em temperatura ambiente e a formulação permaneceu líquida enquanto mantida em geladeira. Desta forma, com o objetivo de avaliar a temperatura de transição solução-gel para a formulação preparada com 20% de poloxamer, o ensaio foi realizado com alterações crescentes de temperatura na faixa de 8 a 20°C e os resultados representados nas Figuras 17 e 18.

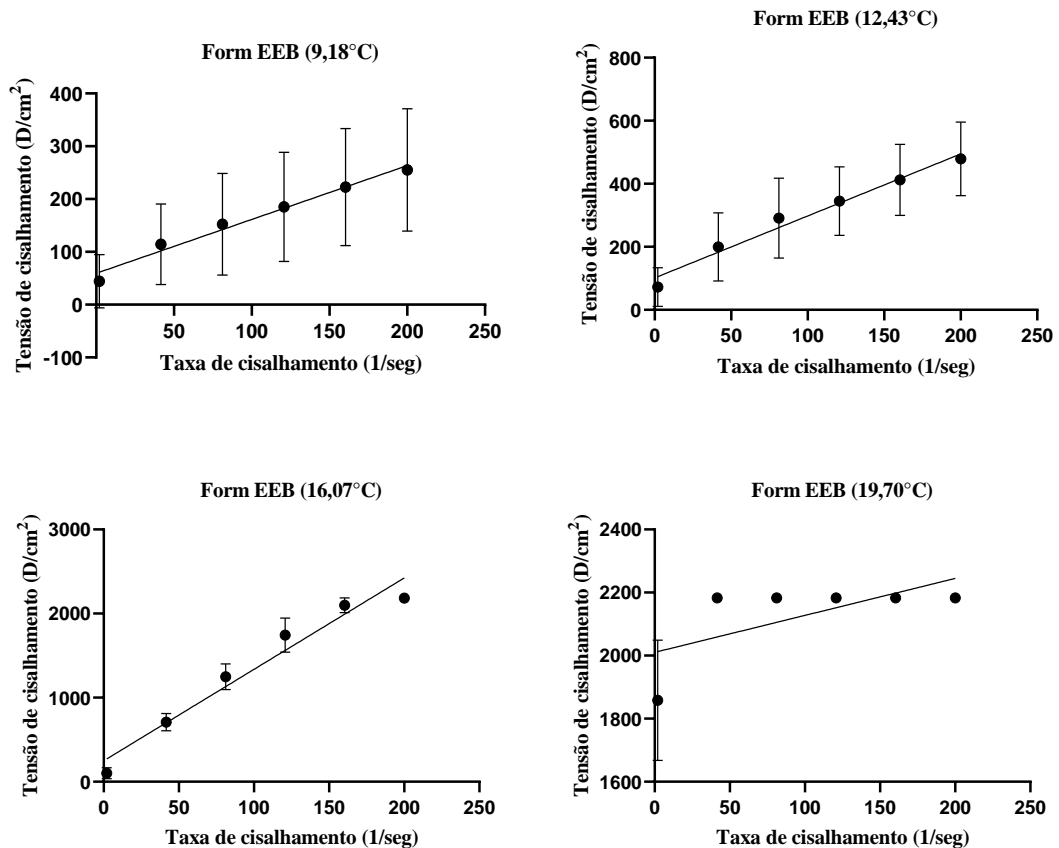


Figura 17: Gráficos representando o comportamento reológico da formulação de extrato etanólico bruto com o aumento gradual da temperatura, a temperatura representada no título do gráfico equivale à média das temperaturas atingidas durante cada ensaio.

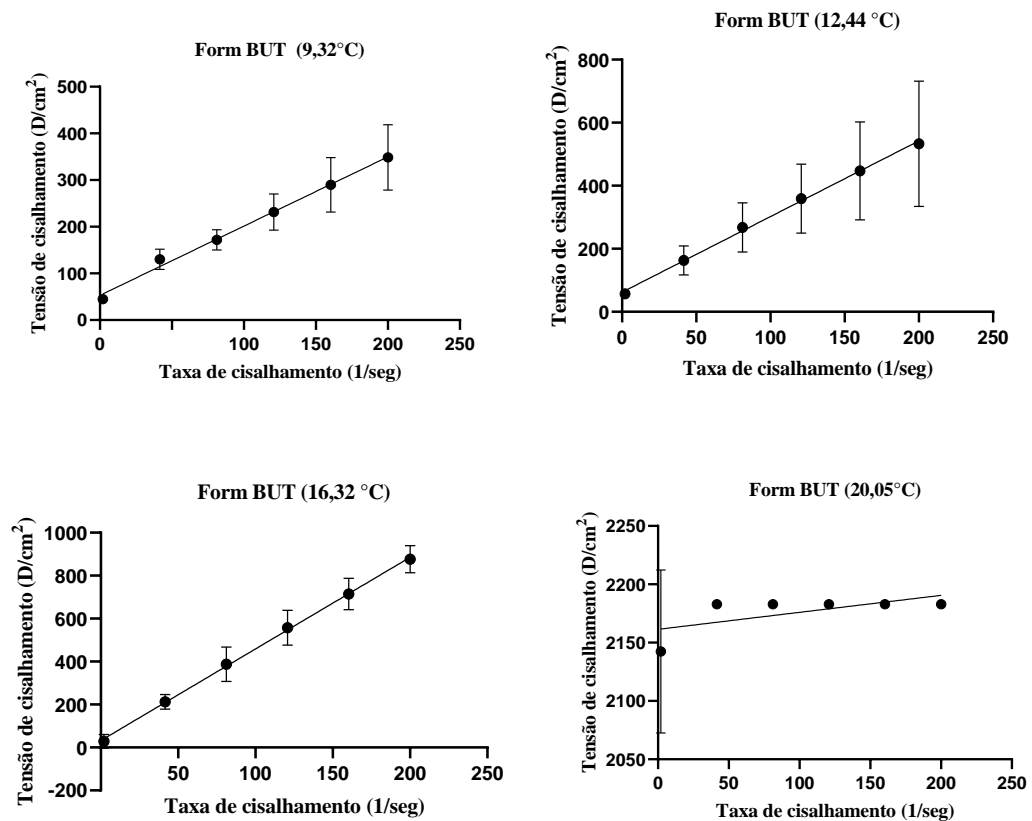


Figura 18: Gráficos representando o comportamento reológico da formulação da fração butanólica com o aumento gradual da temperatura, a temperatura representada no título do gráfico equivale à média das temperaturas atingidas durante o ensaio.

BRUSCHI (2006) avaliou o comportamento reológico de formulações contendo poloxamer 407 e observaram um aumento significativo da viscosidade com o aumento da concentração de poloxamer na formulação. Notaram também uma correlação entre temperatura e viscosidade, com o aumento diretamente proporcional entre as duas variáveis (BRUSCHI, 2006).

ARGENTA *et al.* (2021) avaliaram a performance do tempo de gelificação de hidrogéis de poloxamer para aplicação vaginal. Sabe-se que esta temperatura é afetada pela concentração de poloxamer na formulação e pelo tipo de polímero usado. Para o poloxamer 407 na concentração de 20%, encontraram a temperatura de gelificação em torno de 26,05°C (ARGENTA *et al.*, 2021).

Neste estudo também foram utilizados 20% de poloxamer 407, porém foi observada uma temperatura de gelificação um pouco inferior, entre 16°C e 20°C. Nota-se que o comportamento reológico foi similar para as duas formulações, com temperatura de gelificação na mesma faixa e valores de tensão de cisalhamento bem próximos para cada

temperatura. Outros componentes da formulação também podem contribuir para a alteração deste parâmetro, por exemplo o carbopol, que é sabidamente capaz de aumentar a resistência e viscosidade do meio (CHEN *et al.*, 2021).

Apesar de os componentes presentes nos extratos vegetais alterarem o meio e também influenciarem nos parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças significativas entre as viscosidades encontradas para as formulações de extrato bruto e fração butanólica. Segundo CHEN *et al.* (2021), os componentes individuais do hidrogel podem influenciar em suas características dependendo de suas propriedades físico-químicas, estrutura e interação entre eles (CHEN *et al.*, 2021).

## 6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível constatar a importante capacidade dos extratos das folhas de *Humulus lupulus* absorverem a radiação ultravioleta, principalmente a fração butanólica, que apresentou pronunciada atividade fotoprotetora e capacidade antioxidante.

A fração butanólica apresentou considerável teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, que possuem capacidade de absorver a radiação ultravioleta e poder antioxidante conforme relatado na literatura, o que justifica a ênfase em seus resultados.

As formulações desenvolvidas, tanto para o extrato bruto quanto para a fração butanólica, apresentaram os parâmetros almejados para tamanho de partícula e índice de polidispersão, com boa solubilidade dos extratos e estabilidade.

A formulação foi capaz de potencializar a atividade antioxidante dos seus respectivos extratos, característica que pode contribuir para a redução de danos da radiação UV.

A formulação foi capaz de alterar a atividade citotóxica dos extratos e em determinados tempos de análise, reduzir a sua citotoxicidade.

A formulação desenvolvida a partir da fração butanólica apresentou potencial para uso como protetor solar de amplo espectro a partir das análises *in vitro*, ainda que com um baixo valor de FPS.

A formulação obtida através do extrato bruto, no entanto, apresentou uma atividade fotoprotetora reduzida, não sendo considerada como um protetor solar. Porém, também apresentou absorção na região do UV e atividade antioxidante, podendo ter seu uso avaliado em associação com outros filtros solares.

## REFERÊNCIAS

- ACEITUNO-MADERA, P.; BUENDÍA-EISMAN, A.; ARIAS-SANTIAGO, S.; SERRANO-ORTEGA, S. Changes in the Incidence of Skin Cancer Between 1978 and 2002. **Actas Dermosifográficas**, v. 101, n. 1, p. 39-46, 2010.
- AGUIAR, M. A.; NOVELLI, P. H. G. S. Desenvolvimento de uma formulação cosmética antioxidante e fotoprotetora à base de curcumina. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 24 – 39, 2020.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105 – 121, 2015.
- ALCÂNTARA, M. Análise de Material Biológico. **Academia**, 2006.
- ALMEIDA, A. R.; MACIEL, M. V. O. B.; MACHADO, M. H.; BAZZO, G. C.; ARMAS, R. D.; VITORINO, V. B.; VITALI, L.; BLOCK, J. M.; BARRETO, P. L. M. Bioactive compounds and antioxidante activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 340 – 347, 2020.
- ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; SOUSA, P. H. M.; NOGUEIRA, C. M. D.; MAGALHÃES, C. E. C. Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 343 – 350, 2003.
- ALMEIDA, M.; MAGALHÃES, M.; VEIGA, F.; FIGUEIRAS, A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in câncer. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 31, p. 1 – 14, 2018.
- ALONSO-ESTEBAN, J. I. PINELA, J.; BARROS, L.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; CALHELHA, R. C.; TORIJA-ISASA, E.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. **Industrial Crops & Products**, v. 134, p. 154-159, 2019.
- ANDRADE, L. N.; LEITE, M. G. P.; BACELLAR, L. A. P. Composição mineralógica e geoquímica dos solos do parque estadual do Itacolomi – Ouro Preto/MG. **Quaternary and Environmental Geosciences**, v. 3, n. 1-2, p. 1-8, 2012.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Uma abordagem sobre os Ensaio Físicos e Químicos, 2007.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Gerência Geral de Cosméticos, v. 1, 2004.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2ª Edição, 2012.
- ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores Solares e os Efeitos da Radiação Ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n. 11, p. 1 – 7, 2008.

ARFAN, A. R.; ILMIAWATI, A.; SUGITA, P. Optimization and synthesis of etoricoxib-loaded low molecular weight chitosan nanoparticles. **Ciência Rural**, v. 51, n. 11, p. 1 – 15, 2022.

ARGENTA, D. F.; BERNARDO, B. C.; CHAMORRO, A. F.; MATOS, P; R; CAON, T. Thermosensitive hydrogels for vaginal delivery of secnidazole as an approach to overcome the systemic side-effects of oral preparations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, p. 1 – 10, 2021.

ASLANTÜRK, Ö. S.; ÇELİK, T. A.; KARABEY, B.; KARABEY, F. Active Phytochemical Detecting, Antioxidant, Cytotoxic, Apoptotic Activities of Ethyl Acetate and Methanol Extracts of *Galium parviflorum* L. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 6, p. 1–16, 2017.

AWAKAWA, T.; ABE, I. Biosynthesis of the teleocidin-type terpenoid indole alkaloids. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 26, p. 4747-4752, 2018.

BAKER, L. A.; MARCHETTI, B.; KARSILI, T. N. V.; STAVROS, V. G.; ASHFOLD, M. N. R. Photoprotection: Extending lessons learned from studying natural sunscreens to the design of artificial sunscreen constituents. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 12, p. 3770-3791, 2017.

BAROLET, D.; CHRISTIAENS, F.; HAMBLIN, M. R. Infrared and skin: Friend or foe. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 155, p. 78-85, 2016.

BENOSO, P. **O pH influencia as propriedades reológicas, viscoelásticas e mecânicas de soluções coloidais e géis a base de gelatinas e quitosana.** Pirassununga, 2021, 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

BERNSTEIN, E. F.; SARKAS, H. W.; BOLAND, P.; BOUCHE, D. Beyond sun protection factor: An approach to environmental protection with novel mineral coatings in a vehicle containing a blend of skincare ingredients. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 407-415, 2020.

BINDER, B. Y. K.; PEEBLES, C. A. M.; SHANKS, J. V.; SAN, K. The effects of UV-B on the Production of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Hairy Roots. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 25, n. 3, p. 861-865, 2009.

BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD, C.; RIVIÈRE, C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, p. 1047-1090, 2018.

BODE, A. M.; ROH, E. Are FDA-Approved Sunscreen Components Effective in Preventing Solar UV-Induced Skin Cancer? **Cells**, v. 9, p. 1 -21, 2020.

BONOLI, M.; VERARDO, V. MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5195 – 5200, 2004.



BOSE, B.; CHOUDHURY, H.; TANDON, P.; KUMARIA, S. Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, *in vitro* photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 173, p. 686-695, 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução RDC nº 30 de 01 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 4 jun. 2012.

BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. Ribeirão Preto, 2006, 320 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

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

CAINI, S.; GNAGNARELLA, P.; STANGANELLI, I.; BELLERBA, F.; COCOROCCHIO, E.; QUEIROLO, P.; BENDINELLI, B.; SAIEVA, C.; RAIMONDI, S.; GANDINI, S. Vitamin D and the risk of non-melanoma skin cancer: A systematic literature review and meta-analysis on behalf of the Italian melanoma intergroup. **MDPI**, v. 13, n. 19, 4815, 2021.

CARRILLO-CASTILLO, T. D.; CASTRO-CARMONA, J. S.; LUNA-VELASCO, M. A.; RUÍZ-ANCHONDO, T.; ZARAGOZA-CONTRERAS, E. A. Sistema de micelas poliméricas em um hidrogel termosensível para uso biomédico. **Sociedad Polimérica de Mexico A. C.**, 2018.

CEFALI, L. C.; ATAIDE, J. S.; MORIEL, P.; FOGGIO, M. A.; MAZZOLA, P. G. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, p. 346-353, 2016.

CHANG, C. C., YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178 – 182, 2002.

CHEN, Y.; LEE, J. H.; MENG, M.; CUI, N.; DAI, C. Y.; JIA, Q.; LEE, E. S.; JIANG, H. An overview on Thermosensitive Oral Gel Based on Poloxamer 407. **Materials**, v. 14, n. 16, p. 1 – 20, 2021.

CHUCHU, N.; DINNES, J.; TAKWOINGI, Y.; MATIN, R. N.; BAYLISS, S. E.; DAVENPORT, C.; MOREAU, J. F.; BASSETT, O.; GODFREY, K.; O’SULLIVAN, C.; WALTER, F. M.; MOTLEY, R.; DEEKS, J. J.; WILLIAMS, H. C. Teledermatology for diagnosing skin cancer in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 12, p. 1 – 182, 2018.

COLE, C.; SHYR, T.; OU-YANG, H. Metal oxide sunscreens protect skin by absorption, not by reflection or scattering. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 32, n. 1, p. 5-10, 2016.

COLIPA. Guidelines: In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products, Europa, 2011.

CÖR, D.; KNEZ, Ž.; HRNČIČ, M. K. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 1-21, 2018.

COSTA, F. S. F. **Estudo do resíduo gerado pela indústria cervejeira artesanal, trub quente, caracterização fitoquímica e avaliação de atividades antimicrobiana e antioxidante**. Ouro Preto, 2017, 128 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

COUTEAU, C. PAPARIS, E.; EL-BOURRY-ALAMI, S.; COIFFARD, L. J. M. Influence on SOF of the quantity of sunscreen product applied. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, p. 250-252, 2012.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI, n. 3, p. 59 – 69, 2009.

D'AVILA, L. Y. Protetores solares: Avaliação da toxicidade e segurança relacionadas ao seu uso. Orientadora: Cristina Helena dos Reis Serra. 2020. 38f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-Bioquímica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

DANGWAL, L. R.; UNİYAL, P. Some common medicinal plants used in protecting skin from sun damage in district Tehri Garhwal, Uttarakhand, India. **Ecology, Environment and Conservation Journal**, v. 26, p. S39 – S45, 2020.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33 – 40, 2004.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33 – 40, 2004.

DIFFEY, Brian; CADARS, Benoît. An appraisal of the need for infrared radiation protection in sunscreens. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 361–364, 2016.

DINARDO, J. C.; DOWNS, C. A. Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 1, p. 15-19, 2018.

DU, G.; LI, M.; MA, F.; LIANG, D. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. **Food Chemistry**, v. 113, p. 557 – 562, 2009.

DUARTE, A. F. S.; HIROTA, B. C. K.; OLIVEIRA, V. B.; CAMPOS, R.; MURAKANI, F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Sthdl. (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 607-614, 2014.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709 – 2728, 2006.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JR.; S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019.

FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, p. 1 – 26, 2017.

FARIAS, A. V.; FERNANDES, F. S.; SANTOS, R. S.; SOUZA, E. S.; SOUZA, J. V. B. Phytochemical study and photoprotection analysis of extracts and essential oils of *Aniba canelilla* (H.B.K) mez. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 4, p. 614 – 620, 2017.

FAURSCHOU, A.; BEYER, D. M.; SCHMEDES, A.; BOGH, M. K.; PHILIPSEN, P. S.; WULF, H. C. The relation between sunscreen layer thickness and vitamin D production after ultraviolet B exposure: a randomized clinical trial. **British Journal of Dermatology**, v. 167, p. 391-395, 2012.

FERREIRA, E. **Desenvolvimento e avaliação de hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal**. Ponta Grossa, 2019, 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade estadual do Centro-Oeste.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, p. 869-871, 1988.

FREITAS, M. N.; FARAH, M.; BRETAS, R. E. S.; RICCI-JÚNIOR, E.; MARCHETTI, J. M. Rheological characterization of Poloxamer 407nimesulide gels. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 113 – 118, 2006.

GIULIANO, E.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; COSCO, D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 159, p. 1 – 26, 2018.

GOBBO-NETO, L. LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOSWAMI, P. K.; SAMANT, M. SRIVASTAVA, R. Natural sunscreen agentes: a review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)**, v. 2, n. 6, p. 458-463, 2013.

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

GUIOMAR, L. S. L. Evaluation of *Humulus lupulus* L. Therapeutic Properties for the Treatment of Skin Diseases. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Beira Interior, p. 111, 2020.

GUPTA, V.; SHARMA, V. K. Skin typing: Fitzpatrick grading and others. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 430-436, 2019.

HAILUN, H.; ANQI, L.; SHIQIN, L.; JIE, T.; LI, L.; LIDAN, X. Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 1 – 11, 2021.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HIGA, K. C.; JORJÃO, A. L.; OLIVEIRA, F. E.; OLIVEIRA, J. R.; BRITO, G. N. B.; JORGE, A. O. C.; OLIVEIRA, L. D. Citotoxicidade dos extratos glicólicos de *Cynara scolymos* (alcachofra), *Myracrodruom urundeuva* (aroeira-do-sertão) e *Camelia sinensis* (chá verde). **Revista Univap**, v. 25, n. 48, p. 77 – 91, 2019.

HOEL, D. G. BERWICK, M.; GRUIJL, F. R.; HOLICK, M. F. The risks and benefits of sun exposure. **Dermato-Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2016.

HUDSON, L.; RASHDAN, E.; BONN, C. A.; CHAVAN, B.; RAWLINGS, D.; BIRCH-MACHIN, M. A. Individual and combined effects of the infrared, visible and ultraviolet light components of solar radiation on damage biomarkers in human skin cells. **FASEB Journal**, v. 34, n. 3, p. 3874-9883, 2020.

IGLESIAS, P. M. T. **Hidrogeles poliónicos de chitosán y ácido poliacrílico como nuevos sistemas de Liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de “H pylori”**. Madrid, 2003, 310 p. Tese (Doutorado), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

INFANTE, V. P. H.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; CALIXTO, L. S.; DARVIN, M. E.; KRÖGER, M.; SCHANZER, S.; LOHAN, S. B.; LADEMANN, J.; MEINKE, M. C. Influence of physical-mechanical properties on SPF in sunscreen formulation on ex vivo and in vivo skin. **Internatoinal Journal of Pharmaceutics**, v. 598, p. 1 – 9, 2021.

JIANG, Z. KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 345-358, 2016.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidante assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KEILLER, A.; M.; ZIERAY, O.; KRETZSCHMAR, G. Hop extracts and hop substances in treatment of menopausal complaints. **Planta Medica**, v. 79, n. 7, p. 645-658, 2016.

KESKIN, Ş.; ŞIRIN, Y.; ÇAKIR, H. E.; KESKIN, M. An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 170-174, 2019.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KLEIN, F. R. S.; REIS, A. KLEINOWSKI, A. M.; TELLES, R. T.; AMARANTE, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. UV-B radiation as an elicitor of secondary metabolite production in plants of the genus *Alternanthera*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 4, p. 615-623, 2018.

KOCH, S.; PETTIGREW, S.; STICKLAND, M.; SLEVIN, T.; MINTO, C. Sunscreen increasingly overshadows alternative sun-protection strategies. **Journal of Cancer Education**, v. 32, p. 528-531, 2017.

KOHNEN-JOHANNSEN, K. L.; KAYSER, O. Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 1-23, 2019.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; POTAPOVICH, A.; MAYER, W.; TALIB, N.; DE LUCA, C. Secondary plant metabolites for sun protective cosmetics: from pre-selection to product formulation. **Cosmetics**, v. 5, n. 2, 2018.

LIEBEL, F. KAUR, S.; RUVOLO, E.; KOLLIAS, N.; SOUTHALL, M. D. 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.

LIN, M. XIANG, D.; CHEN. X.; HUO, H. Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 8291-8302, 2019.

LIU, M.; HANSEN, P. E.; WANG, G.; QIU, L.; DONG, J.; YIN, H.; QIAN, Z.; YANG, M.; MIAO, J. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 754 – 779, 2015.

LYU, J. I.; RYU, J.; SEO, K. S.; KANG, K. Y.; HOON, P. S.; HA, T. H.; AHN, J. W.; KANG, S. Y. Comparative Study on Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus lupulus* L.) Strobile Extracts. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 1 – 10, 2022.

MACÊDO, S. K. S.; LIMA, K. S. B.; NETO, P. J. R.; ROLIM, L. A.; NUNES, X. P. Caracterização farmacognóstica, térmica e morfológica das cascas e folhas de *Triplaris gardneriana* Weed. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 11904-11915, 2020.

MAHAMAT-SALEH, Y.; AUNE, D.; SCHLESINGER, S. 25-Hydroxyvitamin D status, vitamin D intake, and skin cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

MAHMOUD, B. H.; RUVOLO, E.; HEXSEL, C. L.; LIU, Y.; OWEN, M. R.; KOLLIAS, N.; LIM, H. W.; HAMZAVI, I. H. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 2092-2097, 2010.

MALIAR, T.; NEMEČEK, P.; ŮRGEOVÁ, E.; MALIAROVÁ, M.; NESVADBA, V.; KROFTA, K.; VULGANOVÁ, K.; KROŠLÁK, E.; KRAIC, J. Secondary metabolites, antioxidant and anti-proteinase activities of methanolic extracts from cones of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. **Chemical Papers**, v. 71, n. 1, p. 41-48, 2017.

MALIK, S.; AHMAD, M.; KHAN, F. Qualitative and quantitative estimation of terpenoid contents in some important plants of Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Science**, v. 69, n. 2, p. 150–154, 2017.

MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreens: A Review of Health Benefits, Regulations, and Controversies. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, o. 427 – 438, 2014.

MANCUSO, J. B.; MARUTHI, R.; WANG, S. Q.; LIM, H. W. Sunscreens: an update. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 5, p. 643-650, 2017.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, p. 121 – 124, 1986.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.; VERMELHO, A. B.; SILVA, R. S.; PRESGRAVE, O. A. F.; LEITÃO, A. A. C.; LEITÃO, G. G.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p. 251-258, 2016.

MARCHESAN, T. A. **Potencial Químico e Tecnológico do Lúpulo Brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 84, 2020.

MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; OLIVEIRA, L. F. A. M.; GONÇALVES, C. P. Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenois Totais em Própolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 1 – 14, 2021.

MATOS, B. N. **Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do Minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica**. Distrito Federal, 2014, 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

MATSUMURA, Y.; ANATHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 298-308, 2004.

MATSUOKA, L. Y.; IDE, L.; WORTSMAN, J.; MACLAUGHLIN, J. A.; HOLICK, M. F. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 6, p. 1165-1168, 1987.

MAYORAL, J. B.; MORENO, A. C.; MARTÍN-MARTÍNEZ, E. S. Potencial zeta em la determinacion de carga superficial de lipossomas. **Latin-American Journal of Physics Education**, v. 8, n. 4, 2014.

MCDANIEL, D. FARRIS, P., VALACCHI, G. Atmospheric skin aging – Contributors and inhibitors. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 124-137, 2018.

MERCURIO, D. G.; WAGEMAKER, T. A. L.; ALVES, V. M.; BENEVENUTO, C. G.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. In vivo photoprotective effects of cosmetic formulation containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 121-126, 2015.

MISHRA, A. K.; MISHRA, A.; CHATTOPADHYAY, P. Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 3, p. 351-360, 2011.

MOHAMMED, Y. H.; HOMES, A.; HARIDASS, I. N.; SANCHEZ, W. Y.; STUDIER, H.; GRICE, J. E.; BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S. Support for the safe use of zinc oxide nanoparticle sunscreens: Lack of skin penetration or cellular toxicity after repeated application in volunteers. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 2, p. 308-315, 2019.

MORENO, A. H.; POSSEBON, L.; SANT'ANA, M.; SOUZA, H. R.; PILON, M. M. I.; GIROL, A. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 11-12, 2018.

MOURA, V. L. Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (mart.) Radlk (sapotaceae) biomonitorados pela inibição in vitro da atividade da alfa-amilase salivar humana (HSA). Uberlândia, 2008, p. 56. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69 – 71, 2012.

MUNHOZ, V. M.; LONNI, A. A. S. G.; MELLO, J. C. P.; LOPES, G. C. 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. 32, n. 2, p. 225 – 232, 2012.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1 – 30, 2021.

NADAL, M. D. C.; KANUNFRE, C. C. Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth em células A549. **Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2019.

NAIDOO, K. BIRCH-MACHIN, M. A. Oxidative stress and ageing: The influence of environmental pollution, sunlight and diet on skin. **Cosmetics**, v. 4, n. 1, 2017.

NAPAGODA, M. T.; MALKANTHI, B. M. A. S.; ABAYAWARDANA, A. K.; QADER, M. M.; JAYASINGHE, L. Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2016.

NASCIMENTO, L. F. SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Organic sunscreen. Research, innovation and the organic synthesis importance. **Revista virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 190-233, 2014.

NEALE, R. E.; KHAN, S. R.; LUCAS, R. M.; WATERHOUSE, M.; WHITEMAN, D. C.; OLSEN, C. M. The effect of sunscreen on vitamin D: a review. **British Journal of Dermatology**, v. 181, n. 5, p. 907-915, 2019.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408 – 413, 2011.

NEVES, A. B. **Geles termorreversíveis na Veiculação de Fármacos**. Lisboa, 2019, 45 p. Dissertação (Mestrado), Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

NORVAL, M.; WULF, H. C. Does chronic sunscreen use reduce vitamin D production to insufficient levels? **British Journal of Dermatology**, v. 161, n. 4, p. 732-736, 2009.

NUNES, A. R.; VIEIRA, I. G. P.; QUEIROZ, D. B.; LEAL, A. L. A. B.; MORAIS, S. M.; MUNIZ, D. F.; CALIXTO-JUNIOR, J. T.; COUTINHO, H. D. M. Use of flavonoids and cinnamates, the main photoprotectors with natural origin. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2018.

OLIVEIRA, G. L. R. **Avaliação do potencial e estabilidade antioxidante de extratos de carotenoides de melão cantaloupe (*Cucumis melo* L.) nanoencapsulado visando aplicação em alimentos**. Natal, 2020, 52 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

OLŠOVSKÁ, J.; BOSTIKOVA, V.; DUSEK, M.; JANDOVSKA, V.; BOGDANOVA, K.; CERMAK, P.; BOSTIK, P.; MIKYSKA, A.; KOLAR, M. *Humulus Lupulus* L. (Hops) – a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. **Military Medical Science Letters**, v. 85, n. 1, p. 19-36, 2016.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and prephytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP**, v. 115, n. 25, p. 115–119, 2014.

PASSERON, T.; BOUILLON, R.; CALLENDER, V.; CESTARI, T.; DIEPGEN, T. L.; GREEN, A. C.; VAN DER POLS, J. C.; BERNARD, B. A.; LY, F.; BEMERD, F.; MARROT, L.; NIELSEN, M.; VERSCHOORE, M.; JABLONSKI, N. G.; YOUNG, A. R. Sunscreen photoprotection and vitamin D status. **British Journal of Dermatology**, v. 181, n. 5, p. 916-931, 2019.

PIERRI, E. G.; CASTRO, R. C.; VIZIOLI, E. O.; FERREIRA, C. M.R.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; CHIN, C. M.; SANTOS, G. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 495-501, 2017.

PINHO, J. J. R. G.; FREITAS, T. S.; PINHO, D. J. M. R.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Determinação do fator de proteção solar (in vitro) de produtos magistrais na forma de gel. avaliação dos aspectos sensoriais e físico-químicos. **HU Revista**, p. 81–88, 2014.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1 – 5, 2017.

POLONINI, H. C.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter. **RSC Advances**, v. 4, n. 107, p. 62566-62575, 2014.

PROESTOS, C.; BOZIARISB, S.; NYCHASB, G. J. E.; KOMAITISET, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 664 – 671, 2006.

QIAN, Y.; QIU, X.; ZHU, S. Lignin: a nature-inspired sun blocker for broadspectrum sunscreens. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 320-324, 2015.

QUEIROZ, L. N. **Análise da citotoxicidade de extrato bruto e partições químicas da planta *Equisetum hyemale* em linhagens de carcinoma de células escamosas de boca**.



Nova Friburgo, 2018, 50 p., Monografia (Graduação em Biomedicina), Instituto de Saúde de Nova Friburgo, Universidade Federal Fluminense.

RAFFA, R. B.; PERGOLIZZI JR., J. V.; TAYLOR JR., R.; KITZEN, J. M. Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 44, n. 1, p. 134-139, 2019.

RANA, Z. H.; ALAM, M. K.; AKHTARUZZAMAN, M. Nutritional Composition, Total Phenolic Content, Antioxidant and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activities of Different Fractions of Selected Wild Edible Plants. **Antioxidants**, v. 8, n. 203, p. 1-15, 2019.

RAVNBAK, M. H. Objective determination of Fitzpatrick skin type. **Danish Medical Bulletin**, v. 57, n. 8, 2010.

RAY, A.; GUPTA, S. D.; GOSH, S. Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of *Aloe vera* L. gel from different growth periods of plants. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 712-719, 2013.

REGISTRE, C. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* de nanopartículas lipídicas de anfotericina B para o tratamento de Leishmaniose**. Ouro Preto, 2020, 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto.

REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **VI Botânica no Inverno 2016**, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, cap. 10, p. 93-104, 2016.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215 – 1221, 2011.

RODRIGUES, F. A.; PIMENTA, V. S. C.; BRAGA, K. M. S.; ARAÚJO, E. G. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 870-887, 2016.

RUIVO, J. S. P. **Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em Cosmética e Dermatologia**. Porto, 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

SACHDEVA, S. Fitzpatrick skin typing: application in dermatology. *Indian Journal of Dermatology*, **Venereology and Leprology**, v. 75, n. 1, p. 93-96, 2009.

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

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

SANCHEZ, G.; NOVA, J.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A. E.; MEDINA, R. D.; SOLORZANO-RESTREPO, C.; GONZALEZ, J.; OLMOS, M.; GODFREY, K.; AREVALO-RODRIGUEZ, I. Sun protection for preventing basal cell and squamous cell skin cancers (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2016.

SANTHI, K.; SENGOTTUVEL, R. Qualitative and quantitative phytochemical analysis of *Moringa concanensis* Nimmo. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 633-640, 2016.

SANTOS CAETANO, J. P.; ABARCA, A. P.; GUERATO, M.; GUERRA, L.; SCHALKA, S.; PEREZ SIMÃO, D. C.; VILA, R. SPF and UVA-PF sunscreen evaluation: are there good correlations among results obtained in vivo, in vitro and in a theoretical sunscreen simulator? A real-life exercise. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 6, p. 576-580, 2016.

SANTOS, F. P. G. **Quimioterapia intravenosa versus quimioterapia oral: Um novo desafio para as micelas poliméricas**. Coimbra, 2018. 67 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

SANTOS, V. A. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae)**. Orientadora: Regislainy Gomes da Silva. 2018. 60 f. TCC (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

SARKANY, R. Sun protection strategies. **Medicine**, 2017.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. Phytochemicals and phyto-extracts in cosmetics. **Trends in Phytochemical Research**, v. 2, n. 4, p. 185 – 186, 2018.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: Significado e controvérsia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507-515, 2011.

SEBESTYÉN, Z.; JAKAB, E.; BADEA, E.; BARTA-RAJNAI, E.; ŞENDREA, C.; CZÉGÉNY, ZS. Thermal degradation study of vegetable tannins and vegetable tanned leathers. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 138, p. 178-187, 2019.

SEO, J. Y.; CHUNG, J. H. Thermal aging. A new concept of skin aging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, n. 1, p. S13-S22, 2006.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G.; PORTA-DUCOING, H.; ROCHA-SOSA, M. La participación de los metabolitos secundários em la defensa de las plantas. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 21, n. 3, p. 355-363, 2003.

SHARMA, M. SAJGOTRA, M. Phytochemical Screening and Thin Layer Chromatography of *Ficus carica* Leaves Extract. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 5, n. 1, p. 18-23, 2017.

SILVA, M. L. C. S.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Seminars: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669 – 682, 2010.

SILVA, M. R.; COSTA, S. C. C. Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* do extrato etanólico de *Psidium guajava*. **XXIV Seminário de Iniciação Científica da UEFS**, 2020.

SILVA, P. H. S.; COELHO, R. Z.; SILVA, G. F.; CASTILHO, R. B.; ALBUQUERQUE, P. M. Análise do fator de proteção solar em extratos glicólicos e óleos fixos de plantas da

Amazônia. **The Journal of Engineering and Extract Sciences**, v. 3, n. 4, p. 621 – 626, 2017.

SILVA, R. G. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação *in silico* e *in vitro* de atividades biológicas de folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) cultivadas no Brasil. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, p. 192. 2020.

SILVA, R. S.; SILVA, A. C.; LINHARES, J. F. P. Determinação dos teores de umidade e cinzas totais em erva-cidreira (*Lippia alba*) coletada na zona rural de São Luís – MA. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 73800-73808, 2020.

SINGER, S.; KARRER, S.; BERNEBURG, M. Modern sun protection. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 46, p. 24-28, 2019.

SINGH, M.; SHARMA, V. Spectrophotometric Determination of Sun Protection Factor and Antioxidant Potential of an Herbal Mixture. **British Biotechnology Journal**, v. 10, n. 3, p. 1–8, 2016.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G.M. AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 – 355, 2007.

SOUSA, R. G.; LIMA, A. D. S.; LIMA, E. N. Incremento da atividade fotoprotetora e antioxidante de cosméticos contendo extratos vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 225 – 230, 2020.

SOUZA, A. V.; VIEIRA, M. R. S.; PUTTI, F. F. Correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SPENCER, J. P. E. Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 3255-3261, 2003.

SRIDAHR, K.; CHARLES, A. L. *In vitro* antioxidante activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advacend statistical programs. **Food Chemistry**, v. 275, p. 41 – 49, 2019.

STANFIELD, J.; OSTERWALDER, U.; HERZOG, B. In vitro measurements of sunscreen protection. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2010.

STEENACKERS, B.; DE COOMAN, L.; DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742-756, 2015.

TASHIRO, Y.; KAMEDA, Y. Concentration of organic sun-blocking agents in seawater of beaches and coral reefs of Okinawa Island, Japan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, v. 1-2, p. 333-340, 2013.

TORRES, D. S.; PEREIRA, E. C. V.; SAMPAIO, P. A.; SOUZA, N. A. C.; FERRAZ, C. A.; OLIVEIRA, A. P.; MOURA, C. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ROLIM-NETO, P. J.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; ROLIM, L. A. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 743-747, 2018.

ÜRGEOVÁ, E.; POLÍVKA, L. Secondary metabolites with antibacterial effects from leaves of different hop cultivars during vegetal periods. **Nova Biotechnologica**, v. 9, n. 3, p. 327 – 332, 2009.

VILABUENA MESA, M. C.; NOVA VILLANUEVA, J. A.; SÁNCHEZ VANEGAS, G. Minimal Erythema Dose: Correlation with Fitzpatrick skin type and concordance between methods of erythema assessment in a patient sample in Colombia. **Actas Dermato-Sifiliográficas**, v. 111, n. 5, p. 390-397, 2020.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, 2009.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids: Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 47, n. 3-4, p. 95-106, 2003.

WERKMAN, C. **Citotoxicidade da *Punica granatum L.* (Romã) sobre cultura de fibroblastos e células de linhagem cancerígena**. São José dos Campos, 2009, 115 p. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

WHITEMAN, D. C.; NEALE, R. E.; ALTKEN, J.; GORDON, L.; GREEN, A. C.; JANDA, M.; OLSEN, C. M.; SOYER, H. P. When to apply sunscreen: a consensus statement for Australia and New Zeland. **Australian and New Zeland Journal of Public Health**, v. 43, n. 2, p. 171-175, 2019

WIMALAWANSA, S. J. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 175, p. 60-81, 2018.

YANG, Y.; WU, R.; SARGSYAN, D.; YIN, R.; KUO, H. C.; YANG, I.; WANG, L.; CHENG, D.; WANG, C.; LI, S.; HUDLIKAR, R.; LU, Y.; KONG, A. N. UVB drives different stages of epigenome alterations during progression of skin cancer. **Cancer Letters**, v. 449, p. 20-30, 2019.

YOUNG, A. R.; NARBUTT, J.; HARRISON, G. I.; LAWRENCE, K. P.; BELL, M.; O'CONNOR, C.; OLSEN, P.; GRYS, K.; BACZYNSKA, K. A.; ROGOWSKI-TYLMAN, M.; WULF, H. C.; LESIAK, A.; PHILIPSEN, P. A. Optimal sunscreen use, during a sun holiday with a very high ultraviolet index, allows vitamin D synthesis without sunburn. **British Journal of Dermatology**, v. 181, p. 1052-1062, 2019.

ZARRINTAJ, P.; RAMSEY, J. D.; SAMADI, A.; ATUOFI, Z.; YAZDI, M. K.; GANJALI, M. R.; AMIRABAD, L. M.; ZANGENE, E.; FAROKHI, M.; FORMELA, K.; SAEB, M. R.; MOZAFARI, M.; THOMAS, S. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 110, p; 37 – 67, 2020.

ZOCOLER, M. A.; LOPES, J. V.; SANTOS, L. D.; CARVALHO, G. L. C.; OLIVEIRA, D. G. Desenvolvimento, avaliação do efeito fotoprotetor UVA e UVB, ação antioxidante e estabilidade de um creme com extratos de umbu-cajá. **Colloquium Vitae**, v. 11, n. 16, p. 51 – 61, 2019.