

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO EXTRATO
E FORMULAÇÕES DE *Calendula officinalis* L.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE
E FOTOPROTETORA DO EXTRATO E FORMULAÇÕES DE
Calendula officinalis L.**

Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dra. Margareth Linde Athayde

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
FOTOPROTETORA DO EXTRATO E FORMULAÇÕES DE *Calendula officinalis* L.**

elaborada por

Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

**Margareth Linde Athayde, Dra.
(Presidente/ orientador)**

Patricia Dutra Sauzem, Dra. (UNIPAMPA)

Melânia Palermo Manfron, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 16 de dezembro de 2013.

*Dedico à minha amada filha Isabele, pela compreensão e carinho durante a minha
ausência e ao meu esposo Regis pelo incentivo e amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por conceder-me a vida e por estar sempre presente nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Carlos Augusto (*in memoriam*) e Gelcy, pela educação, incentivo e amor incondicional. A vocês meu amor incondicional de filha. Obrigada mãe pelos cuidados com a Isabele durante a minha ausência.

Ao meu esposo Regis, meu companheiro e grande incentivador. Todo meu amor e gratidão pela paciência e carinho durante esta caminhada. Obrigada pelos cuidados com nossa filha durante a minha ausência. Amo você.

À minha querida e amada filha Isabele, pela compreensão durante minha ausência e período de estudos. A você dedico todo o meu amor e admiração.

À minha orientadora Dra. Margareth Linde Athayde, pela confiança depositada em mim durante este tempo e pelo carinho e compreensão dispensados.

Aos meus irmãos Daniel e Fabiane e aos meus cunhados Giancarlo, Daiane e Gisele, pelo apoio e principalmente pelos cuidados com minha filha durante minha ausência.

A minha amiga Patrícia, pelos cuidados com a Isabele quando precisei.

Aos tios Arnaldo e Sirlei, pelo carinho dispensado sempre que precisei.

À Carine Viana, pelo apoio e pelo chimarrão de todas as terças-feiras.

Aos meus colegas do Labfito pelo carinho e apoio.

Aos colegas e professores do laboratório Lachem, em especial à Mariana Bortoluzzi e Valéria Dal Prá, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas e professores do laboratório Lapemi, em especial à Laura Denardi.

A todos os profissionais do Laboratório de Controle de Qualidade da UNIFRA, em especial às professoras Luciane Laporta e Rosimar Leitenberg.

Aos colegas e professores do laboratório Labneuro, em especial à Verônica Beck, Mateus Rossato, Carin Hoffmaeister, Flavia Rigo e Raquel Tonello.

Aos demais colegas que conheci durante as disciplinas cursadas.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

A minhas sócias Kelly e Rosana e às funcionárias da Sulfarma, pelo carinho e compreensão durante a minha ausência.

Aos ex-colegas professores e funcionários da Unicruz.

A todas as pessoas que, mesmo não citadas, contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.

Paulo Beleki

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO EXTRATO E FORMULAÇÕES DE *Calendula officinalis* L.

AUTORA: Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle

ORIENTADOR: Margareth Linde Athayde

Local e data da defesa: Santa Maria, 16 de dezembro de 2013.

Existem muitos fatores relacionados com o estresse oxidativo, sendo um deles a exposição à radiação ultravioleta (UV), que gera espécies reativas de oxigênio (ERO). A *Calendula officinalis* L. apresenta compostos fenólicos, saponinas, carotenoides, alcoóis triterpênicos, esteroides, terpenóides e triterpenóides. Desta forma, este trabalho objetiva realizar uma avaliação fitoquímica do extrato hidroetanólico da calendula, e determinar a sua capacidade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* e também em formulações cosméticas desenvolvidas com este extrato. O extrato hidroetanólico foi obtido por maceração, concentrado em evaporador rotatório e posteriormente liofilizado. Os compostos fenólicos, flavonoides totais e taninos condensados foram determinados espectrofotometricamente e a identificação e quantificação de polifenóis foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A capacidade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH e o FPS determinado espectrofotometricamente. A atividade antirradicalar foi avaliada pelo método do radical hidroxila e superóxido. Após a avaliação do extrato, o mesmo foi incorporado em formulações de creme e gel e avaliados em relação à estabilidade físico-química, durante 90 dias, onde os parâmetros utilizados foram as características organolépticas, viscosidade e pH. Durante este período foi ainda avaliada a espalhabilidade de acordo com a área obtida em relação ao peso aplicado. Nas formulações também foram realizadas as determinações da capacidade antioxidante e FPS *in vitro* pelos métodos citados anteriormente. Os resultados obtidos mostram que o extrato e as formulações apresentaram uma boa capacidade antioxidante, o que pode estar relacionado com a presença de flavonoides (24,67 mg/g), polifenóis (33,90 mg/g) e taninos condensados (27,30 mg/g), bem como a quantidade de rutina (37,25 mg/g) e quercetina (6,09 mg/g) encontradas neste estudo, porém o FPS foi baixo no extrato (1,89) e nas formulações (em torno de 1,75). As amostras de gel apresentaram uma espalhabilidade superior à do creme. Todas as amostras mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento, conservando desta maneira as suas características físico-químicas.

Palavras chave: *Calendula officinalis*, antioxidante, fotoproteção, estabilidade.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Pharmaceutical Sciences

Federal University of Santa Maria

EVALUATION PHYTOCHEMISTRY, ANTIOXIDANT AND **PHOTOPROTECTIVE** CAPACITY EXTRACT AND FORMULATIONS *Calendula officinalis* L.

AUTHOR: Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle

ADVISER: Margareth Linde Athayde

Place and date of defense: Santa Maria, December 16, 2013.

There are many factors related to oxidative stress, one of which is exposure to ultraviolet (UV) radiation, which generates reactive oxygen species (ROS). *Calendula officinalis* L. presents phenolic compounds, saponins, carotenoids, triterpene alcohols, steroids, terpenoids and triterpenoids. Thus, this work aims to perform a phytochemical evaluation of hydroethanolic extract of calendula, and determine its antioxidant capacity and photoprotection *in vitro* and in cosmetic formulations developed with this extract. Hydroethanolic extract was obtained by maceration, concentrated in a rotary evaporator and then lyophilized. Phenolics, total flavonoids and condensed tannins were determined spectrophotometrically and the identification and quantification of polyphenols was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant capacity was determined by the DPPH method and SPF determined spectrophotometrically. The antiradical activity was assessed by the hydroxyl radical and superoxide method. Extract was embedded in gel and cream formulations and evaluated for physical and chemical stability during 90 days, where the parameters were the organoleptic characteristics, viscosity and pH. During this period, it was also evaluated the spreadability according with the area obtained in relation to the weight applied. Antioxidant capacity and *in vitro* SPF determinations were also performed on formulations by the methods previously mentioned. The results show that the plant had good antioxidant activity, which can be related to the presence of flavonoids (24.67 mg/g), polyphenols (33.90 mg/g) and condensed tannins (27.30 mg/g) and the amount of rutin (37.25 mg/g) and quercetin (6.09 mg/g) found in this study, but SPF was low in the extract (1.89), and in the formulations (around 1.7). Gel samples showed a higher spreadability than the cream. All samples remained stable during the storage period, thus maintaining its physical and chemical characteristics.

Keywords: *Calendula officinalis* L., antioxidant, photoprotection, stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Calendula officinalis</i> L.....	21
Figura 2-	Metabólitos secundários em plantas.....	25

MANUSCRITO 1

Figura 1 -	Chromatogram of the quantification of rutin (R) and the quercetin (Q) in the hydroethanolic extract of leaves.....	41
Figura 2 -	Percentages of the antioxidant capacity of the ascorbic acid and rutin standard and the hydroethanolic extract of <i>C. officinalis</i> evaluated by the DPPH method.....	42

MANUSCRITO 2

Figura 1 -	pH of the cream formulations with and without calendula extract during the stability.....	66
Figura 2 -	pH of the gel formulations with and without calendula extract during the stability.....	67
Figura 3 -	Determination of the viscosity of the cream formulations with and without calendula extract during the stability.....	68
Figura 4 -	Determination of the viscosity of the gel formulations with and without calendula extract during the stability.....	68
Figura 5 -	Determination of the spreadability of the cream formulations with and without calendula extract during the stability.....	70
Figura 6 -	Determination of the spreadability of the gel formulations with and without calendula extract during the stability.....	70
Figura 7 -	Antioxidant capacity cream with calendula extract during the period of stability.....	72
Figura 8 -	Antioxidant capacity in the gel with extract of Calendula during the period of stability.....	72

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Tabela 1 -	Alkaloids, Terpenids, Saponins and Oils Voltile in hidroethanolic extract of leaves <i>C. officinais</i> L. by thin layer chromatography (TLC).....	39
Tabela 2 -	Spectrophotometric assay for determination of total amount of polyphenols, flavonoids and tannins of hidroethanolic extract of leaves <i>C. officinalis</i> L.....	40
Tabela 3 -	Antioxidant capacity by method of hydroxyl radical and superoxide anion radical of the hidroethanolic extract os <i>Calendula officinalis</i> L. leaves.....	43
Tabela 4 -	Eritematogenic effect relationship (EE) versus radiation intensity (I) according to the wavelength (λ) (Sayre et al. 1979).....	49

MANUSCRITO 2

Tabela I-	Composition of the cream formulation base (g).....	60
Tabela II-	Composition of the gel formulation base(g).....	61
Tabela III -	Scale to evaluate the organoleptic characteristics.....	62
Tabela IV-	Erythemogenic effect (EE) versus radiation intensity (I) according to the wavelength (λ) (SAYRE et al., 1979).....	64
Tabela V	Organoleptic characteristics of the gel and cream during the period of stability in days. (T0 – time zero; RT- room temperate; S-estove; R-refrigerator).....	65
Tabela VI	Determination of spreadability factor (S f) in all formulations in function of \pm area (mm ²) and weight (g).....	71
Tabela VII	IC 50 for cream and gel formulations during the period of stability (T0 – Time zero; RT- Room temperature; S-stove; R-Refrigerator).....	73
Tabela VIII	Determination of the sun protection factor (SPF) <i>in vitro</i> cream and gel formulations during stability the periods (T0 = time zero; RT = room temperature; S = stove, R = refrigerator).....	74

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – Absorbância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT – Butylhydroxytoluene

CE – Catechin equivalents

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

CCD – Cromatografia em camada delgada

cm – Centímetro

DPPH – 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazila (2,2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl)

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

EE – Erythemogenic effect

EtOH – Ethanol

FPS – Fator de proteção solar

GAE – Galic acid equivalents

g – Grama

HO• - Hydroxyl radical

HPLC – High performance liquid chromatography

IC₅₀ - Inhibitory concentration in 50%

µg/mL – Micrograma por mililitro

mg/Kg – Miligrama por quilo

mg/mL – Miligrama por mililitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm² – Milímetro quadrado

nm – Nanômetro

N – Normal

OMS – Organização Mundial da Saúde

O₂•- - Superoxide anion

QUE – Quercetin equivalents

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

rpm – Rotação por minuto
RSD – Relative standard deviation
SPF – Sun protector factor
SUS – Sistema Único de Saúde
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
TLC – Thin layer chromatography
U/mL – Unidades por mililitro
w/v – Weight/volume
m/v – mass/volume
v/v – Volume/volume
 λ – Comprimento de onda
 π – Pi

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Formulações no tempo zero.....	94
Anexo B -	Formulações ao fim de 90 dias	95
Anexo C -	Modelo de template usado pelo periódico Natural Products Communication.....	96
Anexo D -	Guia para autores do periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Science.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 <i>Calendula officinalis</i> L.	21
3.2 Metabólitos secundários.....	24
3.3 Radicais livres e antioxidantes.....	27
3.4 O espectro solar.....	29
3.5 Fotoprotetores.....	30
3.5.1 Plantas como fotoprotetores.....	30
3.6 Desenvolvimento e estabilidade de formulações semissólidas.....	32
4 RESULTADOS.....	36
MANUSCRITO1 - Phytochemical evaluation, in vitro antioxidant and photoprotective capacity of leaves of <i>Calendula officinalis</i> L.....	36
Abstract.....	37
Means of text.....	38
Experimental.....	44
References.....	50

MANUSCRITO 2 – Evaluation of physical chemistry stability, spreadability and <i>in vitro</i> antioxidant photoprotective capacity of topical formulations containing extract of leaves <i>Calendula officinalis</i> L.....	55
Abstract.....	56
Resumo.....	57
Introduction.....	58
Materials and methods.....	59
Results and discussion.....	65
Conclusion.....	75
References.....	76
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
6 CONCLUSÕES.....	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

A ligação do homem às plantas iniciou com o uso dos vegetais para satisfazer suas necessidades básicas de sobrevivência, que incluem a utilização destas como alimento, medicamento, fonte de calor, abrigo, construção ou ornamento e desta forma, a etnobotânica estuda essa relação mútua entre populações e plantas, tendo importância no que diz respeito ao uso de variadas espécies como alimentos, medicamentos e matérias-primas (ZUCCHI et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) revelou, no início da década de 1990 que 65-80% da população de países em desenvolvimento usavam plantas como forma de manutenção básica da saúde, pois apesar da crescente evolução da alopatia, muitas vezes ela se torna inacessível à população sem recursos (VEIGA-JUNIOR, PINTO E MACIEL, 2005). Com isso, em 2006, o governo federal do Brasil lançou uma política de incentivo ao uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para garantir o acesso seguro pela população brasileira, elaborando uma lista de plantas cujos estudos podem colaborar para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, inclusive no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010).

Todas as espécies vegetais são constituídas por substâncias químicas, responsáveis tanto pelos seus efeitos benéficos, como pelos efeitos tóxicos e, desta forma, para que a humanidade possa fazer uso seguro das plantas medicinais, é necessário o conhecimento científico de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (RITTER et al., 2002).

As substâncias encontradas nas plantas podem ser denominadas metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários são formados a partir dos primários, por rotas metabólicas diversas e são responsáveis pelas propriedades adaptativas da planta e sua interação com o ambiente com os outros seres, e também pelos efeitos biológicos provocados por ela (SIMÕES et al., 2010).

Muitas espécies vegetais têm sido empregadas por apresentarem compostos com efeito antioxidante, tais como as vitaminas C e E, carotenóides e compostos

fenólicos, presentes em muitas delas, sendo que os compostos fenólicos são as substâncias que melhor se relacionam com a atividade antioxidante (PRADO, 2009).

Existem muitos fatores relacionados com o estresse oxidativo, sendo um deles a exposição à radiação ultravioleta (UV), que gera espécies reativas de oxigênio (ERO), também conhecidas como radicais livres. O sistema antioxidante presente no organismo humano protege, até certo ponto, contra o ataque das EROs. Quando a capacidade do organismo em neutralizar essas espécies entra em desequilíbrio (ou seja, a produção das espécies reativas de oxigênio é maior que a sua retirada), ocorre o estresse oxidativo (OLIVEIRA et al, 2009).

A formação de radicais livres na pele altera a expressão de genes, fazendo com que ocorra a redução de colágeno e elastina, sendo um dos principais responsáveis pelo agravamento do envelhecimento cutâneo, e ativos com o objetivo de neutralizar esses compostos, chamados antirradicais livres, devem ser adicionados em produtos antienvhecimento com a finalidade de prevenção, já que o efeito não é imediato e sim percebido a longo prazo.(BAUMANN, 2004; RIBEIRO, 2010).

Atualmente há um grande interesse por produtos cosméticos utilizados na prevenção e melhora de peles envelhecidas, e novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e usadas para melhorar as características das formulações, possibilitando uma maior disponibilidade de ativos empregados neste setor. Com o aumento das discussões sobre sustentabilidade, o crescente interesse por parte das empresas em conservar o meio ambiente e do consumidor em adquirir produtos naturais e orgânicos, têm-se evidenciado uma alta procura por produtos desta natureza (RIBEIRO, 2010). Neste contexto, a calendula é uma planta que, devido à sua constituição química, apresenta uma grande importância, principalmente na área cosmética, devido as suas propriedades antioxidantes, cicatrizantes e anti-inflamatórias (ERCETIN et al., 2012;FONSECA et al., 2010). De acordo com os dados encontrados na literatura, as flores da calendula já foram bem exploradas no que diz respeito à capacidade antioxidante. Porém, há uma escassez de dados referentes às folhas.

Desta forma, a presente dissertação teve como objetivo uma avaliação fitoquímica preliminar e doseamentos do teor de compostos fenólicos, bem como a

determinação da capacidade antioxidante, antirradicalar e fotoprotetora do extrato hidroetanólico de folhas da *Calendula officinalis* L. Posteriormente, este extrato foi incorporado em formulações de creme e gel, as quais foram submetidas a testes de estabilidade físico-química, determinação da espalhabilidade e avaliação da capacidade antioxidante e fotoprotetora.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a capacidade antioxidante e fotoprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Calendula officinalis L.* em formulações cosméticas.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar e quantificar polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no extrato hidroetanólico;
2. Verificar a presença alcalóides, terpenóides, saponinas e óleos voláteis através de cromatografia em camada delgada (CCD), no extrato hidroetanólico;
3. Realizar o doseamento de flavonoides totais, polifenóis totais e taninos condensados por espectrofotometria, no extrato hidroetanólico;
4. Realizar a avaliação da capacidade antirradicalar *in vitro* no extrato hidroetanólico através do método do radical hidroxila e ânion superóxido;
5. Desenvolver formulações cosméticas contendo extrato hidroetanólico e avaliar a estabilidade físico-química e espalhabilidade durante o período de armazenamento;
6. Realizar a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* no extrato hidroetanólico e nas formulações, por espectrofotometria;
7. Realizar os testes de avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH (2,2-difenil,1- picrihidrazila), no extrato bruto hidroetanólico e nas formulações, por espectrofotometria.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Calendula officinalis* L.

A *Calendula officinalis* L., conhecida popularmente como mal-me-quer, é uma planta com interesse pelas suas propriedades medicinais e ornamentais. É utilizada como corante alimentício, tempero e chá, apresentando importância na produção de produtos cosméticos (ERCETIN et al., 2012).



Figura 1 – *Calendula officinalis* L. Fonte: arquivos do autor.

Pertencente à família Asteraceae, é uma planta herbácea anual, apresentando de 30 a 60 cm de altura. As folhas são denteadas, com pelos glandulares nas duas faces, caule anguloso e curto e as flores apresentam-se no ápice do caule com coloração que pode variar do amarelo ao laranja. Usada há muito tempo pela medicina popular como auxiliar no tratamento de muitas doenças, o termo calendula deriva da palavra latina “calendae”, de onde tem origem a palavra calendário, pois significa “primeiro dia de cada mês”. O gênero calendula está representado por 29 espécies, entre elas a *Calendula officinalis*, planta considerada cosmopolita e que é amplamente usada por suas características ornamentais, cosméticas e terapêuticas

(WIKTOROWSKA, DLUGOSZ e JANISZOWSKA, 2010; CITADINI-ZANETTE et al., 2012).

No Brasil, a fitoterapia é estimulada através de políticas públicas que tem como finalidade o uso correto e seguro de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pela população (BRASIL, 2006). Preparações formuladas à base de espécies vegetais são consideradas medicamentos, pois a composição química da planta é responsável pelas ações biológicas que ela desempenha e conseqüentemente, deve ser avaliada em relação a eficácia, segurança e qualidade. O Ministério da Saúde possui uma lista de espécies vegetais com potencial para uso, inclusive pelo SUS, dentre as quais, encontra-se a *Calendula officinalis* (BRASIL, 2010).

Segundo Butnariu e Coradini (2012), devido às suas propriedades anti-inflamatória e antisséptica, a calendula tem sido utilizada em ulcerações e eczemas de pele. A decocção e tintura das flores tem sido empregadas em preparações para queimaduras, cortes, feridas, erupções cutâneas e contusões, entre outras (FONSECA et al., 2010). Também são descritas atividades antifúngicas, anti-edema e antidiabética (AGATONOVIC-KUSTRIN E LOESCHER, 2013).

A calendula contém ácido oleanólico na forma de aglicona de saponinas triterpenóides, denominados glicosídeos e glicuronídeos. Glicuronídeos do ácido oleanólico extraído das flores são relativamente não tóxicos, sendo utilizado em muitas formulações cosméticas e farmacêuticas. Estes compostos apresentam ação hemolítica, fungistática, antibacteriana e antiparasitária. O ácido oleanólico livre tem importância medicinal, apresentando atividade antiulcerogênica, anti-inflamatória, antitumoral, hepatoprotetora, hipoglicemiante e anti-HIV (WIKTOROWSKA, DLUGOSZ e JANISZOWSKA, 2010).

A planta apresenta, também, compostos fenólicos (flavonoides e ácido fenólico), saponinas, carotenoides, alcoóis triterpênicos, esteroides, terpenóides e triterpenóides (BUTINARIU e CORADINI, 2012; AGATONOVIC-KUSTRIN e LOESCHER, 2013). Os flavonoides encontrados incluem quercetina, rutina, narcissina, isoramnetina e canferol (FONSECA et al., 2010). Butnariu e Coradini, 2012, avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides por espectrofotometria e CLAE em extrato de flores de calendula em diferentes solventes (metanol à 80%, etanol à 96%, isopropanol à 100% e etanol à 60%), que

foram correlacionados com a atividade antioxidante através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Foram identificados ácidos fenólicos e flavonoides. A atividade antioxidante e o teor de flavonoides não foi linear, sugerindo que a mesma está relacionada com o conteúdo de polifenóis.

Saini et al. (2012), descreveu, também, a presença de luteína, licopeno e xantofilas, apresentando efeito antioxidante e anti-inflamatório. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da calendula em fibroblastos gengivais humanos em comparação com a quercetina. Verificou-se que a planta apresentou inibição da degradação do colágeno maior que a quercetina, podendo esse resultado ser devido aos demais componentes presentes na espécie.

Em um estudo realizado por Fonseca et al. (2010), foi verificada a potencial atividade antioxidante do extrato das flores de *C. officinalis* L. *in vitro*, pelo método do radical DPPH e através da irradiação UVB em pele de camundongos após administração oral, observando-se que a proteção da pele foi determinada pela prevenção da depleção da glutathiona (GSH). Foi observado, ainda, que o extrato afeta a atividade e/ou a secreção de proteinases estimuladas pela radiação UVB, importante para a cicatrização da pele e síntese de procolágeno.

O extrato das flores de calendula foi também avaliado quanto ao efeito neuroprotetor através de ensaio realizado para verificação de neurotoxicidade em ratos induzida com ácido 3-nitropropiónico (3-NP). Os ratos foram tratados com veículo ou extrato das flores de calendula nas doses de 100 e 200 mg/Kg durante 7 dias, seguidos de 15 mg/Kg de 3-NP, durante os 7 dias seguintes. Neste estudo, foi verificada a redução dos danos provocados pelo 3-NP, evidenciando o seu efeito protetor, provavelmente devido aos efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e estrogênico atribuídos à planta (SHIVASHARAN et al., 2013).

Um gel oral para bochecho contendo 2% do extrato das flores de calendula foi testado para o tratamento de mucosite orofaríngea induzida por radiação em pacientes com câncer na cabeça e pescoço. Neste estudo, evidenciou-se que a calendula diminuiu significativamente as lesões em relação ao placebo e a mesma pode ser usada para diminuir a intensidade dos danos provocados pela radiação (BABAEE et al., 2013).

Tanideh et al. (2013) avaliou o potencial efeito cicatrizante do extrato das flores de calêndula em gel sobre a mucosite oral induzida com 5-fluorouracil em hamster. Foi evidenciado que a mesma acelerou o processo de cicatrização no modelo estudado.

Já Parente et al. (2011), testaram a atividade angiogênica do extrato etanólico e frações diclorometânica e hexânica da calendula, considerando as propriedades cicatrizantes atribuídas à planta, onde foi observado um efeito positivo sobre a angiogênese, induzindo a neovascularização.

A calendula é amplamente utilizada em formulações cosméticas, especialmente em produtos solares, devido às suas propriedades hidratantes. O extrato das flores é usado como cicatrizante e anti-inflamatório nas concentrações que variam de 1,0 a 2,0 g de flor seca por 150 mL de água (CITADINI-ZANETTE et al., 2012).

Pode-se observar que os estudos realizados com a planta até o momento referem-se principalmente ao extrato das flores, havendo escassez de resultados relacionados aos aspectos fitoquímicos, capacidade antioxidante e fotoprotetora para as folhas da espécie *C. officinalis* L.

3.2 Metabólitos secundários

Os vegetais produzem compostos químicos que pertencem a dois grandes grupos, os chamados metabólitos primários, como os lipídeos, proteínas e carboidratos, responsáveis por funções importantes nas plantas e os metabólitos secundários, originados a partir dos primários através de diferentes rotas metabólicas (SIMÕES et al., 2010). Os metabólitos secundários são sintetizados pelos vegetais e desempenham um papel fundamental na defesa da planta contra microorganismos e herbívoros e também para proteção contra o excesso de luz solar, atuando como um fotoprotetor e antioxidante (JIMÉNEZ et al., 2003).

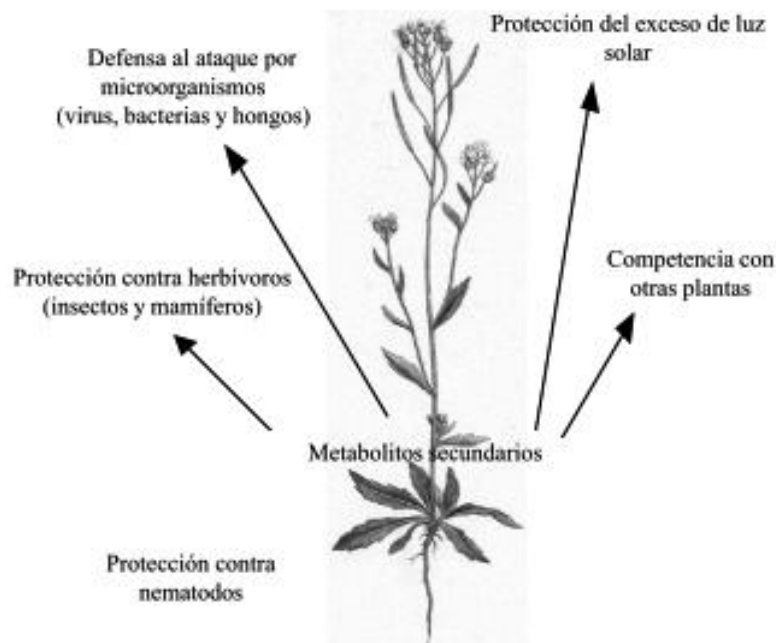


Figura 2. Metabólitos secundários em plantas. Adaptado de Jiménez et al., 2003.

Um dos metabólitos secundários mais estudados e que estão relacionados com a atividade antioxidante, são os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis. O consumo de vegetais contendo estes compostos é atribuído à prevenção de risco de alguns cânceres, diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose e doença de Alzheimer (ANNEGOWDA et al., 2010). Uma das principais justificativas para o seu uso como antioxidante refere-se a sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007).

Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (MALACRIDA e MOTTA, 2005) e podem ser subdivididos em fenóis simples, ácidos fenólicos, como os derivados do ácido benzoico e cinâmico, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, etilbenos, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007). Outra classificação também utilizada divide os compostos fenólicos em flavonoides e não flavonoides. Os chamados flavonoides são os que apresentam estrutura C6-C3-C6. Os não flavonoides podem apresentar estrutura C6-C1, característica dos ácidos hidroxibenzoicos, gálico e elágico; os de estrutura C6-C3, dos ácidos caféico e p-cumárico hidroxicinâmico e ainda os derivados da estrutura C6-C2-C6, específicos para o trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; BEHLING et al., 2004).

Os flavonoides são amplamente estudados e apresentam interesse principalmente pelos seus efeitos antioxidantes, atuando predominantemente contra os radicais superóxido e hidroxila (moléculas altamente reativas e responsáveis pela lipoperoxidação), protegendo, desta forma, o organismo contra danos oxidativos (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2002).

A distribuição dos flavonoides nas plantas depende de vários fatores relacionados com a espécie e também com fatores externos, como o grau de luminosidade, em especial, a disponibilidade de radiação ultravioleta, importante para a formação dos flavonoides, pois os vegetais cultivados em estufa, por exemplo, apresentam uma menor concentração de flavonoides disponíveis (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Seus efeitos são amplos, porém os mais conhecidos estão relacionados com a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica e antialérgica. Agem sobre o radical hidroxila e ânion superóxido, espécies altamente reativas que atuam na peroxidação lipídica. Também podem inibir enzimas importantes, relacionadas com a formação de tumores, como a prostaglandina sintetase, lipoxigenase e cicloxigenase e ainda, são capazes de reduzir o consumo de vitamina C durante a neutralização dos radicais livres (BEHLING et al., 2004).

Os taninos são metabólitos secundários que podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e condensados. Os primeiros podem ser subdivididos em galataninos e elagitaninos, os quais são polímeros derivados do ácido gálico e elágico, utilizados principalmente para curtir couro. Os últimos são encontrados em alimentos, principalmente nas frutas (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os ácidos fenólicos são compostos não flavonoides e incluem os derivados do ácido hidroxicinâmicos, que são compostos contendo um anel aromático com 3 carbonos ligados ao anel, sendo os mais conhecidos os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico. Um outro grupo de ácidos fenólicos são os derivados do ácido benzoico, caracterizados pela presença de grupo carboxílico ligado ao anel aromático, sendo exemplos os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Nos vegetais ocorrem sempre na forma de glicosídeos e raramente na forma livre. Embora outros aspectos possam contribuir para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos, a mesma está principalmente

relacionada com a presença de hidroxilas na estrutura (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; ANNEGOWDA et al., 2010).

3.3 Radicais livres e antioxidantes

Durante o processo de metabolismo celular normal, podem ser originados como subprodutos, as EROs, também conhecidas como radicais livres, incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. Quando a produção das EROs é elevada, podem ocorrer alguns efeitos nocivos, como a peroxidação lipídica, deformações na membrana celular e desnaturação de proteínas. Todavia, o organismo, através de mecanismos antioxidantes é capaz de inibir os efeitos danosos provocados pelas EROS por metabolizar os radicais livres (CHUANG e CHEN, 2012).

A peroxidação lipídica é o processo em que os radicais livres recebem elétrons dos lipídios presentes na membrana celular, provocando danos. As EROS degradam lipídios insaturados e formam malondialdeído (MDA) que é considerada uma substância marcadora da peroxidação lipídica. Os níveis de superóxido dismutase (SOD), glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT), ácido ascórbico (ASC) e o nível total de proteínas (PT) permite estimar o nível de antioxidantes presentes no tecido cutâneo (MISHRA et al., 2012).

Quando o sistema antioxidante endógeno encontra-se em equilíbrio, as EROs podem ser neutralizadas. Porém, quando as espécies tóxicas, produzidas pelo metabolismo do oxigênio e pela peroxidação lipídica são quantitativamente superiores àquelas que o sistema antioxidante consegue neutralizar, tem-se o estresse oxidativo. Os componentes celulares ficam, com isso, suscetíveis ao ataque das EROs, sendo a membrana um dos mais atingido em decorrência da peroxidação lipídica, que provoca alterações na sua estrutura e permeabilidade (ANTUNES et al., 2008).

Alguns fatores, como a exposição à radiação ionizante, originam radicais livres, que são constantemente formados no organismo como resultado do metabolismo

oxidativo e a formação de EROs está ligada à atividade de enzimas como a lipoxigenase e xantina-oxidase (DZIKI, 2012).

A exposição à radiação UV induz a uma diminuição dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes na pele (RIBEIRO, 2010). A radiação UVA provoca estresse oxidativo através da formação de EROs, incluindo oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (BUDAI et al., 2004). A radiação UVB estimula a produção de EROs, que resulta em envelhecimento acelerado e aparecimento de doenças malignas na pele. A hidroxila é uma das principais EROs responsáveis pela formação de radicais livres após a exposição da epiderme à luz UV (TERRA et al., 2012). Assim, uma suplementação tópica pode auxiliar na prevenção e proteção da pele, pois é uma preocupação para a área da cosmetologia, a pesquisa e desenvolvimento de novas formulações antioxidantes como forma de prevenir e atenuar os efeitos do envelhecimento manifestados na superfície cutânea (RIBEIRO, 2010; MARIOTTI e FRASSON, 2011).

É sabido que a pele é um dos órgãos que mais revelam o envelhecimento, que ocorre de forma gradual no organismo humano. Entre muitas teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento, uma das mais adequadas refere-se à produção de radicais livres (MARIOTTI e FRASSON, 2011). O processo de envelhecimento cutâneo pode, porém, ser acelerado por alguns fatores, sendo o mais comum, os efeitos danosos provocados pela radiação UV, o que pode favorecer a produção das EROs e reduzir forma significativa os antioxidantes endógenos, facilitando o ataque de estruturas importantes como a membrana celular, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (SOUZA et al., 2013).

Nesse sentido, muitos vegetais têm sido estudados em relação ao efeito antioxidante, sendo os de maior interesse os que apresentam polifenóis em sua constituição química, pois conferem proteção à pele além de apresentarem efeitos modulares sobre o sistema imune (KATYAR et al., 1999) e muitas plantas são ainda capazes de estimular o sistema antioxidante a combater lesões oxidativas induzidas por metais pesados (THOUNAOJAM et al., 2012).

3.4 O espectro solar

O espectro solar que atinge a superfície terrestre é composto principalmente por radiações ultravioletas (UV), com comprimento de onda entre 100 e 400 nm, visível, de 400 a 800 nm e infravermelha (IV), acima de 800 nm. A radiação UV pode ser dividida em UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400nm) (FLOR et al., 2007). Aproximadamente 5% da energia solar que chega à superfície da Terra corresponde à radiação UV, sendo que os níveis de UVB têm aumentado nos últimos anos devido à redução da camada de ozônio. (VERDAGUER et al., 2012). Desses, aproximadamente 95% é UVA e o restante é UVB (SWALWEL, 2012).

A radiação UV provoca agressões na pele de forma cumulativa e irreversível (SOUZA et al., 2005). Esses efeitos são percebidos de diferentes maneiras, pois a radiação UV é responsável por alterações bioquímicas na pele. Isso ocorre porque, com a redução do comprimento de onda, a energia da radiação aumenta, provocando reações fotoquímicas (FLOR et al., 2007). Esses efeitos são percebidos na pele, de acordo com a intensidade da radiação recebida, tempo de exposição e suscetibilidade genética (VELASCO et al., 2011). A exposição à radiação solar provoca aumento do risco de desenvolver câncer de pele, envelhecimento cutâneo precoce e exacerbação de dermatoses fotossensíveis, sendo importante para a redução destes efeitos, o uso contínuo de fotoprotetores (BORGHETTI e KNORST, 2006).

O câncer de pele é a neoplasia de maior ocorrência no Brasil. O carcinoma basocelular e espinocelular, que são neoplasias não melanoma, apresentou uma estimativa de 115 mil novos casos para 2008. Já o melanoma, apresenta uma baixa incidência, porém sua letalidade é alta. Todavia, tem-se observado um aumento significativo em populações de cor de pele branca. Entre os fatores de risco, os principais incluem história familiar de câncer de pele, fatores genéticos e exposição à radiação ultravioleta. Os raios ultravioletas provocam mutações gênicas e suprimem o sistema imune cutâneo e, desta forma, a fotoproteção continua sendo extensivamente discutida como sendo a forma mais eficaz de prevenção de qualquer neoplasia de pele (CASTILHO, SOUZA e LEITE, 2010).

Como o Brasil está localizado com grande parte de sua superfície demográfica entre o Trópico de Capricórnio e o Equador e é essa região que apresenta a maior intensidade de radiações provenientes do sol, há um grande número de pessoas atingidas pelo câncer de pele no país (CABRAL et al., 2011).

3.5 Fotoprotetores

As substâncias chamadas filtros solares, são compostos que apresentam a propriedade de absorver a radiação solar altamente energética e transformá-la em uma forma de radiação menos energética, comumente a radiação infravermelha, provocando calor e evitando os danos gerados pelo sol (RIBEIRO et al., 2004). Atualmente, os filtros solares podem ser classificados como orgânicos ou inorgânicos, sendo que os orgânicos podem ser de origem sintética ou natural (POLONINI et al., 2011). Os filtros inorgânicos agem refletindo, dispersando e absorvendo a radiação em decorrência da barreira que formam na superfície cutânea, mas como desvantagem, cita-se a brancura ocasionada por este tipo de produto. Já os filtros orgânicos agem absorvendo a luz UV, mas há substâncias que também são capazes de absorver, dispersar e refletir ao mesmo tempo. A vantagem dos filtros orgânicos sobre os inorgânicos é que estes formam um filme transparente sobre a pele, porém são mais lipofílicos (RIBEIRO, 2010).

No Brasil, os fotoprotetores são considerados cosméticos (BRASIL, 2002) e classificados como grau de risco 2, ou seja, potencialmente capazes de provocar reações adversas. São produtos com indicação específica e que necessitam de comprovação de segurança e eficácia e ainda informações quanto ao uso ou restrições (BRASIL, 1999), e devem ser formulados respeitando um limite máximo de concentração devendo estar presentes na lista de filtros solares permitidos pela ANVISA de acordo com a RDC 47/2006 (BRASIL, 2006).

3.5.1 Plantas como fotoprotetores

A primeira substância pesquisada em relação ao efeito fotoprotetor foi o sulfato de quinina acidificado, em 1889. Após, várias substâncias surgiram com este intuito, entre elas, destacam-se, a esculina, o ácido tânico, o salicilato de benzila, os derivados do ácido p-amino benzóico, os derivados de 2-fenilimidazol, o ácido antranílico, os cinamatos, as cloroquinas e as benzofenonas (POLONINI et al., 2011). Observou-se, então, que estas substâncias eram capazes de prevenir o eritema solar, através da absorção da energia eletromagnética, surgindo os primeiros filtros solares no mercado. Porém, o seu uso tornou-se mais popular com o fim da Segunda Guerra Mundial, com o uso do ácido p-aminobenzóico (PABA) (RIBEIRO et al., 2004). Desde então, novos produtos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de potencializar o FPS de fotoprotetores e consequentemente a eficácia e proteção proporcionada, sem, contudo aumentar a concentração dos filtros solares presentes na (MILESI e GUTERRES, 2002).

Muitos extratos vegetais vêm sendo estudados no que se refere à proteção da pele, principalmente em relação aos efeitos sobre o fotoenvelhecimento. Isso se dá principalmente devido a constituição química das plantas, que muitas vezes apresentam compostos com ação fotoprotetora e/ou potencializadora de filtros solares sintéticos, além da atividade antioxidante associada. Desta forma, os extratos ricos em compostos fenólicos, em particular os flavonoides, estão sendo usados em formulações contendo filtros UV, pois com a comprovada ação antioxidante e fotoprotetora, podem ser empregados nestes produtos com a finalidade de absorver a radiação e neutralizar os radicais livres, intensificando o efeito protetor. Outros antioxidantes também são descritos para esta atividade como as vitaminas E e C, taninos e alcaloides (SOUZA et al., 2013).

Os flavonoides são capazes de absorver a radiação UV, pois estes apresentam dois picos máximos de absorção, um entre 240-280 nm e outro entre 300-550nm, o que demonstra que os vegetais que apresentam estes compostos em sua constituição, podem fornecer tanto proteção à planta, que será maior quanto mais alto o teor de flavonoides presentes, como ser utilizados como possíveis filtros solares em formulações fotoprotetoras. Outro aspecto relevante é que os flavonoides não apresentam absorção cutânea, ficando retidos na superfície cutânea e protegendo, desta forma, a pele contra a radiação solar (SOUZA, 2005).

Muitas vezes, o uso de substâncias isoladas, promove um baixo fator de proteção solar, o que torna necessário a associação de mais de um tipo de filtro solar com o objetivo de potencializar o fotoprotetor, sendo que, não só a composição dos filtros, mas também a constituição da formulação como um todo, interferem na eficácia final do produto (VELASCO et al., 2012).

Algumas plantas já citadas na literatura, que foram estudadas em relação ao FPS *in vitro*, incluem *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale (jacq.) Cass*, *Sonchus oleraceus* (ROSA et al., 2008), *Hancornia speciosa*, *Himatanthus obovatus*, *Macrosiphonia petraea*, *Macrosiphonia velame*, *Lafoensia pacari*, *Oxalis hirsutissima* (VIOLANTE et al., 2009) e *Malpighia glabra L.* (SOUZA et al., 2013).

3.6 Desenvolvimento e estabilidade de formulações semissólidas

Os géis hidrofílicos ou hidrogéis são muito utilizados em formulações cosméticas devido ao preparo relativamente simples e a fácil espalhabilidade. As substâncias que formam o gel, geralmente são polímeros, de alto peso molecular que, quando dispersos em água, doam viscosidade à preparação. Podem ser classificados em iônicos e não iônicos, de acordo com as características químicas do polímero. Os polímeros que formam géis não-iônicos, são mais estáveis a diferentes faixas de pH, podendo veicular ativos ácidos. Já os iônicos são pH dependentes e são estáveis em pH neutros ou próximos à neutralidade. Esse tipo de formulação não apresenta caráter gorduroso e pode incorporar ativos hidrossolúveis e lipossomas (CORRÊA et al., 2005).

Uma emulsão é o resultado da mistura de dois líquidos imiscíveis entre si e que são estabilizados através de uma substância denominada emulsionante. De acordo com as características da fase externa (contínua ou dispersante), podem ser classificadas como óleo em água (O/A), onde o óleo encontra-se disperso na água (dispersante) e água em óleo (A/O), onde a água é dispersa na fase oleosa (dispersante). As emulsões são amplamente utilizadas na formulação de produtos cosméticos, bem como em outras preparações farmacêuticas. Podem veicular

princípios ativos hidrossolúveis ou lipossolúveis de acordo com as características da formulação e da ação esperada (PIANOVISKI et al., 2008).

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos tem por finalidade a avaliação de parâmetros que podem indicar a validade do produto nas diferentes condições de armazenamento as quais são submetidos. Esses parâmetros são úteis para a determinação do material de acondicionamento e monitoramento das características físico-químicas da formulação (BRASIL, 2004). A determinação da estabilidade é importante, pois irá fornecer informações do comportamento do produto durante meses ou anos, permitindo o consumidor receba uma formulação em condições adequadas ao uso (MARIOTTI e FRASSON, 2011).

Segundo Isaac et al. (2008), o aumento da demanda por formulações cosméticas estáveis, seguras e eficazes tem exigido métodos cada vez mais complexos e eficientes para a avaliação da estabilidade de tais produtos. Todavia, o uso de espécies vegetais da flora brasileira tem levado ao desenvolvimento de novos produtos, em variadas formas cosméticas, o que pode prejudicar a padronização de métodos para avaliar a estabilidade dessas preparações.

Para os estudos de estabilidade, normalmente são empregadas diferentes condições de temperatura (elevada, baixa e ambiente), exposição à luminosidade e ciclos de congelamento e descongelamento em um determinado período de tempo (tempo de armazenamento) e os parâmetros a serem avaliados devem ser estabelecidos pelo formulador (BRASIL, 2004). De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos cosméticos (BRASIL, 2004), os parâmetros comumente avaliados incluem, as características organolépticas (aspecto, cor e odor), características físico-químicas (pH, viscosidade, densidade e monitoramento de componentes da fórmula) e ensaios microbiológicos.

Alterações no pH podem indicar a degradação de compostos presentes na formulação e comprometer o desempenho do produto ao longo do tempo. Desta forma, é um importante parâmetro a ser analisado, pois deve manter a estabilidade dos componentes da formulação, bem como ser compatível com a via de administração. Um produto mantém-se estável quando ocorrem pequenas variações do pH no tempo de armazenamento, não devendo ser muito diferente do pH medido

inicialmente, sendo que a perda gradual da estabilidade está correlacionada com o afastamento do pH do seu limite ótimo (FRANGE e GARCIA, 2009).

A viscosidade representa a resistência do fluido ao fluxo e desta forma, quanto maior a viscosidade, maior a resistência. Cada produto apresenta uma determinada viscosidade o que pode estar relacionado com o tipo de produto usado na produção da formulação, bem como das características do princípio ativo, podendo influenciar intimamente a estabilidade física da formulação e sua interação com a pele, como a liberação do ativo do veículo e formação de filme (CORRÊA et al, 2005). O aumento da temperatura é um fator que contribui para a redução da viscosidade das formulações, observados nos testes de estresse térmico, o que permite demonstrar sinais de instabilidade como cremação, sedimentação e separação de fases (VELASCO et al., 2008).

A determinação da espalhabilidade é uma característica essencial para as formulações semissólidas, pois representam a relação da formulação com o local de ação das mesmas. Desta forma, a espalhabilidade é definida como a expansão de uma formulação de aspecto semissólido sobre uma superfície em função do peso aplicado, em um determinado período de tempo (BORGHETTI e KNORST, 2006). Essas determinações são importantes, pois, dependendo das características reológicas do produto, ele poderá ser utilizado na pele em menor ou maior quantidade, o que se torna importante quando é levada em consideração a presença de lesões e redução do consumo com a mesma eficácia. Observa-se ainda, que as formulações obtidas por processos a frio apresentam melhores características de espalhabilidade que aquelas preparadas a quente (BORELLA et al., 2010).

Um fitocosmético é considerado uma formulação que contém um ativo natural de origem vegetal, responsável pela atividade do produto e, desta forma, deve passar por todas as fases de pesquisa e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade para garantir a sua atividade desde a fabricação até o fim do período de validade (ISAAC et al., 2008).

APRESENTAÇÃO

Os resultados dessa dissertação estão organizados na forma de dois manuscritos, que estão formatados de acordo com as normas dos periódicos aos quais serão submetidos. Dessa forma, os itens materiais e métodos, resultados e discussão e referências bibliográficas estão descritos nos manuscritos.

4 RESULTADOS

MANUSCRITO 1 – Será submetido ao periódico Natural Products Communication

Phytochemical evaluation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacity of leaves of *Calendula officinalis* L.

Deuschle, Viviane Cecilia Kessler Nunes^{a*}; Deuschle, Regis Augusto Norbert^a; Piana, Mariana^a; Boligon, Aline Augusti^a; Bortoluzzi, Mariana Rocha^b; Dal Prá, Valéria^b; Dolwitsch, Carolina Bolssoni^b; Lima, Fernanda^b; Carvalho, Leandro Machado^b; Athayde, Margareth Linde^a

Phytochemical evaluation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacity of leaves of *Calendula officinalis* L.

Deuschle, Viviane Cecilia KesslerNunes^{a*}; Deuschle, Regis Augusto Norbert^a; Piana, Mariana^a; Boligon, Aline Augusti^a; Bortoluzzi, Mariana Rocha^b; Dal Prá, Valéria^b; Dolwitsch, Carolina Bolssoni^b; Lima, Fernanda^b; Carvalho, Leandro Machado^b; Athayde, Margareth Linde^a

^aDepartment of Industrial Pharmacy (Phytochemical Research Laboratory), Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartment of Chemistry (Analysis chemistry laboratory – Lachem), Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*vivianenunes1@yahoo.com.br

Abstract

The *Calendula officinalis* L. is a plant widely used for its medicinal properties, mainly dermatological and ornamental. The goal of this study is to assess phytochemical elements from hydroethanolic raw extract from the leaves of calendula by spectrophotometry and thin layer chromatography (TLC), as well as identify and quantify components related to the antioxidant capacity by high performance liquid chromatographic (HPLC). Thereafter, mensuration of antioxidant capacity was performed by the method of DPPH, superoxide and hydroxyl radical. Also, the photoprotective capacity was measured by metering the Sun Protection Factor *in vitro* (SPF). The results displayed that the plant shows good antioxidant activity, which can be related to the presence of flavonoids (24.67 mg/g), polyphenols (33.90 mg/g) and condensed tannins (27.30 mg/g) and the amount of rutin (37.25 mg / g) and quercetin (6.09 mg/g) found in this study. The hydroethanolic extract from the leaves of *Calendula officinalis* L. presented a good antioxidant capacity probably due to the presence of polyphenols, flavonoids and tannins content. The amount of SPF (1,89 ± 0,05) found does not rate the plant as a sunscreen itself. However, more studies are needed to test the ability of potentiating sunscreens in cosmetic formulas.

Keywords: Calendula. Antioxidant. Phenolic Compounds. Photoprotection

Calendula officinalis L., popularly known as "marigold", is a plant of interest for ornamentation reasons and due to its medicinal properties. Belonging to the family Asteraceae, it is an annual plant, used for a long time in people's medicine as a remedy in the treatment of many diseases, mainly dermatological [1]. The flowers have a yellow-orange color and are used as a food, tea and spice dye. Furthermore, the dyes are used in the preparation of ointments and cosmetics [2].

Among its constituents the phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids), saponins, carotenoids and triterpene alcohols are presented [3-4]. Flavonoids found include quercetin, rutin, narcissin, isorhamnetin and kaempferol [5]. It is widely used in cosmetic formulations due to its moisturizing properties in solar products. Also, the extract of the flowers is used as a healing and an anti-inflammatory [6].

Studies conducted with different extracts of calendula have demonstrated the anti-tumor, anti-inflammatory, healing and antioxidant properties [5-7]. Also, the angiogenic activity of the ethanol extract and hexanic and dichloromethane fractions of *C. officinalis* L. was tested, considering the healing properties attributed to the plant, and it was observed that it had a positive effect on angiogenesis, inducing neovascularization [8].

The antioxidant capacity of the extract of the flowers *C. officinalis* L. *in vitro* was demonstrated by the DPPH method, and also through the exposure to UVB radiation on the skin of mice after oral administration, observing thus that the protection of the skin was determined by preventing the depletion of glutathione (GSH) [5].

Topical formulations containing 4% or 5% of the essential oil of calendula, applied before the exposure to UVB radiation, can protect the skin against damage and prevent the formation of reactive oxygen species [9]. Polysaccharides were isolated by fractionation of calendula in ethanol, which showed anti-tumor activity [3]. It is also described the presence of lutein, lycopene, and xanthophylls, which contributes to the anti-oxidant and anti-inflammatory effects [10].

Therefore, the objective of this work is to perform a phytochemical evaluation of hydroethanolic extract from the leaves of *Calendula officinalis* L. and to test their antioxidant and photoprotective capacity *in vitro*.

Qualitative analysis by TLC was determined by the presence of alkaloids, terpenoids, saponins and volatile oils in the hydroethanolic extract. Results showed the presence of all classes of the compounds measured (Table I). Previously other works identified that the flowers of *C. officinalis* contain saponins and terpenes [6-11].

Table 1: Alkaloids, Terpenids, Saponins and Oils Voltile in hidroethanolic extract of leaves *C. officinais* L. by thin layer chromatography (TLC)

Secondary metabolite	Results
Alkaloids	POS
Terpenoids	POS
Saponins	POS
Oils volatile	POS

POS indicates positivity to the class of secondary metabolite evaluated and NEG indicates negativity

The hydroethanolic extract of marigold leaves showed 33.90 mg/g of total polyphenols, 24.67 mg/g of total flavonoids and 27.30 mg/g of condensed tannins, as shown in Table 2. According to [5], the extract of marigold flowers presents amounts of 28.6 mg/g of total polyphenols and 18.2 mg/g of total flavonoids. Therefore, the results obtained by the hydroethanolic extract in the present work were higher than the numbers that the literature points to the flowers.

The flowers of *C. officinalis* are well known for their anti-inflammatory, antipyretic, antitumor and healing effects [10-12] as well as antioxidant activity [13]. These activities can be related to the chemical composition of the plant, especially to the presence of flavonoids and polyphenols [4-14]. According to the results obtained by the hydroethanolic extract, it is suggested that it can also exhibit a potential antioxidant and anti-inflammatory effect, like it was observed in the flowers. Using leaves provides the advantage of obtaining a greater quantity of plant material than

the quantity obtained with flowers, and hence greater amount of extract for processing, optimizing and thereby preparing dosage forms. On the determination of tannins, it was found a concentration of 27.30 mg/g (Table 2). It was described a concentration of 6-10 % tannin concentration in marigold flowers, but it did not evaluate its presence in the leaves [15]. Another study reported the concentration of 10.83 mg CE/g in the extract from the flowers *Viola tricolor* [16]. Thus, the value discovered from *C. officinalis* leaves is higher. Due to the scarcity of data in the literature regarding the determination of condensed tannins in the leaves of *C. officinalis*, this is an important result in this study, since it is known that tannins are secondary metabolites present in some plant species responsible for anti-inflammatory, antimicrobial agents, free radical scavengers, among others [17]. Therefore, it may be related to the good result obtained for the determination of antioxidant capacity in this study.

Table 2: Spectrophotometric assay for determination of total amount of polyphenols, flavonoids and tannins of hidroethanolic extract of leaves *C. officinalis* L.

Secondary metabolite	Amount \pm SD
Polyphenols	33,90 mg of GAE/g extract \pm 0,07
Flavonoids	24,67 mg of QUE/g extract \pm 0,40
Condensedtannins	27,30 mg of CE/g extract \pm 1,48

Results are expressed as mean \pm relative standard deviation (SD). GAE: gallic acid equivalents, QUE: quercetin equivalents, CE: catechin equivalents.($n = 3$)

Rutin and quercetin were identified and quantified in the hydroethanolic extract by HPLC (Figure 1). The values were 37.25 mg/g and 6.09 mg/g, respectively. Rutin is known for having antiplatelet, antiviral, antihypertensive [18-19] and antioxidant effects [20], being used for venous and lymphatic insufficiency, capillary fragility [21] and also as a protector from the sun's damage [22]. Quercetin is a flavonoid that

occurs naturally in plants, with important effects on oxidative stress [23], its high antioxidant activity in plants and foods is proven [24]. Thus, the presence of quercetin and rutin in the hydroethanolic extract can be related to the antioxidant activity obtained in this work.

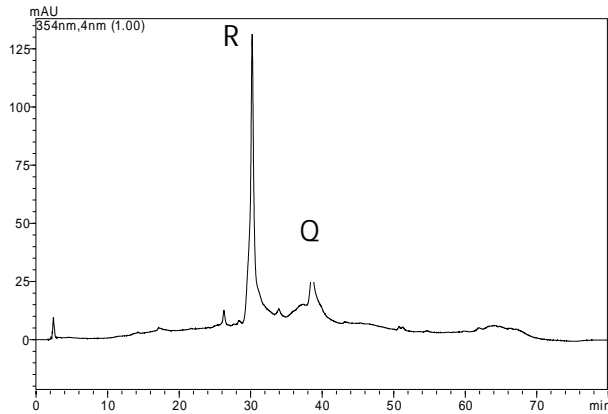


Figure 1: Chromatogram of the quantification of rutin (R) and the quercetin (Q) in the hydroethanolic extract of leaves *C. officinalis* L.

The antioxidant capacity was evaluated using DPPH method, which is a stable free radical, used as substrate, producing a violet coloring solution. In the presence of antioxidants, the coloring of the solution is reduced, ranging from violet to yellow [25-26]. In this study, it was found that the sample exhibited good antioxidant capacity of the extract compared to ascorbic acid and rutin, used as standards (Figure 2). It is known that phenolic compounds show various biological effects, and among them, there is the antioxidant activity, due to their chemical structure and reducing ability, playing an important role in the capture and neutralization of free radicals. An antioxidant substance is able to retard or inhibit oxidation of the substrate even at low concentrations [27]. Thus, the hydroethanolic extract of *C. officinalis* leaves, which for the lowest concentration used (7.81 $\mu\text{g/mL}$) gave an inhibition of 79.84 %, exhibited an excellent antioxidant capacity *in vitro*. With the same concentration, ascorbic acid showed an inhibition of 14.93%, and 62.44 % for rutin. According to [26-27], the percentage of antioxidant capacity for this method is the amount consumed by DPPH, and the greater this percentage is, the greater the ability of the sample in scavenging free radicals is. The inhibitory concentration (IC_{50}) [26-27] was determined using the equation of standard line, and it was observed that, with ascorbic acid, the value of IC_{50} was 16.57 $\mu\text{L/mL}$, but with the hydroethanolic extract

of the leaves of *C. officinalis* and rutin, the IC_{50} was less than 7.81 $\mu\text{L/mL}$, which was the lowest concentration tested, and cannot be determined by this method. The IC_{50} values correspond to the lowest concentration of the tested sample capable of causing corresponding inhibition [26].

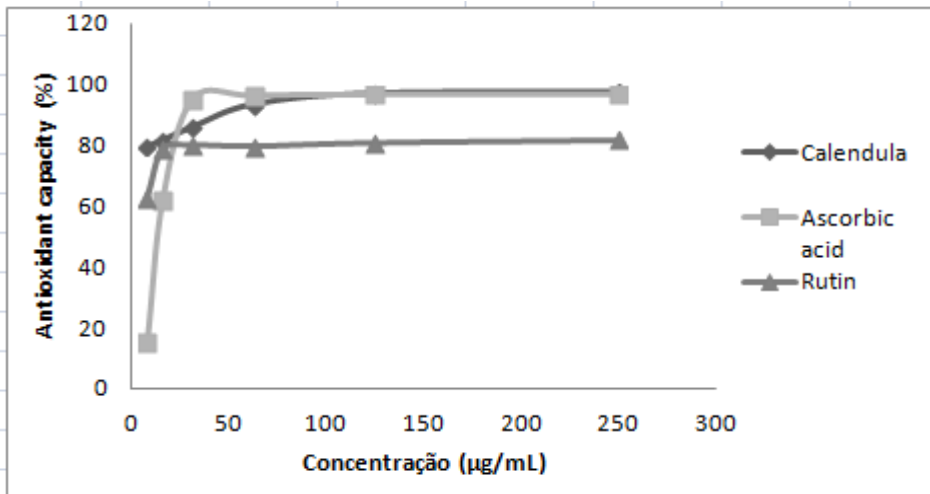


Figure 2: Antioxidant capacity of the hydroethanolic extract of *C. officinalis*, ascorbic acid and rutin standard the evaluated by the DPPH method. ($n = 3$).

Phenolic compounds, the products of the Maillard reaction and sulfites, are the main endogenous antioxidants [28]. Among the phenolic compounds, tannins and flavonoids stands out with their well-known antioxidant and antiradical activities. Due to the presence of those compounds in the extract of *C. officinalis*, we performed the methods of superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radical (HO^{\bullet}). Results showed a good antiradical activity against the hydroxyl radical, because the concentration of 31.25 $\mu\text{g/mL}$ of the extract showed an inhibition of 61.24% (Table 3). The ability to isolate the hydroxyl radicals is important because these radicals are related to lipid peroxidation [28]. The antiradical activity against superoxide anion inhibition was low, indicating that the plant has no activity for this radical.

Table 3: Antioxidant capacity by the method of hydroxyl radical and superoxide anion radical of the hydroethanolic extract of the *Calendula officinalis* L. leaves.

Extract ($\mu\text{g/mL}$)	Radical Hidroxila (%) \pm SD	Superóxide Anion Radical (%) \pm SD
250	76,05 \pm 2,67	4,27 \pm 0,94
125	71,00 \pm 0,89	2,54 \pm 0,98
62.5	66,60 \pm 8,02	6,64 \pm 2,38
31,25	61,24 \pm 1,33	7,13 \pm 0,22
15.62	39,18 \pm 3,12	6,94 \pm 1,42
7,81	26,26 \pm 0,89	6,81 \pm 1,82

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). (%) Inhibitory capacity. ($n=3$)

Sunscreens are substances used in photoprotective formulations, and they can be classified as organic and inorganic. Organic filters can be either natural or synthetic, and are capable of absorbing ultraviolet radiation [29]. One of the current trends in cosmetology is the development of products with the most natural ingredients possible. Thus, in this study we evaluated the *in vitro* photoprotective capacity in the hydroethanolic extract of *C. officinalis*, in order to use it in cosmetic formulations for this purpose. It has been demonstrated that plant assets used in cosmetic and pharmaceutical formulations have ability to absorb ultraviolet light [30]. For a substance to be considered a sunscreen, it must exhibit an SPF higher than 2 [31]. The result of $1.89 \pm 0,05$ for the SPF demonstrated that this plant is not a sunscreen itself [32], but compared to results obtained with other plant extracts, such as those reported by [30], where the *Macrosiphonia velame* extract showed an *in vitro* SPF of 0.36, this value is considerably high, and this may be used in combination with other synthetic sunscreens in order to enhance the protective effect of natural cosmetic appeal.

This preliminary work aimed at an evaluation of phytochemical plant for later use in

cosmetic formulations due to the current trend of using natural extract sin cosmetics and sunscreens.

The hydroethanolic extract of *C. officinalis* L. showed good antioxidant activity by the method of DPPH and hydroxyl radical. This result may have occurred due to the presence of flavonoids and polyphenols found in the plant. The presence of condensed tannins and the identification of rutin and quercetin may have contributed to this activity. The photoprotective capacity reveals that this plant cannot be used as sunscreen itself, but more studies are needed to determine a possible potentiatingability of synthetic sunscreen.

Experimental

General: All reagents used were of analytical grade. Ethanol, methanol, vanillin and gallic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-ciocalteau, 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), rutin and catechin were purchased from Sigma chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals and reagents were also of analytical grade and purchased by Federal University of Santa Maria (UFMS).

Collection and extraction of plant: Leaves of *Calendula officinalis* L. were collected in December 2012 in the city of Montenegro, Rio Grande do Sul. Botanical identification was performed at the Department of Biology at the University of Cruz Alta – UNICRUZ, where a voucher specimen is deposited in the Herbarium of Poisonous and Medicinal plants under the number 1097.

Fresh leaves were separated from the flowers, coarsely divided, and submitted to dryness in an oven with air circulation, under 45° C, for 3 days. The dried plant was reduced to powder in a knife mill. The powder was submitted to purification with n-hexane prior to extraction, in order to eliminate lipophilic interfering substances, by means of maceration at ambient temperature by 7 days. After the removal of n-hexane, the plant material was submitted to extraction with hydroethanolic solvent (ethanol:water 70:30, V/V), also by maceration at ambient temperature during 7 days, with periodic shaking. After that period, the extraction liquid was filtered and more hydroethanolic solvent was added to the plant material, being the procedure

described above repeated for more 7 days. After reuniting both filtrates, they were concentrate under reduced pressure for ethanol removal, and then submitted to lyophilization until complete dryness. Resulting product was named hydroethanolic extract.

Analysis of alkaloids, terpenoids, saponins and essential oil by thin layer chromatography (TLC): Phytochemical screening was performed on both extracts in order to detect essential oils components, terpenoids, saponins and alkaloids by thin layer chromatography (TLC) [33]. Solid phase consisted in aluminum TLC plates coated with silica-gel 60 with F254 fluorescent indicator. Mobile phases consisted in specific mixtures of solvents for each class of substances. Standards were applied for comparison. After elution, results were observed under visible light, UV 254 and 365 nm, and after sprayed with specific indicators.

Analysis of polyphenols, flavonoids and condensed tannins for spectrophotometric: The determination of phenolic compounds was performed by the Folin-Ciocalteu method, as described by [34] with some modifications. For this, the sample was diluted to a concentration of 0.150 mg/ mL in water and added to 2 mL of sodium carbonate solution 20%. After 5 minutes, it was added 0.5 mL of 2N Folin-Ciocalteu. The solution was incubated for 10 minutes and the absorbance was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 730 nm in triplicate. The total polyphenol content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry plant, based on the calibration curve of gallic acid.

The total flavonoid content was established according to the method described by [35]. The sample was diluted to a concentration of 1 mg/mL in methanol. A 0.5 mL sample was added 0.5 mL of aluminum chloride to 2% and 2.5 mL of methanol. After 30 minutes, the absorbance was read at 420 nm. Tests were performed in triplicate and for the calculation of the assay standard curve, it was used quercetin. The levels of flavonoids were determined in milligrams of quercetin per gram of dry plant.

The determination of tannins was carried out using the method described by [36] with

some modifications. The sample was diluted to a concentration of 25 mg/mL in methanol. A 0.1 mL sample was added 0.9 mL of methanol followed by 2.5 mL of vanillin solution (1 g vanillin diluted in 100 mL of methanol) and 2.5 mL of a solution containing 8 mL of hydrochloric acid concentrate diluted in 100 mL of methanol. The solution was heated at 60°C for 10 minutes and the absorbance was determined at 500 nm. Analyses were performed in triplicate. The total tannin content was expressed as milligrams of catechin equivalents per gram of dry plant, based on the standard curve of catechin.

Identification and assay of quercetin and rutin by HPLC: Were performed using the method described by [37] slightly modified. High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV–VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. Reverse phase: chromatographic analyses were carried out under gradient, conditions using a C18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase A was using water containing 2.0% acetic acid and mobile phase B was using methanol. The mobile phase was filtered through a 0.45 µm membrane filter and then degassed by an ultrasonic bath prior to use. Standard reference solutions of quercetin and rutin were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.00625 – 0.250 mg/mL and 0.0031 – 0.250 mg/ml, respectively. The hydroethanolic extract of marigold was also dissolved in the mobile phase. All solutions and samples were first filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore). The chromatographic peaks were confirmed by comparing their retention time and Diode-Array-UV spectra with those of the reference standards. Isolated compound was quantified at 327 nm and 356 nm, respectively. The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 40 µl. All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Antioxidant capacity in vitro

Method DPPH: In order to evaluate the antioxidant capacity, it was used the DPPH method (2,2-diphenyl -1 - picrylhydrazyl) [38] in concentrations of 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81 $\mu\text{g/mL}$, dissolved in ethanol. On the 2.5 mL of each sample, 1 mL of 0.3 mM DPPH solution dissolved in ethanol was added. After 30 minutes, the readings were made in a spectrophotometer at 518 nm. A solution of DPPH (1 mL, 0.3 mM) dissolved in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control. The ascorbic acid and rutin were used as standard (positive control), in the same concentrations of the samples. Ethanol was used to zero the spectrophotometer, with the white test solutions of each sample (without addition of DPPH), to minimize interference from the components in a sample reading. The assay was performed in triplicate and the antioxidant capacity was calculated with the equation:

$$\% \text{Inhibition} = 100 - [(\text{Abs sample} - \text{Absblank}) \times 100] / \text{Abscontrol}$$

Where: Abs sample is the absorbance of the test; Abs blank is the absorbance of the blank and Abs control is the absorbance of DPPH solution in ethanol.

We calculated the percentage of inhibition of DPPH and built a graph of percentage inhibition versus the concentration of the extract. The calculation of IC_{50} was performed using Microsoft Office Excel 2007 program, using the equation of the line of standards and sample.

Method of superoxide anion radical ($\text{O}_2^- \bullet$): Assessment of the ability to scavenge free radicals in relation to the superoxide radical. It is based on the generation of radical $\text{O}_2^- \bullet$ - through the system by enzymatic reaction catalyzed by the enzyme hypoxanthine xanthine oxidase [28]. A sample (100 μL) was added to the reaction solution containing 100 μL of 30 mM EDTA, 100 μL of 3 mM HPX, and 200 μL of 1.42 mM NBT. After, the solution has been preincubated at ambient temperature for 3 minutes, and 100 μL of 0.75 U/mL XOD was added to the mixture, with the volume being brought up to 3 mL with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4). The final solution was, then, incubated at ambient temperature for 40 minutes and

absorbance was measured at 560 nm. The analyses were performed in triplicate form. The activity of superoxide radical scavenges was calculated using the equation:

$$\text{O}_2^- \bullet \text{ capacity antioxidant (\%)} = [1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100$$

Where S, S_B, C_B and C are the absorbances of the sample, the background sample, control and blank control groups, respectively.

Method of the hydroxyl radical (HO •): The antiradical activity studies of samples and analytical standards at different concentrations with the hydroxyl radical was measured using the method of 2-deoxy-D-ribose proposed by [28] with some modifications. The FeCl₃ • 6H₂O and ascorbic acid were prepared in milli-Q water before use. In a test tube, which underwent the reaction was added 100 µL of the extract, 100 µL of 1 mM EDTA, 100 µL of 1 mM FeCl₃ • 6H₂O, 100 µL of 2-deoxy-D-ribose 36 mM 100 µL of 10 mM H₂O₂, and 100 µL of L-ascorbic acid 1 mM in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4). Thereafter, the volume was made up to 1.0 mL with phosphate buffer. Then, it was incubated at 37 ° C for 1 h, the reaction was stopped by adding 1.0 mL of 10% TCA (w / v) and 1.0 ml of 1.0% TBA (m / v) in phosphate buffer (pH 7.4). The mixture was heated in a water bath at 37°C for 15 min. The samples were cooled, the final volume adjusted to 5.0 mL with deionized water and the absorbance read at 532 nm. The analyses were performed in triplicate form. The antioxidant activity of the samples was calculated according to the equation below:

$$\text{OH} \bullet \text{ capacity antioxidant (\%)} = [1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100$$

Where S, S_B, C and C_B are the absorbance of the sample, the sample blank, control and blank control groups, respectively.

Determination of the sun protection factor (SPF) in vitro: To determine the SPF *in vitro*, calendula extract was dissolved in ethanol at a concentration of 0.2 µg/mL. The

sample was read at wavelengths from 290 to 320 nm (in increments of 5nm) in a spectrophotometer [39]. Calculation of SPF follows the formula proposed by [39] according to the equation:

$$\text{SPF (spectrometry)} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{abs}(\lambda)$$

Where CF = correction factor (= 10), determined in accordance with two known SPF sunscreens such that a cream containing 8% resulted in SPF 4 homosalato; EE (λ) = erythemogenic effect radiation wavelength (λ); I (λ) = intensity of the sunlight at a wavelength (λ); abs (λ) = sample absorbance at wavelength (λ). The values of EE (λ) and I (λ) was calculated by previously [40] as described in Table 4.

Table 4: Erythemogenic effect relationship(EE) versus radiation intensity(I) according to the wavelength (λ) [40].

λ (nm)	EE x I (normalized)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180

Acknowledgments -The authors thank the Chemical Analysis Laboratory-LACHEM for their assistance in making this project.

References

- [1] Wiktorowska E, Dlugosz M, Janiszowska W. (2010) Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 14–20.
- [2] Ercetin T, Senol FS, Orhan IE, Toker G. (2012) Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 36, 203–208.
- [3] Parente M, Matos G, Cunha LC, Leão AR, Paula JR, Júnior GV, Silveira NA. (2004) Pharmacognostic analysis of the dust and evaluation of the effect of the ethanolic extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. cultivated in Brazil in the immune system. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 1, 9-16.
- [4] Butnariu M, Coradini CZ. (2012) Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, 6, 35.
- [5] Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FTMC, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJV. (2010) Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 596–601.
- [6] Ciatadini-Zanette V, Negrelle RRB, Borba ET. (2012) *Calendula officinalis* L. (Asteraceae): Aspectos botânicos, ecológicos e usos. *Visão Acadêmica, Curitiba*, 13, 6-23
- [7] Agatonovic-Kurstin S, Loescher CM. (2013) Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of *Calendula officinalis* using high resolution plate imaging and artificial neural network data modeling. *Analytica Chimica Acta* [HTTP://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.048](http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.048)
- [8] Parente LML, Andrade MA, Brito LAB, Moura VMBD, Miguel MP, Lino-Júnior RS, Tresvenzol LFM, Paula JR, Paulo NM. (2011) Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 26, 19-24.

- [9] Mishra AK, Mishra A, Verma A, Chattopadhyay P. **(2012)** Effects of calendula essential oil-based cream on biochemical parameters of skin of albino rats against ultraviolet B radiation. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 669–683.
- [10] Saini P, Al-Shibani N, Sun J, Zhang W, Song F, Gregson KS, Windsor LJ. **(2012)** Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. *Homeopathy*, 101, 92- 98.
- [11] Hamburger M, Adler S, Baumann D, Forg A, Weinreich B. **(2003)** Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 74, 328–338.
- [12] Bortoldo DPG, Marques PAA, Pacheco AC. **(2009)** Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, 11, 435-441.
- [13] Shivasharan BD, Nagakannan P, Thippeswamy BS, Veerapur VP. **(2012)** Protective effect of *Calendula officinalis* L. flowers against monosodium glutamate induced oxidative stress and excitotoxic brain damage in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28, 292-298.
- [14] Borella JC, Ribeiro NS, Teixeira JCL, Carvalho DMA. **(2010)** Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31, 193-197.
- [15] Re TA, Mooney D, Antignac E, Dufour E, Bark I, Srinivasan V, Nohynek G. **(2009)** Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1246–1254.
- [16] Piana M, Zadra M, Brum TF, Boligon AA, Gonçalves AFK, Cruz RC, Freitas RB, Canto GS, Athayde ML. **(2012)** Analysis of rutin in the extract and gel of *Viola Tricolor*. *Journal of chromatographic science*, 51, 406-411.
- [17] SIMÕES, C.M.O. et al. **(2010)** Farmacognosia, da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: Editora UFRGS.

- [18] Lee W, Ku SK, Bae JS. **(2012)** Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 50,3048–3055.
- [19] Li F, Ning S, Li Y, Yu Y, Shen C, Duan G. **(2012)** Optimisation of infrared-assisted extraction of rutin from crude flos *Sophorae immaturus* using response surface methodology and HPLC Analysis. *Phytochemical Analysis*, 23, 292 – 298.
- [20] Hubinger SZ, Cefali LC, Velloso JCR, Salgado HRN, Isaac VLB, Moreira. **(2010)** *Dimorphandra mollis*: uma alternativa como fonte de flavonoides de ação antioxidante. *Latin America Journal of Pharmacy* 2010, 29: 271-274.
- [21] Baby AR, Haroutiounian-Filho CA, Sarruf FD, Tavante-Júnior CR, Pinto CASO, Zague V, Arêas EPG, Kaneko TM, Velasco MVR. **(2008)** Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 235-248.
- [22] Velasco MV, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto CASO, Kaneko TM, Baby AR. **(2008)** Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Latin America Journal of Pharmacy*, 27, 23-27.
- [23] Prince P, Stanely M, Sathya B. **(2012)** Protective effects of quercetin on mitochondrial oxidative stress in isoproterenol induce myocardial infarcted rats: an *in vivo* and *in vitro* study. *Food research International*, 49, 233-241.
- [24] Luehring M, Blank R, Wolfram S. **(2011)** Vitamin E-sparing and vitamin E-independent antioxidative effects of the flavonol quercetin in growing pigs. *Animal and Feed Science and Technology*, 169, 199-207.
- [25] Iha SM, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Isaac VLB, Brunetti IL, Corrêa MA, Salgado HRN. **(2008)** Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 387-393.

- [26] Jothy SL, Zuraini Z, Sasidharan S. (2011) Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract. *Journal of Medicinal Plants Research*,5,1941-1947.
- [27] Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr. GM, Ayres MC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *QuimicaNova*,30,351-355.
- [28] Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, Lin Y, Fan W.(2006)Effects of extraction solvent mixtures and antioxidant activityevaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*HordeumvulgareL.*).*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54,7277-7286.
- [29] Galano A, Vargas R, Martinez A. (2010) Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxideradical anion.*Physical Chemistry Chemical Physics*, 12,193–200.
- [30] Polonini HC, Raposo NRB, Brandão MAF. (2011)Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção de câncer de pele. *Revista APS*,14,216-223.
- [31] Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. (2009) Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *BrazilianJournalofPharmacognosy*,2A, 452-457.
- [32] **Resolução RDC n.237 de 02 de agosto de 2002.** Diário Oficial da União, Brasília, Brazil, 26 agosto, 2002.
- [33] Wagner H, Bladt S. (1996)PLant Drug Analysis. 2ª Ed., Berlim.Springer-Verlag.
- [34] Chandra S, De Meija EG. (2004)Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinonereductase activity of an aqueous extract of *Ardisiacompressa* incomparision to mate (*Ilex paraguayensis*)and green (*Camellia sinensis*) teas.*Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 52, 3583–3589.

- [35] Woisky RG, Salatino A. **(1998)** Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37,99-105.
- [36] Morrison IM, Asiedu EA, Stuchbury T, Powel AA. **(1995)** Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats. *Annals of Botany*, 76,287-290.
- [37] Evaristo IM, Leitão MC. **(2001)** Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus súber* L.; *Silv Lusitana*, 9,135-141.
- [38] Choi CW, Kim SC, Hwang, SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. **(2002)** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163, 1161–1168.
- [39] Mansur JS, Breder MNR, Mansur ACA, Azulay RD. **(1986)** Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61,121-124.
- [40] Sayre R M, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E. **(1979)** Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formula. *Photochemistry and Photobiology*, 29,559-566.

MANUSCRITO 2- Será submetido ao periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Science

EVALUATION OF PHYSICAL CHEMISTRY STABILITY, SPREADABILITY AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTECTIVE CAPACITY TOPICAL FORMULATIONS CONTAINING EXTRACT OF LEAVES *Calendula officinalis* L

Deuschle, VCKN; Deuschle, RAN; Bortoluzzi, MR, Athayde, ML

EVALUATION OF PHYSICAL CHEMISTRY STABILITY, SPREADABILITY AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTECTIVE CAPACITY TOPICAL FORMULATIONS CONTAINING EXTRACT OF LEAVES OF *Calendula officinalis*
L

Deuschle, VCKN^{1*}; Deuschle, RAN¹; Bortoluzzi, MR¹, Athayde, ML¹

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria.

*AV. Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Centro de Ciências da Saúde, Prédio 26, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria–RS

e-mail: vivianenunes1@yahoo.com.br

ABSTRACT

Calendula is widely used in cosmetic formulations, presenting phenolic compounds in their chemical constitution. Thus, the objective of this research was to develop and evaluate the stability of topical formulations containing 5% hydroethanolic extract of calendula leaves, as well as its spreadability, photoprotective and antioxidant capacity *in vitro*. To evaluate the stability, the following parameters were used: organoleptic characteristics, pH and viscosity. Antioxidant capacity was measured by the DPPH (2,2-diphenyl -1 - picrylhydrazyl) method, and photoprotective capacity by spectrophotometric measure of SPF. For tested formulations, it was found that showed a good stability. The formulations of gel and cream with calendula extract showed no significant variations in pH and cream showed the lowest viscosity variations than gel. The spreadability of the gel formulations was superior to the cream. The formulations also showed good antioxidant capacity and an FPS around 1.75. According to the results, the formulation can be used with antioxidant purpose, but when considering the SPF obtained, calendula cannot be considered as a sunscreen itself, but may be tested in future studies to verify the enhancement of synthetic sunscreens .

Uniterms: Stability. Spreadability. Calendula. Antioxidant. SPF. Fotoprotector. Formulation.

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA, ESPALHABILIDADE E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA *IN VITRO* DE
FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Calendula
officinalis* L**

RESUMO

A calendula é amplamente utilizada em formulações cosméticas, apresentando compostos fenólicos em sua constituição química. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver e avaliar a estabilidade de formulações tópicas contendo 5% de extrato hidroetanólico das folhas de calendula, bem como a espalhabilidade, capacidade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* nas mesmas. Para a avaliação da estabilidade, foram usados parâmetros como a verificação das características organolépticas, pH e viscosidade. A capacidade antioxidante foi verificada pelo método do DPPH (2,2-difenil,1- picrihidrazila) e a capacidade fotoprotetora pela medida espectrofotométrica do FPS. Para as formulações testadas, observou-se que apresentaram uma boa estabilidade. As formulações de creme e gel com extrato de calendula não apresentaram variações significativas nos valores de pH e o creme apresentou as menores variações de viscosidade em relação ao gel. A espalhabilidade das formulações de gel foi superior à do creme. As formulações também apresentaram uma boa capacidade antioxidante e um FPS em torno de 1.75. De acordo com os resultados, a formulação pode ser utilizada com ação antioxidante, porém com o FPS obtido, a calendula não pode ser considerada um filtro solar isolado, mas poderá ser testada em estudos futuros para verificar a potencialização de filtros solares sintéticos.

Unitermos: Estabilidade. Espalhabilidade. Calendula. Antioxidante. FPS. Fotoproteção. Formulação.

INTRODUCTION

The *Calendula officinalis* L. displays anti-inflammatory and antiseptic effects, and has been used in various ulcerations of skin and eczema. Decoction and tincture from flowers has been used in preparations for burns, cuts, wounds, rashes and bruises, among others (Fonseca et al., 2010a). Other activities also described for this plant are anti-fungal, anti-edema and anti-diabetic (Agatonovic-Kustrin and Loescher, 2013a).

It is widely used in cosmetic formulations due to their moisturizing properties in solar products. The extract from flowers is used as a healing and anti-inflammatory concentrations ranging from 1.0 to 2.0 g of dried flower per 150 mL of water (Citadini - Zanette et al., 2012).

In its constitution, presents phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids), saponins, carotenoids, triterpenic alcohols, steroids, terpenoids and triterpenoids (Butinariu and Coradini, 2012; Agatonovic-Kustrin and Loescher, 2013b), which may be related to its antioxidant capacity.

It is known that the skin is an organ where aging effects are most prominent, and also occurs gradually over the human body. Among many theories that attempt to explain the aging process, one of the most suitable refers to the production of free radicals (Mariotti and Frasson, 2011a). The process of skin aging can, however, be accelerated by several factors, the most common being the harmful effects caused by UV radiation, which can favor the production of reactive oxygen species (ROS), extremely harmful to cells, and significantly reduce the endogenous antioxidants, facilitating the attack over important structures such as cell membranes, proteins, carbohydrates and nucleic acids (Souza et al., 2013). Considering these aspects, it is a concern for the area of cosmetology the research and development of new antioxidant formulations in order to prevent and mitigate the effects of aging manifested on the skin surface (Mariotti and Frasson, 2011b).

The use of natural extracts in cosmetic formulations, designated phytocosmetics, has been widely used, requiring, therefore, their characterization, as well as take into account aspects related to their physical and chemical stability when it is incorporated into the formulation. Tests of physical and chemical stability of

phytocosmetic are important parameters that must be considered in the process of preparation, storage and application of formulated products (Isaac et al., 2008a).

Natural products have some structural similarity to synthetic sunscreens, and may thus provide photoprotective action and can be used in formulations for this purpose (Violante et al., 2009a).

In this research, the goals were the development of cosmetic formulations in the form of cream and gel for incorporation of the hydroethanolic extract from the leaves of *C. officinalis* L., and to evaluate physical and chemical stability, spreadability, photoprotective and antioxidant capacity *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

The analysis was performed on Shimadzu spectrophotometer (UV-1201), potentiometer Denver Instrument (Modelo UB-10), viscometer Brookfield (Modelo1) and centrifuge Centerbio (Modelo TDL 80-2B). All reagents used in this study were of analytical grade. The octyl stearate, butylhidrytoluene (BHT), parabens (methylparaben and propylparaben) were acquired from Galena. Self emulsifying was non ionic, disodium EDTA, imidazolidinyl urea, propyleneglycol and hidroxyethylcellulose were acquired from Fagron.

Extraction

Leaves of *Calendula officinalis* L. were dried in an oven with air circulation, crushed in a Wiley mill and subjected to maceration with a hydroethanolic solvent (EtOH:H₂O, 3:2, v/v), being subjected to daily manual agitation for a period of seven days (first maceration). At the end of this period the material was filtered through cotton and concentrated on a rotary evaporator at a temperature lower than 40 °C, to eliminate the ethanol. The plant material was again covered with a further volume of the same solvent (second maceration). This second extraction liquid, after seven days, was filtered, concentrated and pooled with the first, thus obtaining the crude extract (Simões et al., 2010). Subsequently the extract was lyophilized for dryness.

Preparation of formulations

Were added 5% of the hydroethanolic extract of *Calendula officinalis* L. based formulations previously developed (Fonseca et al., 2010b). The basis for incorporation of hydroethanolic extract of *Calendula officinalis* L. were formulated according to the National Formulary (Brazil, 2005) and their composition are described in tables I and II.

Formulations were designated as: CRBL (blank cream, without extract), CRC (calendula cream), GBL (blank gel, without extract) and GC (calendula gel).

TABLE I - Composition of the cream formulation base (g).

Components	Amounts
Oil phase	
Octyl stearate	6.00g
Self-emulsifying wax nonionic	14.00g
Butylhydroxytoluene (BHT)	0.05g
Aqueous phase	
Disodium EDTA	0.05 g
Water	qs 100mL
Complementary phase	
Preservative parabens	3.30 mL
Preservative imidazolidinyl urea solution at 50%	0.60 mL

The oil phase was heated to 75 °C and the aqueous phase at 80 °C. The aqueous phase was then mixed to the oil phase under stirring. After cooling to approximately 40 °C, the complementary phase was added.

TABLE II- Composition of the gel formulation base (g).

Components	Amounts
Preservative parabens	3.30 g
Propyleneglycol	5.0 g
Dissodium EDTA	0.1 g
Hydroxyethylcellulose	2.0 g
Water	qs 100 mL
Solution imidazolidinyl urea preservative at 50%	0.60 mL

Hydroxyethylcellulose was added in water under stirring until complete dispersion. EDTA was previously dissolved in a sufficient amount of water and added to the dispersion. The parabens were then added, solubilized in propyleneglycol, followed by imidazolidinyl urea solution while cooling down to approximately 40 °C.

Stability evaluation

The determination of the physical and chemical stability of the formulations and was conducted in accordance with the Guide to stability of cosmetics. Before the start of the stability tests, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) recommends that the formulation is subjected to centrifugation test. For this purpose, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. After this test, the sample should remain stable, indicating that the product has been approved at this stage and may go for subsequent phases. For this test, which lasted ninety days, the samples were submitted to heating in an oven (50 ± 2 °C), cooling in refrigerator (5 ± 2 °C) and kept at room temperature (25 ± 2 °C) (Brazil, 2004a).

During this period organoleptic characteristics were determined following the scale according table III (Mariotti and Frassonl, 2011c). pH values were determined by dispersing an aliquot of each formulation in distilled water (10%, w/v), in triplicate. Viscosity was determined in room temperature the 25 ± 2 °C with spindle 4 and speed 12, in triplicate. All readings were done at time zero and after 7, 15, 30, 60 and 90 days (Brazil, 2004b).

TABLE III - Scale to evaluate the organoleptic characteristics.

1	No visible change – no change in color or appearance
2	Mild loss of color
3	Total loss os color
4	Evidence of inconsistency and change in the appearance

Spreadability determination

This procedure was performed on samples at time zero and after 90 days, in triplicate, according the methodology described by Knorst et al (1991). This method uses a circular mold plate of glass (diameter = 20 cm, width = 0.2 cm) with a central orifice of 1.2 cm diameter, which is placed on a glass support plate (20 cm x 20 cm) positioned over a millimetric graph paper.

Each sample was introduced into the orifice of the die plate and the surface leveled with a spatula. The plaque mold was carefully removed and a glass plate of known weight was placed over the sample. After a minute, the diameter covered by the sample into two opposing positions was read, with the aid of the scale from the graph paper. Subsequently, we calculated the average diameter. This procedure was repeated successively adding other boards in one-minute intervals. The results were expressed as spreadability of the sample due to the applied weight, according to the equation below, which correspond to the mean of three determinations.

$$E_i = d^2 \cdot \pi/4$$

Where:

E_i = spreadability of the sample weight for a given i (mm^2);

d = diameter (mm).

Spreadability factor (S_f) was calculating the following equation:

$$S_f = A/W$$

Were:

S_f = spreadability factor

A = total area (mm^2)

W = total weight (g)

Determination of *in vitro* antioxidant capacity of the formulations by the DPPH method

Antioxidant capacity method was measured by the photocolorimetric DPPH (2,2-diphenyl 1 - picrylhydrazyl) method according Mariottil and Frasson (2011d). Samples were diluted at concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL in methanol. Then 2.5 mL of each sample were added to 1 mL of a 0.3 mM DPPH solution in methanol. After 30 minutes, the readings were made in a spectrophotometer at 517nm. A solution of 1 mL of 0.3 mM DPPH in 2.5 mL of ethanol was used as a negative control and cream and gel of rutin were used as standard (positive control), at the same concentrations of samples. Ethanol was used to zero the spectrophotometer, with the blank being solutions of each sample, but (without addition of DPPH. The assay was performed in triplicate, antioxidant activity was calculated according the equation:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{[(\text{Abs sample} - \text{Abs blank}) \times 100]}{\text{Abs control}}$$

Where: Abs sample is the absorbance of the sample formulations; Abs blank is the absorbance of the blank formulations, and without additions of DPPH control; Abs control is the absorbance of DPPH solution in methanol.

It was built a graph of percentage inhibition versus the concentration of the extract.

Calculation of the inhibitory concentration (IC₅₀) was carried out using the equation of a line from samples.

Determination of the sun protection factor *in vitro* (*in vitro* SPF)

The formulations were dissolved at a concentration of 0.2 µg/mL in ethanol and read in a spectrophotometer from 290 to 320 nm with 5 nm intervals (Mansur et al. 1986).

This procedure was performed on samples at time zero and after 90 days, in triplicate. Calculation of SPF follows the equation:

$$\text{FPS (spectrometry)} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{abs}(\lambda)$$

where:

CF = correction factor (= 10), determined in accordance with two known SPF sunscreens such that a cream containing 8% resulted in SPF 4

EE (λ) = erythemogenic effect radiation wavelength (λ)

I (λ) = intensity of the sunlight at a given wavelength (λ)

Abs (λ) = absorbance of the solution formulation containing sunscreen at a given wavelength (λ).

The values of EE (λ) and I (λ) were previously calculated by Sayre et al. (1979) as described in table IV.

TABLE IV. Erythemogenic effect (EE) versus radiation intensity (I) according to the wavelength (λ) (Sayre et al., 1979).

λ (nm)	EE x I (normalized)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180

Statistical analysis

The results of the determinations were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* multiple comparison Tukey test ($p \leq 0.05$). The analysis was performed using the Windows Excel 2007 program.

RESULTS AND DISCUSSION

After initial centrifuge test, performed with the CRBL, CRC, GBL and GC, it was observed that all samples remained stable after centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes. Organoleptic characteristics were evaluated during 90 days of storage and are described in table V according to the scale shown in table III.

TABLE V- Organoleptic characteristics of the gel and cream during the period of stability in days. (T0 – time zero; RT- room temperate; S-stove; R-refrigerator)

Formulation/Time	T0	7	15	30	60	90
CRBL						
RT	1	1	1	1	1	1
S	1	1	1	1	1	1
R	1	1	1	1	1	1
CRC						
RT	1	1	1	1	1	1
S	1	1	1	2	2	2
R	1	1	1	1	1	1
GBL						
RT	1	1	1	1	1	1
S	1	1	1	1	1	1
R	1	1	1	1	1	1
GC						
RT	1	1	1	1	1	1
S	1	1	1	1	2	2
R	1	1	1	1	1	1

(n=3) 1 No visible change-no change in color or appearance; 2 Mild loss of color.

Stability studies of cosmetic formulations are essential to establish some criteria for quality control, safety, and efficacy for consumer acceptance. Thus, these studies contribute to the development and improvement of formulations, establishing the validity and monitoring physical, chemical and microbiological characteristics (Isaac et al., 2008b; Gonçalves and Fields, 2009).

At the beginning of the experiment, CRC and GC presented homogeneous aspect, greenish color and characteristic plant odor. During storage at different temperature conditions, it was observed that the color, appearance and odor did not change and are classified as "1" according to the scale used for organoleptic characteristics. Only CRC and GC stove samples presented a mild loss of color after 30 and 60 days, respectively.

pH determinations performed in formulations CRBL and CRC are shown in figure 1 and pH determinations in formulations GBL and GC are shown in figure 2.

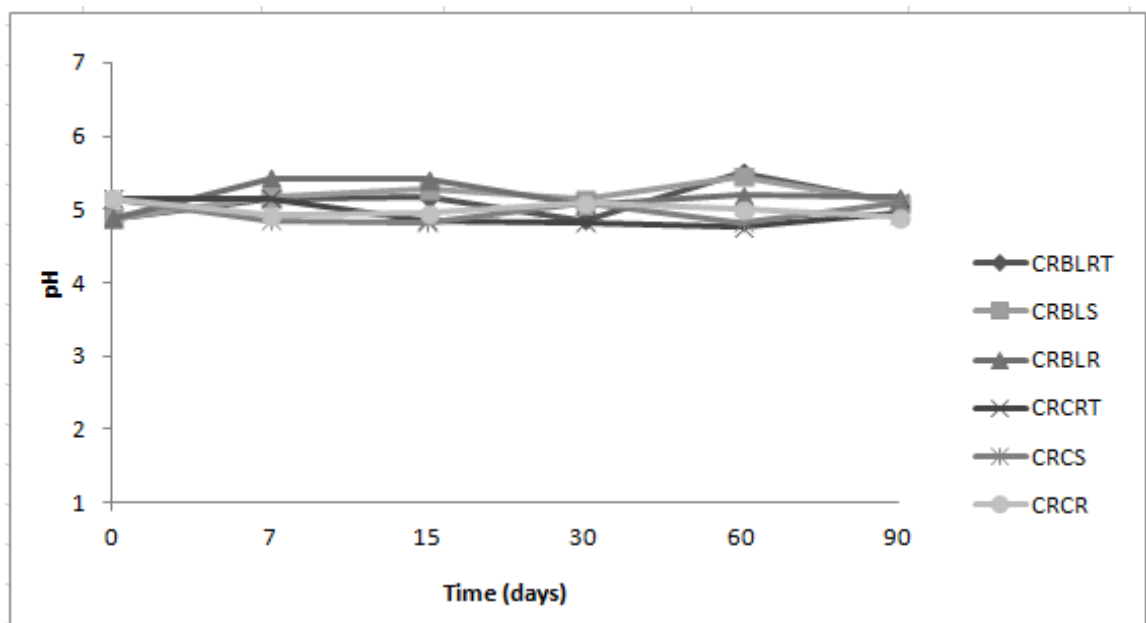


FIGURE 1 - pH of the cream formulations with and without calendula extract during the stability (CRBLRT – blank cream room temperature; CRBLS – blank cream stove; CRBLR – blank cream refrigerator; CRCRT – calendula cream room temperature; CRCS – calendula cream stove; CRCR - calendula cream refrigerator) (ANOVA, $p > 0.05$). ($n=3$)

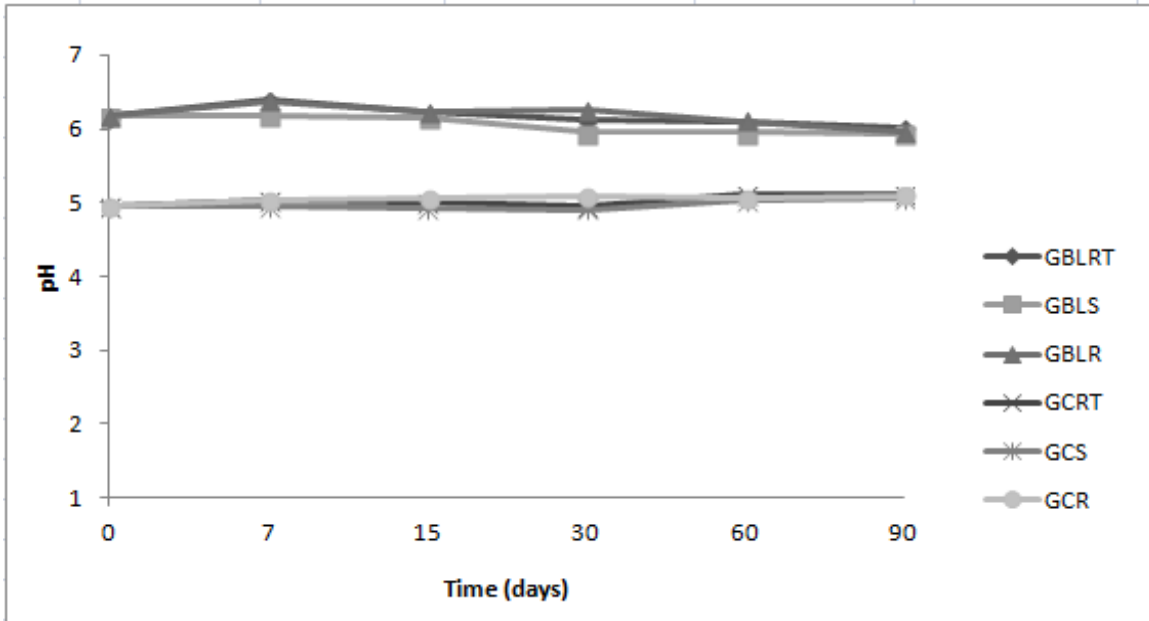


FIGURE 2 - pH of the gel formulations with and without calendula extract during the stability (GBLRT – blank gel room temperature; GBLS – blank gel stove; GBLR – blank gel refrigerator; GCRT – calendula gel room temperature; GCS – calendula gel stove; GCR - calendula gel refrigerator) (ANOVA, tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$).

Over the period of the stability test, cream formulations did not exhibit significant differences in their pH ($p > 0,05$). Considering gel formulations, however, this difference was significant when compared with blank ($p < 0,05$).

Results for viscosity evaluation of the viscosity obtained as a function of time during storage stability testing are shown in figures 3 to CRBL and CRC and figures 4 to GBL and GC.

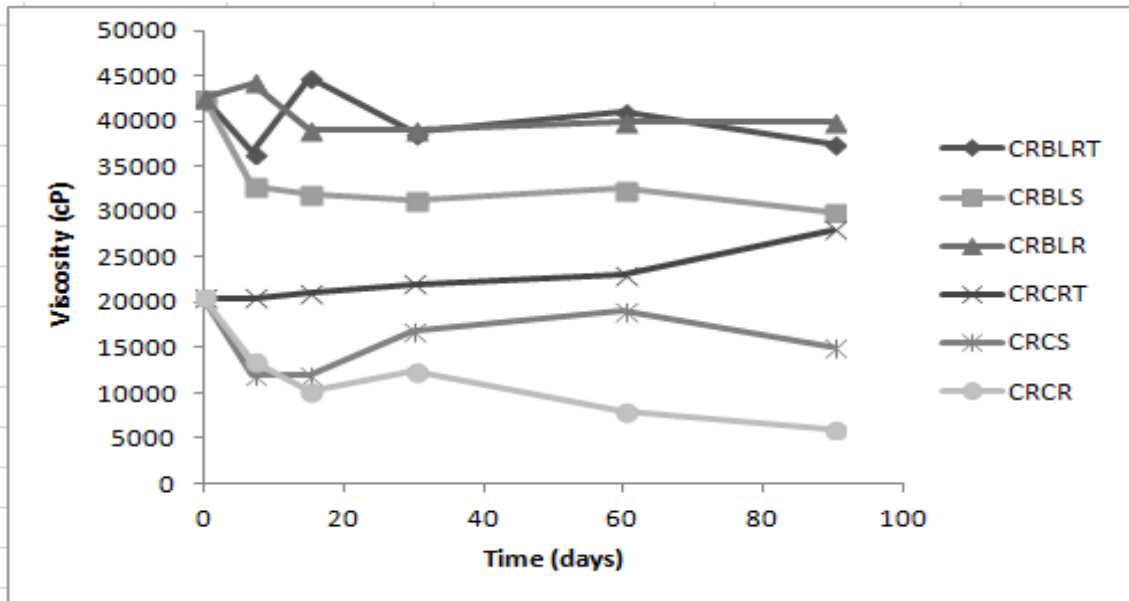


FIGURE 3 - Determination of the viscosity of the cream formulations with and without calendula extract during the stability (CBLRT – blank cream room temperature; CRBLS – blank cream stove; CRBLR – blank cream refrigerator; CRCRT – calendula cream room temperature; CRCS – calendula cream stove; CRCR - calendula cream refrigerator) (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$).

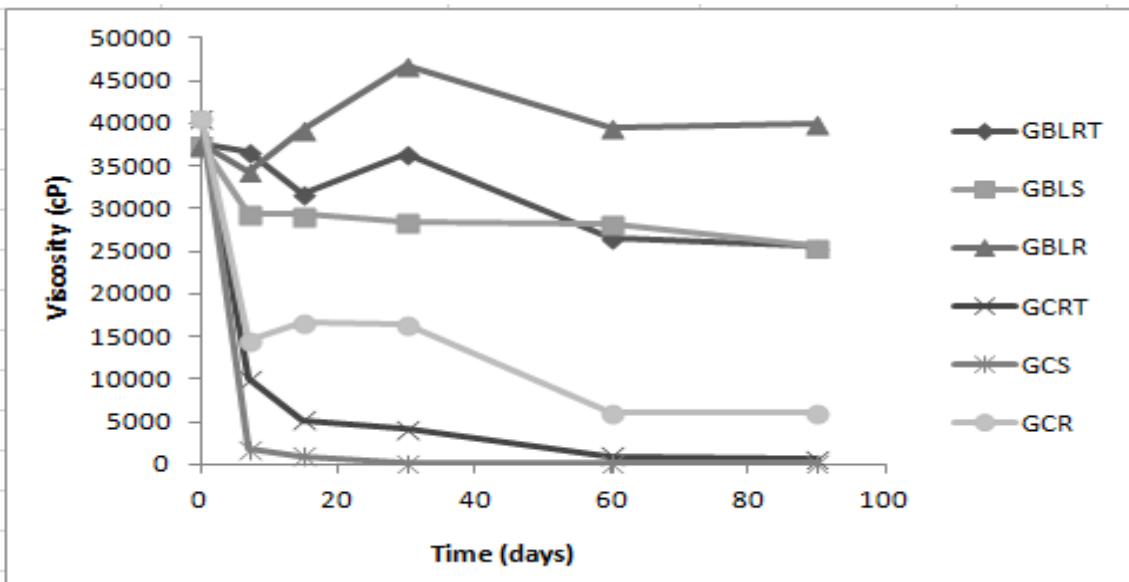


FIGURE 4 - Determination of the viscosity of the gel formulations with and without calendula extract during the stability. (GBLRT – blank gel room temperature; GBLS – blank gel stove; GBLR – blank gel refrigerator; GCRT – calendula gel room temperature; GCS – calendula gel stove; GCR - calendula gel refrigerator) (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$).

Viscosity of a formulation will depend on the physicochemical characteristics and temperature conditions to which they are subjected (Isaac et al., 2008c), and evaluation of this parameter helps in determining the appropriate consistency and fluidity, indicating the performance of the product over time (Brazil, 2004c). For all cream samples, it was observed a decrease in viscosity values, except in the CRCRT, which showed a slight increase at the end of 90 days. Difference was significant between samples and when compared with blank ($p < 0.05$).

GC formulations showed a sharp drop in viscosity values observed from the seventh day of storage for all temperatures at which they were stored, but the greatest decrease was found in the sample kept in stove at 50 °C. Significant difference was observed comparing the different samples with blanks ($p < 0.05$). It was also observed that cream samples had lower viscosity variation compared to the gel, corroborating the results with a similar study by Mariotti and Frasson (2011e), where cream and gel formulations containing strawberry extract were evaluated. These variations are expected, once it is known that viscosity is under direct influence of temperature variations. Elevated temperatures, for example, can accelerate chemical reactions altering the activity of components, viscosity, appearance, color and odor of formulations. Thus, a physical-chemical evaluation is necessary, because changes in the structure of the formulation sometimes are not visually perceptible (Brasil, 2004d; Mariotti and Frasson, 2011f).

Values obtained for spreadability of CRBL, CRC, GBL and GC on the weight applied are represented in figures 5 and 6.

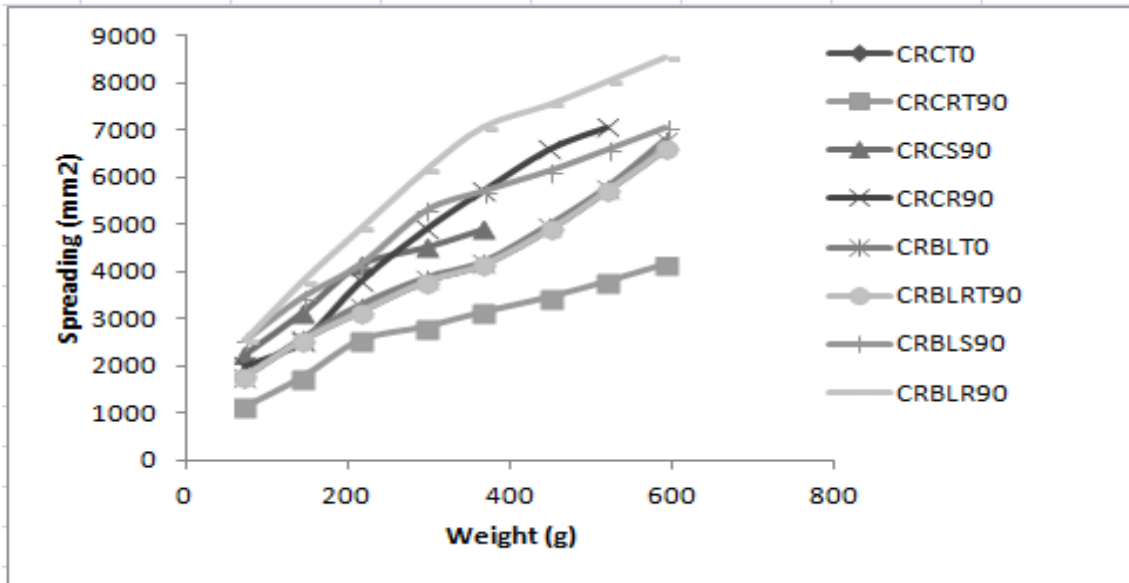


FIGURE 5 - Determination of the spreadability of the cream formulations with and without calendula extract during the stability (CRBLRT – blank cream room temperature; CRBLS – blank cream stove; CRBLR – blank cream refrigerator; CRCRT – calendula cream room temperature; CRCS – calendula cream stove; CRCR - calendula cream refrigerator) (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$).

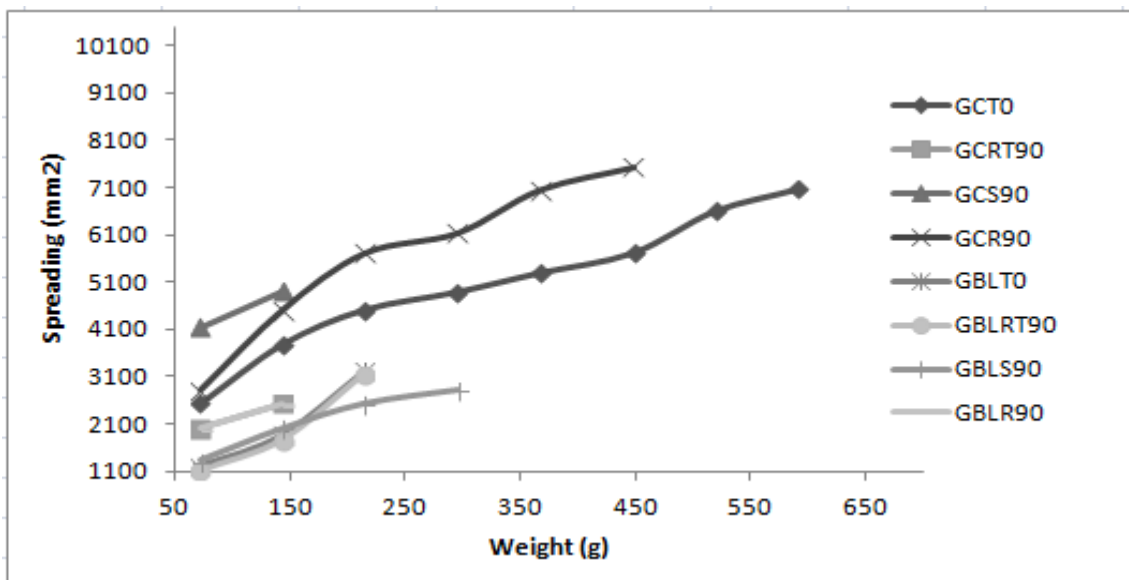


FIGURE 6 - Determination of the spreadability of the gel formulations with and without calendula extract during the stability (GBLRT – blank gel room temperature; GBLS – blank gel stove; GBLR – blank gel refrigerator; GCRT – calendula gel room temperature; GCS – calendula gel stove; GCR - calendula gel refrigerator) (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$).

The spreadability factor ($S f$) was represented in the table VI.

TABLE VI. Determination of spreadability factor ($S f$) in all formulations in function of total area (mm^2) and total weight (g).

Formulations	Total area (mm^2)	Total Weight (g)	$S f$
			(mm^2g^{-1}) $\pm SD$
CRCT0	6600	591.1	11.16 \pm 0,34
CRCRT90	4150	591.1	7.02 \pm 0,42
CRCS90	4900	366.4	13.37 \pm 0,04
CRCR90	7065	519.2	13.60 \pm 0,50
CRBLT0	6800	591.1	11.50 \pm 0,08
CRBLRT90	6600	591.1	11.16 \pm 0,17
CRBLS90	7065	591.1	11.95 \pm 0,23
CRBLR90	8540	591.1	14.44 \pm 0,32
GCT0	7065	591.1	11.95 \pm 0,09
GCRT90	10170	519.2	19.58 \pm 0,15
GCS90	4900	142.5	34.37 \pm 0,28
GCR90	7540	448.0	16.82 \pm 0,22
GBLT0	3220	213.7	15.06 \pm 0,31
GBLRT90	3140	213.7	14.68 \pm 0,07
GBLS90	2833	295.0	9.60 \pm 0,44
GBLR90	2543	142.5	17.83 \pm 0,25

Results are expressed as mean \pm relative standard deviation (RSD). (ANOVA, $p > 0.05$). ($n=3$).

Spreadability results show that formulations did not have similar behavior during storage, and the gel stored at stove temperature showed a higher value than the others. Gel and cream formulations, in comparison with its blanks, showed significant differences ($p > 0.05$). Spreadability factor calculations demonstrated that GCS90 had a higher spreadability and CRCRT90, the lower factor; however, this difference was not significant. This factor is used to calculate the spreadability difference between formulations (Fontana et al, 2011).

Antioxidant *in vitro* capacity by the DPPH method in CRC are shown in figure 7, and GC are represented in figure 8. IC₅₀ is represented in the table VII.

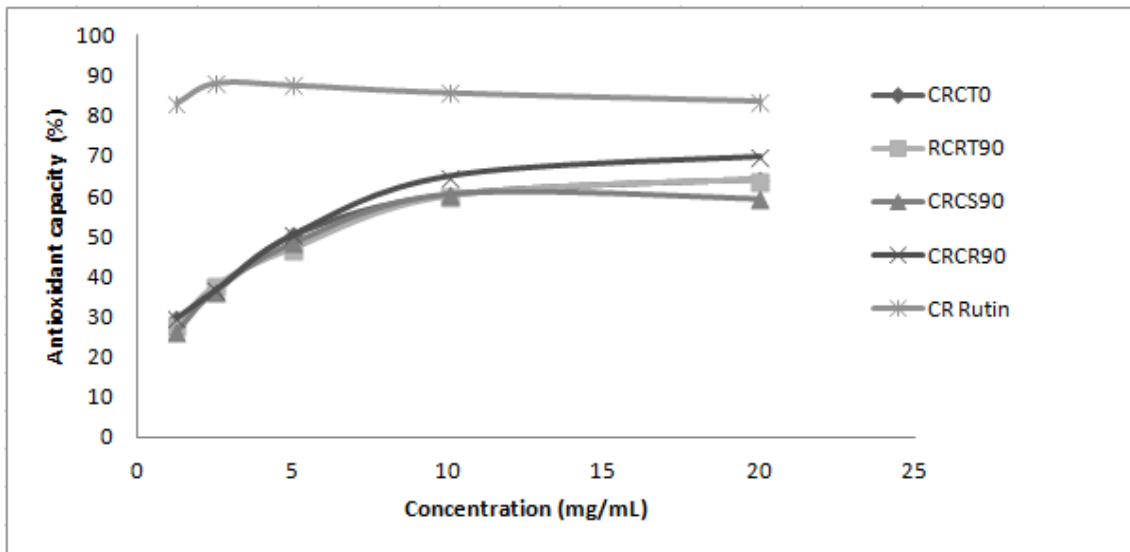


FIGURE 7 - Antioxidant capacity cream with calendula extract during the period of stability. (CRCT0 – calendula cream zero time; CRCRT90 – calendula cream room temperature after 90 days; CRCS90 - calendula cream stove after 90 days; CRCR90 - calendula cream refrigerator after 90 days; CR Rutin - cream of rutin – standard). (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$)

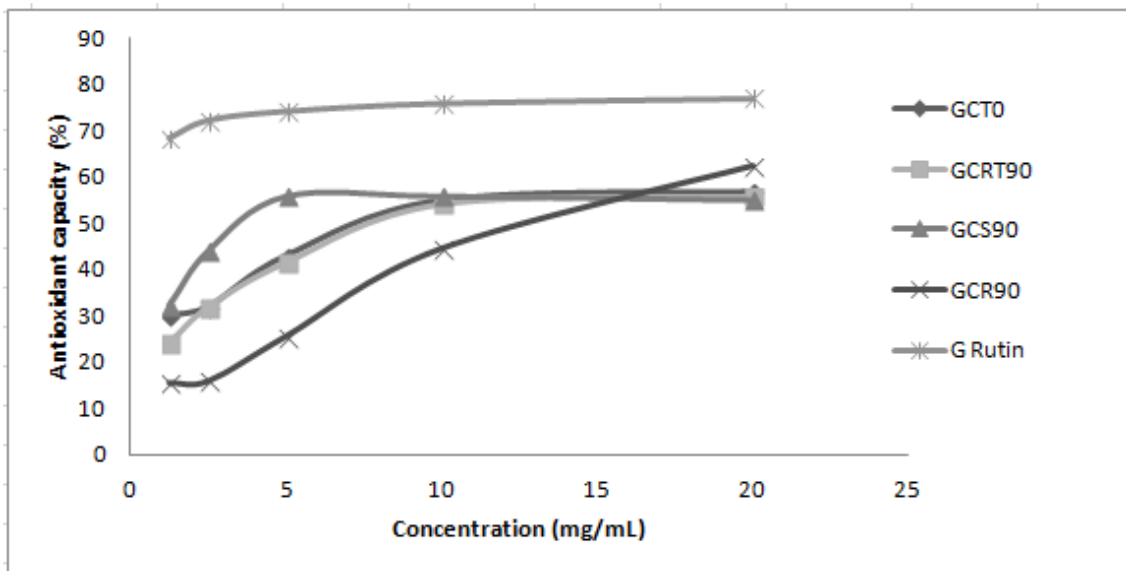


FIGURE 8 - Antioxidant capacity in the gel with extract of Calendula during the period of stability (GCT0 – calendula gel zero time; GCRT90 – calendula gel room temperature after 90 days; GCS90 - calendula gel stove after 90 days; GCR90 - calendula gel refrigerator after 90 days; CR Rutin - cream of rutin – standard). (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). ($n=3$).

TABLE VII – IC₅₀ for cream and gel formulations during the period of stability (T0 – Time zero; RT- Room temperature; S-stove; R-Refrigerator).

Formulation/ Time	T 0 ± SD (mg/mL)	RT90 ± SD (mg/mL)	S90 ± SD (mg/mL)	R90 ± SD (mg/mL)
CRC	4,92 ± 0,01*	5,46 ± 0,011	5,17 ± 0,013	4,88 ± 0,012*
GC	7,093 ± 0,03	6,73 ± 0,026	12,46 ± 0,012	13,74 ± 0,018

Results are expressed as mean ± standard deviation (SD). (ANOVA, Tukey test, p <0.05).(n=3) *Não houve variação.

The method of DPPH free radical is easy and fast running and widely used for evaluation of the antioxidant potential of substances. It is a free radical producing violet staining in ethanol (Mensor et al., 2001). In the presence of antioxidant molecules, this radical is reduced, causing a decrease in color intensity, which can be measured spectrophotometrically (Ilha et al., 2008). The results for evaluation of antioxidant capacity in formulations of CRC at time zero and at the end of 90 days of storage at different conditions of temperature show that they exhibited antioxidant capacity superior than 50% at concentrations of 10 and 20 mg/mL. Formulation stored in a refrigerator showed that capacity from 5 mg/mL. There were significant differences between formulations and standard (p<0.05), but between samples, significant differences were not observed (p>0.05).

GC formulations preserved at refrigerator temperature showed the best antioxidant capacity at a concentration of 20 mg/mL, and the sample kept in stove showed a slight decline in this activity at the same concentration. According to Lange et al. (2009) the increase in temperature can cause loss of antioxidant capacity by speeding up chemical reactions in the formulations. Baby et al. (2008) reports that higher temperatures favor the deterioration of flavonoids and phenolic compounds, since these are sensitive to hydrolysis, ultraviolet radiation, high temperatures and metals. Thus, both formulations stored for 90 days in the stove can have its antioxidant capacity reduced by depletion of these compounds. There were significant differences between formulations and standard (p<0.05), but between samples, significant differences were not observed (p > 0.05).

The inhibitory concentration (IC_{50}) represents the amount of antioxidant substance necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%. The higher the consumption of DPPH by the sample, the lower its IC_{50} , and higher its antioxidant activity will be (Mariotti and Frasson, 2011g). For cream formulations, the lowest IC_{50} was observed for the CRCR. Significant differences were observed ($p < 0.05$) between samples, excepting for CRCT0 and CRCR90, where this difference was not significant ($p > 0.05$). To gel formulations there was significant differences between samples ($p < 0.05$). The lowest IC_{50} were observed in the samples GCT0 and GCRT90. GCS90 and GCR90 samples had higher IC_{50} , but these results are considered good when compared to the data in the literature, where cream and gel formulations containing strawberry extract were evaluated for its antioxidant capacity. In this study, IC_{50} values of 35.97 and 37.42 mg/mL were obtained for the cream kept in stove and refrigerator, respectively, and 30.77 and 26.66 mg/mL were obtained for gel under the same conditions of temperature (Mariotti and Frasson, 2011h). This, it can be observed that formulations which showed the best results for the antioxidant capacity were the cream with calendula kept in refrigerator and gel with calendula at time zero and maintained at room temperature.

The results for the evaluation of Sun Protection Factor *in vitro* (*in vitro* SPF) in CRC and GC are shown in table 8.

TABLE VIII - Determination of the sun protection factor (SPF) *in vitro* cream and gel formulations during stability the periods (T0 = time zero; RT = room temperature; S = stove, R = refrigerator).

Formulation/ Time	T0 ± SD	RT ± SD	S ± SD	R ± SD
CRC	1,75 ± 0,05	1,75 ± 0,33	1,73 ± 0,18	1,71 ± 0,29
GC	1,75 ± 0,26	1,74 ± 0,13	1,74 ± 0,09	1,72 ± 0,36

Results are expressed as mean ± standard deviation (SD). (ANOVA, $p > 0.05$). (n=3)

For a sunscreen reach the market, it is necessary to be incorporated into a vehicle, and this association is called sunscreen or sunblock (Flor and Davolos, 2007). Currently, there has been great interest to use plant compounds sunscreens, specially when they exhibit antioxidant activity (Polonini et al., 2011). Thus, flavonoid,

tannins and phenolic compounds among others, are the most studied in relation to photoprotective capacity, once they present absorption in the ultraviolet region (Rosa et al., 2008; Violante et al., 2009b). As the extract of *C. officinalis* present phenolic compounds in its composition, cream and gel formulations were evaluated for this capability. The results showed around an SPF of about 1.75 for all formulations, not showing significant differences during storage time ($p>0,05$). The formulations stored under different temperature conditions were tested and it was observed that this did not affect directly the measurement of the SPF, since it was unchanged after 90 days of storage. However, according to the RDC 237 of 22/08/2002 (Brazil, 2002) for a product to be suitable for use in sunscreens, it must exhibit an SPF equal or greater than 2. Thus, the formulations do not conform with this parameter, not being possible to use them as a sunscreen.

CONCLUSION

Samples of cream and gel containing *Calendula officinalis* L. hydroethanolic extract showed good physical and chemical stability, because the analyzed parameters remained within established standards and did not undergo significant changes. Cream formulations showed better characteristics than gel formulations, excepting for spreadability, which was higher for gels. About the photoprotective capacity, formulations did not differ under different storage conditions; however, considering the results and according with brazilian regulation, cannot be used as photoprotective. Antioxidant capacity evaluation did not show significant variations, demonstrating good *in vitro* capacity. Further *in vivo* studies are suggested for the antioxidant activity, while photoprotective activity may be researched about a possible enhancement in the SPF of synthetic sunscreens.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank at the Quality Control Laboratory of Franciscan University Center – UNIFRA (Santa Maria- Brazil).

REFERÊNCIAS

AGATONOVIC-KURSTRIN,S.; LOESHER, C. Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of *Calendula officinalis* using high resolution plate imaging and artificial neural network data modeling. **Analytica Chimica Acta**. v.798, n.10 , p.103–108, 2013.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JUNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.44, n.2,p. 233-248, 2008.

BRASIL. **Resolução RDC n.237 de 02 de agosto de 2002**. Diário Oficial da União, Brasília, 26 agosto, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional / Ministério da Saúde**.Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.1. ed.,Brasília: ANVISA, 2004.

BUTNARIU, M.; CORADINI, C.Z. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. **Chemistry Central Journal**. v. 6, n.35, p. 1-7, 2012.

CITADINI-ZANETTE, V.; NEGRELLE, R. R. B.; BORBA, E.T. *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE): Aspectos Botânicos, ecológicos e usos. **Visão Acadêmica**.v.13, n.1, p.6-23 ,2012.

EHLERS, C.; IVENS, U.I.; MOLLER, M.L.; SENDEROVITZ, T.; SERUP, J. Females have lower skin surface pH than men. **Skin Research and Technology**, v.7, p. 90 – 94, 2001.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FONSECA, Y.M.; CATINI, C.D.; VICENTINI, F.T.M.C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R.F.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidativestress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, n. 3, p. 596–601, 2010.

FONTANA, M.C.; REZER, J.F.P.; CORADINI, K.; LEAL, D.B.R.; BECK, R.C.R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, n.2 p. 241–249, 2011.

GONÇALVES, G.M.S.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 2-10, 2009.

ILHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.3, p.387-393, 2008.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G., OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n1, p. 81-96, 2008.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*. Lam. DC. *Compositae***. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1991.

LANGE, K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.1, p.145-151, 2009.

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, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARIOTTI, D.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de formulações cosméticas contendo extrato etanólico dos frutos de *Fragaria vesca* L. (morango). **Infarma**, v.23, n ¾, 2011.

MENSOR, L.L.; MENESES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extract for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Researt**, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

POLONINI,H.C.; RAPOSO, N. R.B.; BRANDÃO, M.A.F. Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção do câncer de pele. **Revista APS**, v.14, n.2, p. 216-223, 2011.

ROSA, M.B.; OLIVEIRA, T.G.; CARVALHO, C.A.; SILVA, F.D.; CARVALHO, L.M.; NASCIMENTO, P.C.; PERES, R.L. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale (jacq.) cass* e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n.1,p.101-110, 2008.

SAYRE, R.M.; AGIN, P.P.; LEVEE, G.J.; MARLOWE, E. Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreensing formula. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n.3, p.559-566, 1979.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010.

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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2A, p.452-457, 2009.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos e muitas informações sobre suas propriedades vão passando de geração a geração, fazendo parte, desta forma, da cultura popular. Mas o uso de plantas faz parte também, da medicina atual, sendo que no Brasil a legislação vem sendo modificada e a ANVISA tem elaborado normas para a regulamentação do uso de plantas e fitoterápicos, com o objetivo aumentar o conhecimento sobre as suas propriedades, garantindo a eficácia e segurança das mesmas. Para que uma planta, droga vegetal ou fitoterápico possa ser utilizado com segurança pela população, é necessário que a mesma apresente comprovação científica de suas ações, bem como de sua toxicidade. Desta forma, o estudo fitoquímico é o ponto de partida para o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica. O conhecimento de seus constituintes químicos é de grande importância para definir se as substâncias presentes em uma determinada planta apresentam funções biológicas e/ou nocivas no organismo humano (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas pelos vegetais e são responsáveis principalmente pela defesa deste e também por ações biológicas importantes. Os polifenóis, entre os quais, os flavonoides, estão principalmente envolvidos com a capacidade antioxidante e anti-inflamatória das plantas. Isso pode ser evidenciado em diversos trabalhos realizados com plantas ricas nestes compostos (SIMÕES et al., 2010).

Formulações cosméticas têm sido desenvolvidas e avaliadas em relação ao efeito antioxidante, principalmente no que se refere à prevenção e atenuação do envelhecimento cutâneo. O envelhecimento da pele dá-se, dentre outras causas, pela exposição excessiva à radiação ultravioleta ao longo dos anos e novos produtos com a finalidade de preveni-lo vêm sendo amplamente desenvolvidos e testados. Com a grande procura por parte dos consumidores por produtos naturais e orgânicos e a tendência atual em obter e desenvolver produtos sustentáveis, surge o conceito de “cosméticos verdes” ou ecológicos, que tem por base a agricultura orgânica e não a convencional, pois prioriza o meio ambiente e não utiliza nenhum um tipo de substância sintética (RIBEIRO, 2010).

A *Calendula officinalis* L. é uma planta bastante conhecida por suas propriedades medicinais e ornamentais e amplamente utilizada em formulações cosméticas. O extrato das flores apresenta comprovada ação antioxidante e anti-inflamatória, entre outras, provavelmente pelo seu conteúdo em compostos fenólicos REFERENCIA. Em relação às folhas, há uma escassez de dados na literatura científica no que diz respeito à constituição química e atividades biológicas, e desta forma fez-se necessário uma avaliação das mesmas, já que o rendimento do extrato e facilidade de obtenção das folhas é superior à das flores.

Este estudo foi direcionado para a análise do extrato hidroetanólico das folhas da calendula, obtidos por maceração, não sendo realizado o fracionamento do vegetal, pois como o objetivo foi preparar formulações cosméticas, a aplicabilidade das frações seria comprometida pela toxicidade que os solventes podem provocar na superfície cutânea.

Em uma análise fitoquímica preliminar foi evidenciada a presença de polifenóis e flavonoides, que foram posteriormente identificados e quantificados como rutina e quercetina. O teor de taninos condensados pode ter contribuído para a capacidade antioxidante apresentada. Na avaliação qualitativa por cromatografia em camada delgada foi identificada a presença de saponinas, triterpenóides, alcaloides e óleos voláteis.

Em relação à capacidade antioxidante, esta foi comprovada utilizando-se o método *in vitro* do DPPH e radical hidroxila. No método do DPPH, a capacidade antioxidante foi comparada aos controles positivos ácido ascórbico e rutina. O extrato apresentou uma boa capacidade antioxidante, o que pode ser comprovada pela IC₅₀, que para o extrato de calendula foi inferior à 7,81 µL/mL (que foi a menor concentração testada). No método do radical hidroxila, a inibição foi de 61,24% na concentração de 31,25 µL/mL, confirmando a ação antioxidante do extrato. Contudo, na determinação da capacidade antioxidante pelo método do radical superóxido, o extrato não demonstrou inibição frente a este radical.

Na análise do Fator de Proteção Solar realizado no extrato, foi obtido um resultado de $1,89 \pm 0,7$. Este resultado é relativamente baixo, pois no Brasil, para uma substância ser considerada um filtro solar o mesmo deve apresentar um FPS acima de 2. Porém, em relação aos resultados obtidos com outras plantas, esse

resultado é considerado bom e poderá ser futuramente testado em associação com filtros sintéticos com o objetivo de evidenciar o sinergismo entre eles.

Após os resultados obtidos na análise fitoquímica, capacidade antioxidante e fotoprotetora no extrato hidroetanólico da calendula, verificou-se que a mesma poderia ser utilizada em formulações cosméticas com o mesmo propósito e foi adicionado 5% deste extrato em uma formulação de creme e de gel não-iônico. Desta maneira, primeiramente foi necessário avaliar a estabilidade das formulações durante 90 dias, utilizando como parâmetros as características organolépticas, determinação do pH e da viscosidade. As amostras demonstraram ser estáveis, não sofrendo alterações significativas nas características organolépticas e apresentando algumas variações em relação ao pH e viscosidade que são consideradas normais quando submetidas à variações extremas de temperatura. As formulações de creme e gel com extrato de calendula não apresentaram variações significativas nos valores de pH, entretanto, apresentaram variações significativas na viscosidade, o que é esperado quando formulações são submetidas a diferentes condições de temperatura. O creme apresentou as menores variações de viscosidade em relação ao gel.

Na avaliação da espalhabilidade das formulações, observou-se que as amostras de gel foram superiores às do creme, o que pode ser confirmado pelo fator de espalhabilidade que foi maior no gel de calendula conservado em estufa e menor no creme com o extrato conservado em temperatura ambiente.

Nas formulações desenvolvidas foram, ainda, realizadas as determinações da capacidade antioxidante e fotoprotetora ao logo do período de estocagem, com o objetivo de avaliar se essas propriedades se mantêm em diferentes condições de temperatura. No creme e no gel com calendula, houve diferença significativa comparado com o padrão, mas entre as amostras em diferentes condições de temperatura, essa diferença não foi significativa, apesar da amostra conservada em estufa apresentar um pequeno decréscimo na atividade. No creme e gel com calendula, observou-se que as amostras conservadas em refrigerador apresentaram as melhores características antioxidantes.

Já em relação à capacidade fotoprotetora, os resultados indicam que não houve diferenças significativas nessa atividade durante o período de estabilidade e

as diferenças de temperatura não comprometeram a determinação do FPS. Porém, nas formulações, a calendula também não pode ser utilizada com filtro solar isolado.

Este trabalho demonstra que as folhas de *Calendula officinalis* L apresentam polifenóis em sua constituição química, o que pode estar relacionado com a capacidade antioxidante e fotoprotetora demonstrada, tanto no extrato quanto nas formulações.

Devido aos bons resultados obtidos nesta pesquisa, considera-se a possibilidade de continuação da mesma. Dessa forma, serão realizadas novas análises em relação ao fator de proteção solar, testando o extrato das folhas de calendula em associação com filtros solares sintéticos para verificação de uma possível ação sinérgica. Como o efeito antioxidante foi considerado bom, tanto para o extrato como para as formulações, serão realizados novos estudos *in vivo*, para verificar se o comportamento da planta é equivalente aos ensaios realizados *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

- Na análise fitoquímica foi determinada a presença de saponinas, terpenóides, alcaloides e óleos voláteis e também de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados no extrato hidroetanólico das folhas de *Calendula officinalis* L.
- Na determinação de compostos fenólicos por CLAE foi possível identificar e quantificar rutina e quercetina.
- O extrato hidroetanólico obteve uma boa capacidade antioxidante o que favoreceu o desenvolvimento de formulações tópicas com este objetivo.
- As formulações de creme e gel com extrato hidro-etanólico de *Calendula officinalis* L. mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento em diferentes temperaturas, não comprometendo de forma significativa as características finais da formulação. Porém, observou-se que as formulações mantidas em refrigerador conservaram melhor suas características.
- A espalhabilidade das formulações foi superior no gel com calendula em comparação ao creme.
- As formulações de creme e gel com extrato hidro-etanólico de *Calendula officinalis* L. demonstraram uma boa capacidade antioxidante, sendo que a melhor capacidade foi observada nas amostras mantidas em refrigerador.
- As formulações de creme e gel com extrato hidro-etanólico de *Calendula officinalis* L. não apresentaram um FPS adequado à legislação brasileira, mas podem ser testadas futuramente como potencializadoras de filtros solares sintéticos. As diferentes condições de temperatura não influenciaram nesta atividade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; LOESCHER, C. M. Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of *Calendula officinalis* using high resolution plate imaging and artificial neural network data modeling. **Analytica Chimica Acta**, v.798, n.10,p.103–108, 2013.

ANNEGOWDA, H.V. et al. Evaluation of phenolic content and antioxidant property of hydrolysed extract of *Terminalia catappa* L. leaf. **Asian Journal of Plant Science**, v.8, n.9, p. 479-485, 2010.

ANTUNES, M.V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 279-287, abr/jun 2008.

BABAE, N. et al. Antioxidant capacity of *Calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.21, n.1,p.18, 2013.

BAUMANN, L. **Dermatologia estética**. Rio de Janeiro: Livraria e editor R-evinter Ltda, 2004.

BEHLING, E.B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BORELLA, J.C. et al. Avaliação da estabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extrato de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p. 193-197, 2010.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, n. 4,p. 531-537, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.1. ed.,Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Resolução RDC n.237 de 02 de agosto de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 26 agosto, 2002.

BRASIL. Resolução RDC n. 47 de 16 de março de 2006. Diário Oficial da União, Brasília,

BRASIL. RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf. Acesso em 22 de outubro 2013.

BRASIL. Resolução RDC 14 de 31 de março de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de abril de 2010.

BRASIL. Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BUDAI, M.; et al. Effect of UVA radiation on membrane fluidity and radical decay in human fibroblasts as detected by spin labeled stearic acids. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 77, p.27–38, 2012.

BUTNARIU, M.; CORADINI, C.Z. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n.35, p. 1-7, 2012.

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

CASTILHO, I.G.; SOUSA, M.A.A.; LEITE, R.M.S. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, p.173-178, 2010.

CHUANG, S.C.; CHEN, J.H. Photooxidation and antioxidant responses in the earthworm *Amyntas gracilis* exposed to environmental levels of ultraviolet B radiation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.164, n.3, p. 429-437,2012.

CITADINI-ZANETTE, V.; NEGRELLE, R. R. B.; BORBA, E.T. *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE): Aspectos Botânicos, ecológicos e usos. **Visão Acadêmica**,v.13, n.1, p.6-23 ,2012.

CORRÊA, N.M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1,p.73-78, 2005.

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

DZIKI, U.G. Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. **Journal of Functional foods**, v.4,n.4 p. 872-882, 2012.

ERCETIN, T.; et al. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. **Industrial Crops and Products**,v. 36,n.1, p. 203–208, 2012.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FONSECA, Y.M., et al. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, n.3, p. 596–601, 2010.

FONSECA, Y.M., et al. Determination of rutin and narcissi in marigold extract and topical formulations by liquid chromatography: applicability in skin penetration studies. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1320-1324, 2010.

FRANGE, R.C.C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.263-271, 2009.

ISAAC, V.L.B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n1, p. 81-96, 2008.

JIMÉNEZ, G.S.; DUCOING, H.P.; SOSA, M.R. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.21, n.3, p.354-363, 2003.

KATIYAR, S.K; et al. Polyphenolic Antioxidant (-)-Epigallocatechin gallate from Green Tea Reduces UVB-Induced Inflammatory Responses and Infiltration of Leukocytes in Human Skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 69, n.2, p. 148-153, 1999.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MARIOTTI, D.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de formulações cosméticas contendo extrato etanólico dos frutos de *Fragaria vesca* L. (morango). **Infarma**, v.23, n. 3/4, 2011.

MARTÍNEZ-FLÓRES, S.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**. v.XVII, n.6, p.271-278, 2002.

MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de farmácia**, v. 18, n. 2, 81-87, 2002.

MISHRA, A.K. et al. Effects of calendula essential oil-based cream on biochemical parameters of skin of albino rats against ultraviolet B radiation. **Scientia pharmaceutica**, v.80,n.3, p. 669–683, 2012.

OLIVEIRA, A.C.; et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.

PARENTE, L.M.L.; et al. Angiogenic activity of Calendula officinalis flowers L. in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n.1, p.19-24, 2011.

PIANOVSKI, A.R. et al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.2,p.249-259, 2008.

POLONINI, H.C.; RAPOSO, N.R.B.; BRANDÃO, M.A.F. Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção do câncer de pele. **Revista APS**, v.14, n.2, p.216-223, 2011.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

RIBEIRO, R.P. et al. Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Infarma**, v.16, n", p. 7-8, 2004.

RIBEIRO, C. – Cosmetologia aplicada a dermoestética. 2. Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

RITTER, M.R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, n.2, p. 51-62, 2002.

ROSA, M.B. et al. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale (jacq.) cass* e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. V. 5, n.1,p.101-110, 2008.

SAINI,P. et al. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. **Homeopathy**, v. 101, n.2, p.92- 98, 2012.

SHIVASHARAN, B. D. et al. Protective effect of *Calendula officinalis* Linn. flowers against 3-nitropropionic acid induced experimental Huntington's disease in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.466–473, 2013.

SHIVASHARAN, B. D. et al. Protective effect of *Calendula officinalis* L. flowers against monosodium glutamate induced oxidative stress and excitotoxic brain damage in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.28, n.3, p.292–298, 2013.

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30,n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, T.M. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.1, p.36-38, 2005.

SOUZA, F.P.; CAMPOS, G.R.; PACKER, J.F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.1, p.69-77, 2013.

SWALWELL, H.; et al. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.52, n.3, p. 626–634, 2012.

TANIDEH, N. et al. Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v.115, n.3, p.332-338, 2013.

TERRA, V.A., et al. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 109, n.2, p. 34–41, 2012.

THOUNAOJAM, T.C. et al. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.53, p.33-39, 2012.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42,n. 2, p.289-306,2006.

VEIGA – JUNIOR,V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3 p.519-528, 2005.

VELASCO, M.V.R. et al. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 181-196, 2008.

VELASCO, M.V.R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.27-34, 2011.

VELASCO, M.V.R. et al. Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v.9, n.1, p.119-130, 2012.

VIOLANTE, I.M.P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2A, p.452-457, 2009.

VERDAGUER, D.; et al. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. **Environmental and Experimental Botany**, v.79, p.66– 75, 2012.

WIKTOROWSKA,E.; DLUGOSZ, M.; JANISZOWSKA, W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n.1 p. 14–20, 2010.

ZHAO H.; et al. Effects of extraction solvent mixtures and antioxidant activityevaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54,n.19 ,p.7277-7286, 2006.

ZUCCHI, M.R. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri – GO. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, **Campinas**, v.15, n.2, p.273-279, 2013.

ANEXOS

Anexo A – Formulações no tempo zero



Creme com calêndula no tempo zero

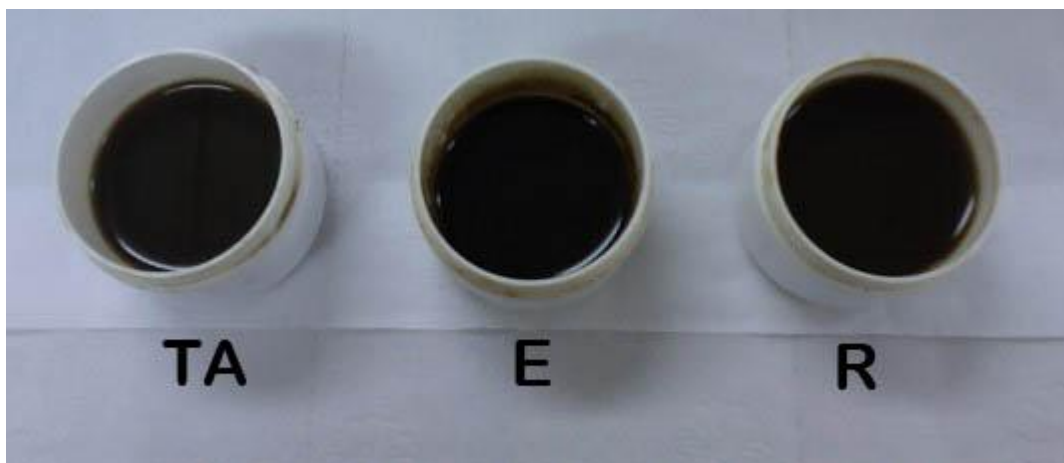


Gel com calêndula no tempo zero

Anexo B – Formulações ao fim de 90 dias



Creme com calêndula após 90 dias de estabilidade (TA -temperatura ambiente, E - estufa e R - refrigerador).



Gel com calêndula após 90 dias de estabilidade (TA - temperatura ambiente, E- estufa e R - refrigerador).

Anexo C – Modelo de template usado pelo periódico Natural Products Communication



Figure 1. Please use this paragraph to type the legend(s) for your scheme(s) or figure(s), as well as the heading for a table and the table format(s).

Insert diagram here.

Figure 2. Please use this paragraph to type the legend(s) for your scheme(s) or figure(s), as well as the heading for a table and the table format(s).

The manuscript should be written as clearly and concisely as possible. Common headings such as Introduction, Results and Discussion, and Conclusions should not be used as text within these sections should be self-explanatory. Please avoid lengthy surveys of the literature, except when perspective (review) articles, are involved. References should be cited in brackets [1-4]. Paragraphs should not be indented and there will be single line between paragraphs.

The manuscript should be written as clearly and concisely as possible. Common headings such as Introduction, Results and Discussion, and Conclusions should not be used as text within these sections should be self-explanatory. Please avoid lengthy surveys of the literature, except when perspective (review) articles, are involved. References should be cited in brackets [1-4]. Paragraphs should not be indented and there will be single line between paragraphs.

The manuscript should be written as clearly and concisely as possible. Common headings such as Introduction, Results and Discussion, and Conclusions should not be used as text within these sections should be self-explanatory. Please avoid lengthy surveys of the literature, except when perspective (review) articles, are involved. References should be cited in brackets [1-4]. Paragraphs should not be indented and there will be single line between paragraphs.

Experimental

Typically this section should be divided into subsections, the contents of which varies according to the subject matter of the article. This must contain all the information to guarantee reproducibility. In an introductory paragraph, special equipment, etc. should be detailed. A precise recipe containing all details, e.g., the amount of solvent used for extraction, details of

References

Please insert your references here. For one reference number contains more than one citation please separate them into (a), (b), (c), etc. Three examples of references are given below. For further information on how the references should be written please see the instructions for authors: www.rscpubl.com/authors.html

- (1) O'Neil P.D., Prasad G.H. (2004) A medicinal chemistry perspective on atomistic and related independence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 2041-2044.
- (2) Papato L.A. (2004) Total synthesis of jaspaglicinone, an unprecedented [3.3.1] bicyclic antitubercular diuretic. In *Strategies and Tactics in Organic Synthesis*. Vol. 4, Harwood, M. (Ed). Elsevier, London UK, 87-101.

chromatographic purifications and yields etc., should be given. Physical and spectroscopic data can be included in the experimental section or in tabular lists. Spectroscopic data should be stated in the order and format shown in following examples:

Compound name

MP: 181-182°C.

n_D^{20} : +33.4 (c 1.00, CHCl₃).

RI: 0.4 (CHCl₃-MeOH, 5:1).

IR (KBr): 3254, 3110, 1710, 1680, 1510, 1460, 970 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Me₂SO-*d*₆) δ (ppm): 7.24 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.10 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.95 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.80 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.65 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.50 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.35 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.20 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.05 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.90 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.75 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.60 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.45 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.30 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.15 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 5.00 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.85 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.70 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.55 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.40 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.25 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.10 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.95 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.80 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.65 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.50 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.35 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.20 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.05 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.90 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.75 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.60 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.45 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.30 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.15 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 2.00 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 1.85 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 1.70 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 1.55 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 1.40 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 1.25 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 1.10 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.95 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.80 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.65 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.50 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.35 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.20 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 0.05 (d, 1H, J = 7.4 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 193.2 (C=O), 181.5 (C=O), 170.4 (C=O), 159.4 (C=O).

HRMS (ESI) m/z (rel. int.): 258.2 (M + H⁺) (100%), 263.9 (96%).

HRMS-FAB m/z (M + H⁺) calcd for C₂₂H₂₄N₂O₅: 475.329.

Found: 475.298.

Anal. Calcd for C₂₂H₂₄N₂O₅: C, 70.44; H, 5.24. Found: C, 70.32; H = 5.42.

Products yield should be given in terms of g or mol as well as in %.

¹H NMR: Always give coupling constants for well resolved peaks. After each chemical shift, state in parentheses number of protons, multiplicity, coupling constants, and assignment in that order.

¹³C NMR: Carbon-13 NMR data should be reported in the solvent δ 1 ppm with the number of attached hydrogens designated as CH, CH₂, CH and C unless.

Crystallographic Data: Complete X-ray data will not be published. They should be deposited at an appropriate international data institute, which is then cited in a reference. If a representation of the crystal structure (e.g., ORTEP) is to be included, it should be accompanied by the following data (1)-formula, (2)-crystal data, (3) method of collection, (4) method of structure solution and refinement, and (5) selected bond lengths and angles.

Supplementary data: IUPAC accepts electronic supplementary material to support and enhance scientific research. Therefore, special data of all compounds may be included on separate sheets at the end of the manuscript which will be published online. The presence of these files will be signified by a footnote in the article title, and by a description included in a "Supplementary data" section at the end of the paper.

Acknowledgements - The inclusion of an acknowledged person's name is optional. It may include credit to technical assistance, financial support and other appropriate recognition, and should be brief and placed after the experimental section.

Anexo D – Guia para autores do periódico *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*

Author Guidelines

STRUCTURE

Title Page: This must include the manuscript full title (it must be brief providing exact information of the contents), authors' full names, institutional affiliations (University, College, Department) through numbers. The corresponding author must be identified with an asterisk, giving the complete address, including the electronic mail. Those information must be left in the text and after the filiation.

Abstract: On a separate page, provide a summary of not more than 200 words. It must concisely and specifically describe the objectives of the study, techniques used, the essential results and what the authors concluded from the results.

Uniterms: These should be strictly related to the contents and limited to 6 (six).

Abstract in Portuguese: It should be presented after the conclusions. This should follow the same content of the abstract presented in English.

Uniterms in Portuguese: must follow uniterms in English and be presented after the abstract in Portuguese.

Introduction: This should state briefly and clearly the objectives of the investigation with reference to previous works. Extensive review of the literature should be avoided and substituted for references of recent publications where such reviews may be found.

Material and Methods: These should be described in sufficient detail that the work can be reproduced. Procedures and techniques readily available in the literature require only a citation of the original source, except when they are substantially modified. Reports of experimental studies on humans and animals must certify that the research received prior approval by the appropriate institutional review body (Committee of Bioethics).

Results and Discussion: Results must be presented concisely and in logical order. Where possible, use figures or tables to present data rather than text. When appropriate give the range, standard deviation and indicate the significances of differences between numerical values obtained. Discussion should interpret the results and assess their significance in relation to previous work in the field. Speculation not warranted by actual data should be avoided. Presenting those items separately is optional.

Conclusions: These must be drawn from the text and restricted to the limits of data obtained

Acknowledgments: These should be typed in a special paragraph under separate heading preceding the section of References. They should be kept to a minimum consistent with the requirements of courtesy and disclosure.

References: They should be prepared and listed according to The Brazilian Association of Technical Standards (ABNT.NBR 6023). Entries should be arranged in alphabetical order by author at the end of the paper. All authors' names should be given. "Accuracy of reference data is the responsibility of the author". For examples see the site www.bcq.usp.br

PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be sent in 30-36 lines, 1,5 spaced, in the Word for Windows. All manuscripts must be accompanied with a letter signed by the authors, and submitted, only, by electronic way.

Additional Information

Text citations: References should be cited in the text by the authors' names, with only the first letter in capital letter followed by the year of publication. For more than three authors, the first has to be cited followed by the expression *et al.* (in italics). For more than one citation with the same authors and year of publication they must be differentiated by small letters close to the year.

Illustrations: Graphs, tables, chemical structures, equations, maps, figures, photos must be included in the text immediately after being cited. Maps, figures and photos must be presented also in separate files with the extensions TIF or JPG, and 300 dpi resolution. **Each BJPS issue will present a chosen illustration in its cover.** Tables should be numbered consecutively in Roman numerals and Figures in Arabic, followed by their titles. The word TABLE and FIGURE should appear in capital letters in the title or in the legend, but not in the text. Legends should accompany them as well as be present in the text.

Nomenclature: Unities of weight and measurements, names of plants, animals and chemicals should be mentioned according to International Rules available. For national manuscripts names of drugs must follow the current Denominações Comuns Brasileiras(DCB). Trademarks may be mentioned only once in the text (between parenthesis and initial in capital letter).

The manuscripts must be submitted, only, by electronic way. Use the electronic mail through the e-mail: bjps@usp.br and send enclosed to the message the files: the manuscript's Word for Windows file, a electronic copy of the submission letter signed for all authors and the figures files em JPEG.