

Joana Patrícia Oliveira Couto

Desenvolvimento de um gel despigmentante
com incorporação de extrato
de *Fragaria vesca*

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e pelo Professor Doutor Artur Figueirinha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa: *Fragaria vesca* L. (flora-on.pt)

Agradecimentos

O culminar desta etapa académica envolveu a contribuição direta ou indireta de algumas pessoas. Deixo o meu agradecimento a todos os que tornaram este projeto possível.

À Professora Doutora Eugénia Pina e ao Professor Doutor Artur Figueirinha, pela orientação, apoio, disponibilidade, motivação, por todos os ensinamentos e incentivo e ainda pela revisão do presente trabalho.

À Professora Doutora Carla Nunes, pela colaboração nos ensaios com cultura de células, disponibilização das células HaCaT, revisão da parte escrita e por promover um espírito crítico na abordagem das experiências.

À Professora Doutora Teresa Batista, por todas as sugestões e colaboração no decorrer deste trabalho.

À Professora Doutora Carla Vitorino, pela ajuda disponibilizada nas medições com o texturómetro.

Ao Professor Doutor António Paranhos, pela realização dos ensaios da atividade da tirosinase.

Ao laboratório da UCQFarma da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao Dr Rui Manadas pela disponibilização de alguns reagentes.

Ao Dr. Pedro Contreiras do Instituto PhD Trials e seus colaboradores pela realização dos ensaios em voluntários.

À D. Regina Vieira do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e à D. Fátima Colaço do Laboratório de Farmacognosia, pela disponibilidade e por toda a ajuda fornecida.

Aos meus colegas nos laboratórios por me auxiliarem sempre que precisei. Um agradecimento especial à Sónia, Margarida, Patrícia e Raquel pelos momentos de descontração e por toda a energia positiva.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes. Ao meu namorado, pela paciência, apoio e carinho.

Aos meus irmãos pela alegria contagiante. Aos meus pais, por todo o apoio, preocupação e pelos valores transmitidos.

Índice

Índice de figuras.....	vi
Índice de tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Abreviaturas.....	xi
I - Introdução.....	1
1.1 Plantas medicinais como fonte de compostos bioativos	2
1.1.1 Riscos e limitações.....	3
1.1.2 Legislação específica	4
1.2 Compostos fenólicos.....	5
1.2.1 Flavonoides	5
1.2.2 Taninos	8
1.3 <i>Fragaria vesca</i>	9
1.3.1 Compostos bioativos presentes.....	11
1.3.2 Atividade biológica.....	11
1.4 Estrutura e funções da pele.....	12
1.4.1 Epiderme	13
1.4.2 Derme.....	14
1.4.3 Hipoderme.....	15
1.5 Melanina	15
1.5.1 Melanogénese.....	16
1.5.2 Exposição da pele à radiação UV	18
1.5.3 Mecanismos de proteção	20
1.6 Efeito despigmentante	21
1.7 Administração na pele	21
1.8 Cosméticos	22
1.8.1 Géis.....	23
1.9 Objetivos	24
II - Materiais e métodos	25
2.1 Reagentes e materiais.....	26
2.2. Material botânico.....	27
2.3 Otimização do processo extrativo.....	27

2.3.1	Preparação do extrato de <i>Fragaria vesca</i> , com etanol a 50%	27
2.3.2	Caracterização do extrato por HPLC	28
2.3.3	Avaliação de atividade inibidora da tirosinase	29
2.4	Preparação das formulações em gel.....	29
2.5	Estudos de estabilidade das formulações.....	33
2.5.1	Análise organolética.....	33
2.5.2	Determinação do pH	33
2.5.3	Determinação da viscosidade.....	34
2.5.4	Textura	34
2.6	Doseamento dos taninos totais no extrato e na formulação.....	35
2.7	Cultura das células HaCaT e avaliação da viabilidade celular	37
2.7.1	Avaliação da viabilidade celular	37
2.8	Estudos de segurança em humanos.....	38
2.8.1	Teste de contacto simples	38
2.8.2	Teste de contacto repetitivo em humanos	39
2.9	Análise estatística.....	40
III	- Resultados e discussão.....	41
3.1	Otimização da extração	42
3.2	Rendimento de extração	42
3.3	Caracterização do extrato por HPLC.....	43
3.4	Avaliação de atividade inibidora da tirosinase	45
3.5	Caracterização das formulações	46
3.5.1	Análise organolética.....	46
3.5.2	Determinação do pH	47
3.5.3	Determinação da viscosidade.....	48
3.5.4	Textura	49
3.6	Doseamento dos taninos totais no extrato e na formulação.....	52
3.7	Avaliação da viabilidade celular	53
3.8	Estudo em voluntários humanos.....	55
IV	- Conclusões e perspectivas futuras	56
V	- Referências bibliográficas	58

Índice de figuras

Fig. 1 – Estrutura química dos flavonoides (adaptado de Saewan e Jimtaisong, 2013; Patil, Mahajan e Katti, 2009; Jagtap e Khan, 2016).....	7
Fig. 2 – Folhas, flores e frutos de <i>Fragaria vesca</i> (adaptado de flora-on.pt).....	9
Fig. 3 – Ocorrência de <i>Fragaria vesca</i> em Portugal.....	10
Fig. 4 – Células da epiderme (melanócitos, queratinócitos, células de Langerhans e células de Merkel) (adaptado de Weller <i>et al.</i> , 2008)	14
Fig. 5 – Estrutura da epiderme e localização dos melanócitos (adaptado de Cichorek <i>et al.</i> , 2013).....	16
Fig. 6 – Via sintética da melanina (adaptado de Gillbro e Olsson, 2011)	17
Fig. 7 – Agitação magnética	28
Fig. 8 – Aspeto final do gel de hidroxietilcelulose, contendo 2% de extrato de <i>Fragaria vesca</i>	32
Fig. 9 – Gráfico tempo-força obtido com o texturómetro (Vitorino <i>et al.</i> , 2013)	35
Fig. 10 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA dos extratos a 60% (azul), 50% (verde) e 40% (vermelho) de <i>Fragaria vesca</i> (280 nm)	42
Fig. 11 – Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA do extrato a 50% de <i>Fragaria vesca</i> (280 nm).....	43
Fig. 12 – Espectros UV característicos dos flavonoides: a) pico 7, derivado de canferol; b) pico 8, derivado de quercetina.....	44
Fig. 13 – Espectro UV relativo ao composto 10.....	44
Fig. 14 – Espectros UV característicos dos derivados de ácido elágico: a) composto 9; b) composto 11	45
Fig. 15 – Variação do pH dos géis entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	47
Fig. 16 – Variação da viscosidade dos géis entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	48
Fig. 17 – Variação da dureza dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	49
Fig. 18 – Variação da compressibilidade dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	49
Fig. 19 – Variação da adesividade dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	50

Fig. 20 – Variação da coesão dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	51
Fig. 21 – Variação da elasticidade dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade).....	52
Fig. 22 – Efeito do extrato de <i>Fragaria vesca</i> na viabilidade das células HaCaT. As células HaCaT semeadas em caixas de 24 poços foram incubadas com diferentes concentrações de extrato durante 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT e expressa como percentagem (%) relativamente à situação controlo (100%). As barras representam o valor médio de cinco experiências independentes realizadas em quadruplicado.....	53
Fig. 23 – Efeito do gel com incorporação de extrato de <i>Fragaria vesca</i> nas células HaCaT. As células HaCaT semeadas em caixas de 24 poços foram incubadas com diferentes concentrações de gel durante 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT e expressa como percentagem (%) relativamente à situação controlo (100%). As barras representam o valor médio de seis experiências independentes realizadas em quadruplicado.	54

Índice de tabelas

Tabela 1 – Fototipos de pele (Sachdeva, 2009).....	19
Tabela 2 – Materiais utilizados	26
Tabela 3 – Composição por 100g do gel de metilcelulose a 3%, com parabenos como conservante	29
Tabela 4 – Composição por 100g do gel de hidroxietilcelulose a 2,5%, com etanol como conservante	30
Tabela 5 – Composição por 100g do gel de carbopol a 1%, com parabenos como conservante	30
Tabela 6 – Composição por 100 g do gel de metilcelulose a 3%, com parabenos como conservante	30
Tabela 7 – Composição por 100 g do gel de hidroxietilcelulose a 2,5%, com etanol como conservante	31
Tabela 8 – Composição por 100 g do gel de carbopol a 1%, com parabenos como conservante	31
Tabela 9 – Composição por 100 g do gel de hidroxietilcelulose, com sorbato de potássio como conservante	32
Tabela 10 – Composição por 100 g do gel de hidroxietilcelulose, com propilenoglicol como conservante	32
Tabela 11 – Condições de armazenamento dos géis.....	33
Tabela 12 – Análise organolética após 14 dias	46
Tabela 13 – Análise organolética após 28 dias	46

Resumo

A *Fragaria vesca*, popularmente conhecida como morangueiro silvestre, é uma planta pertencente à família *Rosaceae*, encontrada nas zonas temperadas e subtropicais do hemisfério norte. Os frutos, folhas e raízes apresentam propriedades medicinais, sendo utilizados como anti-inflamatórios, antioxidantes, analgésicos e vasodilatadores. As folhas, em particular, têm atribuídas propriedades antissépticas, emolientes e de proteção dermatológica. Os compostos bioativos responsáveis por estas propriedades são, essencialmente, flavonoides, ácidos fenólicos, elagitaninos e proantocianidinas.

Nas folhas de *Fragaria vesca* estão presentes elagitaninos, que podem ser extraídos com soluções hidroalcoólicas. Os elagitaninos apresentam capacidade despigmentante, com um mecanismo que passa pela inibição da tirosinase, uma enzima essencial na produção endógena de melanina. Esta atividade encontra-se relatada na bibliografia e foi avaliada num ensaio com a tirosinase.

O objetivo deste trabalho centra-se no desenvolvimento de uma formulação em gel com ação despigmentante, para aplicação tópica, onde será incorporado o extrato das folhas de *Fragaria vesca*. O processo de extração foi otimizado para se tornar específico para os elagitaninos. O gel apresentará, assim, atividade despigmentante.

Várias formulações em gel foram preparadas, tomando como base o Formulário Galénico Português. Selecionou-se uma formulação contendo água, hidroxietilcelulose e etanol a 96% com função de conservante. O extrato de *Fragaria vesca* foi incorporado na concentração de 2%.

Foram realizados estudos de estabilidade da formulação, tendo em conta os efeitos de temperatura e da presença/ausência de luz solar.

A segurança do extrato e do gel foram avaliadas em ensaios *in vitro*, utilizando a linha celular de queratinócitos HaCaT. Diferentes concentrações do extrato e do gel foram adicionadas às células em cultura e a viabilidade celular foi posteriormente avaliada com recurso ao método do MTT. Em estudos com voluntários humanos foi avaliado o potencial irritante do gel. Procedeu-se ao doseamento do extrato e do gel a fim de determinar a percentagem de elagitaninos presentes.

Os resultados revelam que o gel é estável, seguro e hipoalergénico, sendo adequado a aplicação tópica.

Palavras-chave: *Fragaria vesca*, gel despigmentante, hidroxietilcelulose, elagitaninos.

Abstract

Fragaria vesca, popularly known as wild strawberry, is a plant belonging to the family *Rosaceae*, found in temperate and subtropical areas of the northern hemisphere. The fruits, leaves and roots have medicinal properties, being used as anti-inflammatories, antioxidants, analgesics and vasodilators. The leaves, in particular, have been assigned antiseptic, emollient and dermatological protection properties. The bioactive compounds responsible for these properties are essentially flavonoids, phenolic acids, ellagitannins and proanthocyanidins.

In the leaves of *Fragaria vesca* are present ellagitannins, which can be extracted with hydroalcoholic solutions. Ellagitannins have a depigmenting capacity, with a mechanism that passes through the inhibition of tyrosinase, an essential enzyme in the endogenous production of melanin. This activity is reported in the literature and evaluated in a tyrosinase assay.

The objective of this work is the development of a gel formulation with depigmenting action, for topical application, where the extract of *Fragaria vesca* leaves will be incorporated. The extraction process was optimized to become specific to ellagitannins. The gel will thus exhibit depigmenting activity.

Several gel formulations were prepared based on the Portuguese Galenic Form. A formulation containing water, hydroxyethylcellulose and 96% ethanol as a preservative, was selected. *Fragaria vesca* extract was incorporated in the concentration of 2%.

Stability studies of the formulation were performed, taking into account the effects of temperature and the presence / absence of sunlight.

Safety of the extract and gel were evaluated in *in vitro* assays using the HaCaT keratinocyte cell line. Different concentrations of the extract and the gel were added to the cells in culture and the cell viability was later evaluated using the MTT method. In human volunteer studies, the irritant potential of the gel was evaluated. The extract and gel were assayed to determine the percentage of ellagitannins present.

The results show that the gel is stable, safe and hypoallergenic, with topical application being suitable.

Keywords: *Fragaria vesca*, depigmenting gel, hydroxyethylcellulose, ellagitannins.

Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

CO₂ – Dióxido de carbono

CPNP – Portal de Notificação de Produtos Cosméticos

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

FGP – Formulário Galénico Português

HEC – Hidroxietilcelulose

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HRIPT – *Human Repeat Insult Patch Tests*

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

INOS – *Inducible nitric oxide synthase*

IV - Infravermelho

L-DOPA – L-dihidroxifenilalanina

MTT – 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

ROS – *Reactive oxygen species*

TLC – Cromatografia em camada fina (do inglês *Thin Liquid Chromatography*)

TRP-1 – *Tyrosinase-related protein-1*

TRP-2 – *Tyrosinase-related protein-2*

UV – Ultravioleta

I - Introdução

I.1 Plantas medicinais como fonte de compostos bioativos

A utilização de plantas e produtos naturais como recursos medicinais para prevenção de doenças e tratamento de problemas de saúde remonta a milhares de anos; baseada no conhecimento empírico, constituía o único recurso disponível para a humanidade (Fabricant e Farnsworth, 2001; Veiga, Pinto e Maciel, 2005; Silva e Júnior, 2010). Esta dependência de produtos naturais perdeu lugar para os princípios ativos farmacêuticos no mundo moderno, onde muitos dos fármacos consistem em moléculas de origem completamente sintética (Veiga, Pinto e Maciel, 2005; Ganesan, 2008). Ainda assim, a OMS estima que no início da década de 90, 80% da população dos países em desenvolvimento dependia ainda de produtos preparados a partir de plantas medicinais locais para o tratamento de doenças. A nível mundial, estima-se que 65% da população mundial recorra unicamente às plantas medicinais como cuidado primário de saúde (Fabricant e Farnsworth, 2001; Veiga, Pinto e Maciel, 2005; Dias, Urban e Roessner, 2012).

Estima-se que aproximadamente 46% das moléculas aprovadas entre 1981 e 2014 foram obtidas a partir de produtos naturais, inalteradas, ou sintéticas com base numa estrutura natural. Atualmente, apenas os fármacos anti-histamínicos, diuréticos e hipnóticos são totalmente sintéticos (Newman e Cragg, 2016).

A vasta utilização das plantas medicinais deve-se à complexidade da sua composição química: uma espécie vegetal é capaz de biossintetizar compostos químicos de variadas funções biológicas e fisiológicas através do metabolismo vegetal, que pode ser primário ou secundário. Os metabolitos primários encontram-se universalmente distribuídos no reino vegetal e constituem as macromoléculas envolvidas nas funções primárias essenciais. Os metabolitos secundários integram todos os compostos que, não sendo essenciais no crescimento, desenvolvimento e reprodução, desempenham um papel na defesa e adaptação da espécie ao seu ambiente, assegurando a sobrevivência e perpetuação no meio. A distribuição dos metabolitos secundários é restrita a um conjunto de espécies e constitui elementos de diferenciação interespecie. Os metabolitos secundários são integrados em três famílias principais: compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides – (Fumagali *et al.*, 2008; Dias, Urban e Roessner, 2012).

Os compostos ativos produzidos na sequência do metabolismo secundário são os responsáveis pela atividade biológica das espécies de plantas utilizadas medicinalmente. Os produtos naturais fornecem uma diversidade estrutural única, que os torna fontes ilimitadas de novos compostos ativos (Fabricant e Farnsworth, 2001; Dias, Urban e Roessner, 2012). A

variedade e complexidade estrutural destes compostos são ainda inalcançáveis por métodos de síntese laboratoriais e a sua extração por vezes não é conseguida em quantidade suficiente (Viegas, Bolzani e Barreiro, 2006).

Deste modo, o recurso a plantas como fonte de compostos ativos terapêuticos segue vários objetivos:

a) O isolamento dos compostos ativos para uso direto como fármacos, como é o caso da digoxina e digitoxina usados para tratamento de problemas de coração, e da morfina (Fabricant e Farnsworth, 2001; Dias, Urban e Roessner, 2012);

b) A produção em semissíntese de compostos ativos patenteáveis, potenciando a atividade e diminuindo a toxicidade, como o ácido acetilsalicílico derivado do composto natural, salicina (Fabricant e Farnsworth, 2001; Dias, Urban e Roessner, 2012);

c) A utilização de toda ou parte da planta como produto medicinal, dos quais são exemplos *Ginkgo biloba* e *Hypericum perforatum* (erva de São João) (Fabricant e Farnsworth, 2001; Dias, Urban e Roessner, 2012).

Em termos de estratégia industrial, o objetivo é procurar compostos bioativos com origem em plantas que possam servir como *lead compounds* para a síntese ou semissíntese de moléculas com patente assegurada. Diminui assim a necessidade de isolar novas estruturas bioativas, dado que o objetivo final é utilizar os compostos ativos para produzir derivados sintéticos com menor toxicidade e maior eficácia (Fabricant e Farnsworth, 2001).

É estimado que menos de 10% da biodiversidade mundial foi avaliada como fonte de compostos ativos, pelo que muitos compostos ainda aguardam descoberta (Dias, Urban e Roessner, 2012).

1.1.1 Riscos e limitações

A opinião pública é normalmente levada a acreditar que todos os tratamentos naturais são seguros e que estes são livres de efeitos secundários indesejáveis, mas todos os produtos medicinais naturais envolvem riscos e limitações à sua utilização (Firenzuoli e Gori, 2007; Nasri e Shirzad, 2013). A probabilidade de ocorrência de efeitos secundários é muito superior quando o consumidor não está devidamente informado sobre a segurança dos produtos medicinais e sobre a sua devida utilização (George, 2011).

Um fármaco sintético contém um único composto químico sendo relativamente fácil determinar a sua atividade e efeitos secundários. No caso de plantas medicinais, estas

poderão conter mais de 400 compostos diferentes, o que torna inviável a determinação de todas as atividades e interações (George, 2011).

A composição química de plantas medicinais encontra-se dependente de fatores como a espécie, os quimiotipos, a parte anatómica da planta usada (sementes, raízes, folhas, flores). As plantas originárias de biótipos específicos podem ter muitas dificuldades para crescer fora dos seus ecossistemas locais. As condições de armazenamento, a exposição solar, a humidade, o tipo de solo, a época da colheita são outras variantes intervenientes na composição química. Toda esta variabilidade origina diferenças significativas a nível de atividade farmacológica – (Firenzuoli e Gori, 2007; Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Fumagali et al., 2008).

A diversidade de compostos presentes numa espécie explica o facto das plantas medicinais exercerem um amplo espectro de atividades simultâneas nos sistemas fisiológicos (Nasri e Shirzad, 2013). A interação com os fármacos sintéticos é uma realidade, pois algumas plantas reduzem ou aumentam a biodisponibilidade dos mesmos, ao induzirem ou inibirem a atividade dos citocromos, e destas interações derivam os efeitos adversos mais frequentes, sendo os mais graves aqueles que envolvem a ação da planta com anticoagulantes, glicosídeos cardíacos, diuréticos e barbitúricos (Firenzuoli e Gori, 2007; George, 2011).

Outra limitação no uso de plantas medicinais é o risco de numa colheita com base em conhecimento popular, ser identificada uma espécie errada, venenosa (Nasri e Shirzad, 2013). A dificuldade em estabelecer doses adequadas contribui para a ocorrência de efeitos adversos (George, 2011). É ainda necessário ter em conta que alguns dos compostos de plantas podem induzir reações alérgicas, ser hepatotóxicos ou potencialmente carcinogénicos (Firenzuoli e Gori, 2007; George, 2011).

1.1.2 Legislação específica

Para colmatar os problemas resultantes do uso desinformado de plantas medicinais, requer-se a implementação de padrões rigorosos de fabrico e controlo (George, 2011).

A utilização para fins terapêuticos de produtos à base de plantas levou a Comissão Europeia a criar medidas de harmonização do mercado. A Diretiva 2004/24/CE representa a iniciativa de conformidade das normas dos vários Estados-Membros relativas aos medicamentos com grande tradição de utilização. Com as normas específicas estabelecidas

nesta Diretiva, os produtos cumprem os requisitos de segurança e eficácia necessários à obtenção de uma autorização de introdução no mercado – (Martins, 2007; Martins, 2013).

Na legislação portuguesa os medicamentos à base de plantas são controlados pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED). As normas da Diretiva 2004/24/CE encontram-se transpostas para o direito nacional pelo Decreto-Lei 176/2006, de 30 de agosto – (OMS, 1998; Martins, 2013).

Um medicamento à base de plantas pode obter uma autorização de introdução no mercado (AIM) recorrendo a três procedimentos diferentes: 1. Procedimento de AIM, com dossiê completo de estudos próprios de segurança e eficácia; procedimento de AIM, com dossiê completo recorrendo à definição de uso bem estabelecido; 3. Procedimento de registo de utilização tradicional para medicamentos à base de plantas (Martins, 2013).

1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários, produzidos pelas plantas em resposta a fatores ambientais, e com funções relacionadas com a pigmentação, fotoproteção e proteção contra predadores (Ghasemzadeh e Ghasemzadeh, 2011; Vázquez *et al.*, 2015). Representam diversas classes de compostos, que em comum contêm um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilo (Määttä-Riihinen, Kamal-Eldin e Törrönen, 2004). Estruturalmente podem variar desde fenóis simples a polímeros complexos de elevada massa molecular (Chen, Cheng e Liang, 2015). Existem assim mais de 10000 compostos, associados a muitas propriedades fisiológicas anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes. A sua análise e caracterização são indicativas da sua grande diversidade (Vázquez *et al.*, 2015).

As principais classes de compostos fenólicos são: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos (Pereira *et al.*, 2009). Apenas as classes de flavonoides e taninos serão descritas no trabalho.

1.2.1 Flavonoides

Encontram-se descritas e identificadas mais de 4000 variedades de flavonoides (Merken e Beecher, 2000; Saewan e Jimtaisong, 2013); conferem às plantas proteção contra a radiação UV, stress oxidativo e animais herbívoros (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002; Shashank e Abhay, 2013). Constituem pigmentos vegetais responsáveis pelas cores laranja, amarela, vermelha e azul dos alimentos (Merken e Beecher, 2000; Heim, Tagliaferro e

Bobilya, 2002). O organismo humano é incapaz de sintetizar estes compostos, sendo obtidos através da alimentação, principalmente através de frutos e vegetais: maçãs, chá preto, cerejas, uvas, cebolas, frutos vermelhos, alho, espinafres, entre outras (Hollman e Katan, 1999; Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002; Shashank e Abhay, 2013).

A estrutura básica mais frequente dos flavonoides é tricíclica, composta por dois anéis aromáticos (A e B), interligados através de um heterociclo pirano ou pirona (C) (Shashank e Abhay, 2013). Os flavonoides são divididos em oito classes principais (flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas, chalconas e auronas) (Corradini et al., 2011). São diferenciadas de acordo com a ligação entre os anéis B e C, e conforme o estado de oxidação do anel C e seus grupos funcionais (Saewan e Jimtaisong, 2013). O anel C pode ser substituído por um anel de 5 elementos (auronas) ou por uma forma acíclica (chalconas) (Sisa et al., 2010).

A biodisponibilidade, metabolismo e atividade biológica dos flavonoides dependem da sua classe estrutural, configuração, grau de hidroxilação e da substituição de grupos funcionais (Shashank e Abhay, 2013).

A estrutura das flavonas apresenta o anel B substituído na posição 2 do anel pirano (C), o qual tem uma ligação dupla C2-C3 e um carbonilo em C4. A estrutura dos flavonóis é similar à das flavonas, diferindo na adição de um hidroxilo na posição C3 do anel C, nos flavonóis (Saewan e Jimtaisong, 2013). As flavanonas são estruturalmente semelhantes às flavonas, mas não existe a ligação dupla no anel C em C2-C3 (Saewan e Jimtaisong, 2013).

A estrutura das isoflavonas e flavonas difere na localização no anel B, que nas primeiras se encontra substituído na posição C3 do anel C (Saewan e Jimtaisong, 2013).

Os flavanois não apresentam ligação dupla C2-C3, nem o carbonilo no C4 no anel C. Apresentam normalmente uma hidroxilação na posição C3, mas também podem existir na forma de flavan-4-óis e flavan-3,4-dióis (Ferreira e Slade, 2002; Saewan e Jimtaisong, 2013).

As antocianidinas apresentam uma carga positiva na sua estrutura, quando a pH ácido. Esta particularidade estrutural define-as como compostos muito reativos perante espécies reativas de oxigénio. Antocianinas são antocianidinas glicosiladas, normalmente no C3 do anel B e, por vezes, nos C5 e C7 do anel A (Prior e Wu, 2006; Saewan e Jimtaisong, 2013).

As chalconas diferem dos flavonoides tricíclicos pela ligação entre os anéis A e B, que neste caso é uma cadeia aberta de três carbonos. São convertidas a flavanonas por uma reação estereoespecífica (Evrans Aksöz e Ertan, 2011). As auronas contêm um benzofurano associado a um benzilideno na posição 2 do anel de 5 membros. São isómeros estruturais das flavonas (Jagtap e Khan, 2016).

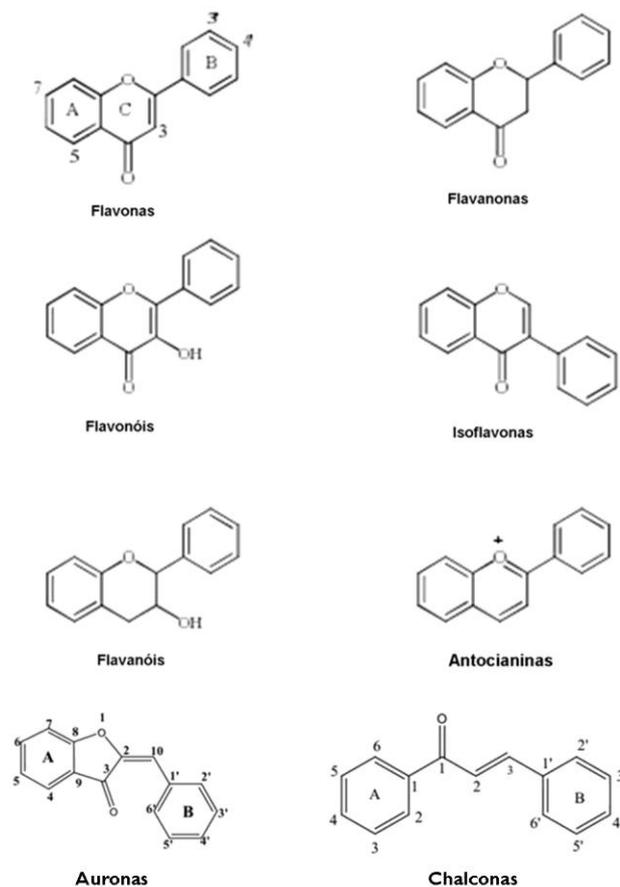


Fig. I – Estrutura química dos flavonoides (adaptado de Saewan e Jimtaisong, 2013; Patil, Mahajan e Katti, 2009; Jagtap e Khan, 2016)

Muitos dos efeitos protetores e benéficos dos flavonoides estão associados à sua capacidade de doar hidrogénios e de complexar os metais de transição divalentes (Merken e Beecher, 2000). Encontram-se relatadas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, anticarcinogénicas, antivirais, anti-hipertensoras, hepatoprotetoras e fotoprotetoras (Merken e Beecher, 2000; Shashank e Abhay, 2013). É ainda de realçar que uma dieta rica em flavonoides reduz a mortalidade por doença coronária (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002).

I.2.2 Taninos

Os taninos são polifenóis de elevado peso molecular. São encontrados tanto em espécies vegetais lenhosas como herbáceas (Scalbert, 1991). Dividem-se em dois grupos de acordo com a sua estrutura: taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galhotaninos) e taninos condensados (proantocianidinas) (Giampieri *et al.*, 2012a; Piwowarski e Kiss, 2013).

Os elagitaninos são hidrolisados em meio ácido libertando ácido elágico (Yoshimura *et al.*, 2005; Giampieri *et al.*, 2012b). A forma livre do ácido elágico é raramente encontrada; normalmente existe na forma de elagitaninos ou esterificado com glucose (Dias *et al.*, 2015; Liberal *et al.*, 2015).

O ácido elágico é insolúvel a pH ácido e solúvel ao pH fisiológico. Em ambiente básico, é capaz de precipitar cátions divalentes: Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , entre outros. Esta propriedade está associada a uma atividade antiangiogénica (Losso *et al.*, 2004). Encontram-se descritas atividades citotóxicas e antiproliferativas do ácido elágico, verificadas contra células cancerosas e sem interferência na viabilidade celular das células saudáveis (Losso *et al.*, 2004). Outras atividades biológicas atribuídas aos elagitaninos em estudos *in vitro* e *in vivo* são: antioxidante, anti-inflamatória e antiviral (Vassalo *et al.*, 2013; Liberal *et al.*, 2015). Foi também demonstrado que estas moléculas induzem a morte celular programada (apoptose) em diversas linhas celulares tumorais (Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Liberal *et al.*, 2015).

Os taninos condensados consistem em unidades oligoméricas e poliméricas de 3-flavanois e podem atingir altos pesos moleculares (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002; Yamakoshi *et al.*, 2003; Corradini *et al.*, 2011). Estão presentes em grandes quantidades no vinho tinto, maçãs e uvas (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002; Yamakoshi *et al.*, 2003).

A sua capacidade de interagir fortemente com proteínas, contribuem para as suas propriedades adstringentes (Corradini *et al.*, 2011). Muitos taninos exibem uma forte atividade antioxidante, anti-inflamatória e cardioprotetora (Yamakoshi *et al.*, 2003; Kruger *et al.*, 2014).

1.3 *Fragaria vesca*

A família *Rosaceae* integra mais de 90 géneros e aproximadamente 3000 espécies. O género *Fragaria* inclui 27 espécies selvagens, como é o exemplo da *Fragaria vesca* (Potter et al., 2007; Johnson, Govindarajulu e Ashman, 2014).

Fragaria vesca, popularmente conhecida como morangueiro silvestre ou morangueiro bravo, é uma planta herbácea perene; cresce em prados e bosques, nas zonas montanhosas de regiões temperadas e em regiões subtropicais do hemisfério Norte: Europa, Ásia Ocidental, América do Norte e em áreas temperadas do Chile. Pode também ser encontrada no Japão e Canadá. Em Portugal predomina nas zonas norte e centro e é também encontrada em sítios isolados no Alto Alentejo e Algarve (figura 4). O período de floração estende-se de Março a Agosto. Os frutos amadurecem durante 3 a 4 semanas após o desenvolvimento das flores – (Cunha et al., 2004; Kanodia e Das, 2008; Liberal et al., 2014; Dias et al., 2015; Dyduch-Siemińska et al, 2015; NATURDATA).

A planta atinge as dimensões máximas de 30 cm de altura e 15 cm de largura. As folhas são dentadas e trifoliadas. As flores são normalmente brancas, de 15 a 18 mm de diâmetro, com 5 pétalas. Os frutos, vermelhos, são menores que os normais morangos de cultivo, de sabor e aroma diferentes e apresentam superficialmente pequenos pontos pretos (Burrows, 2005).



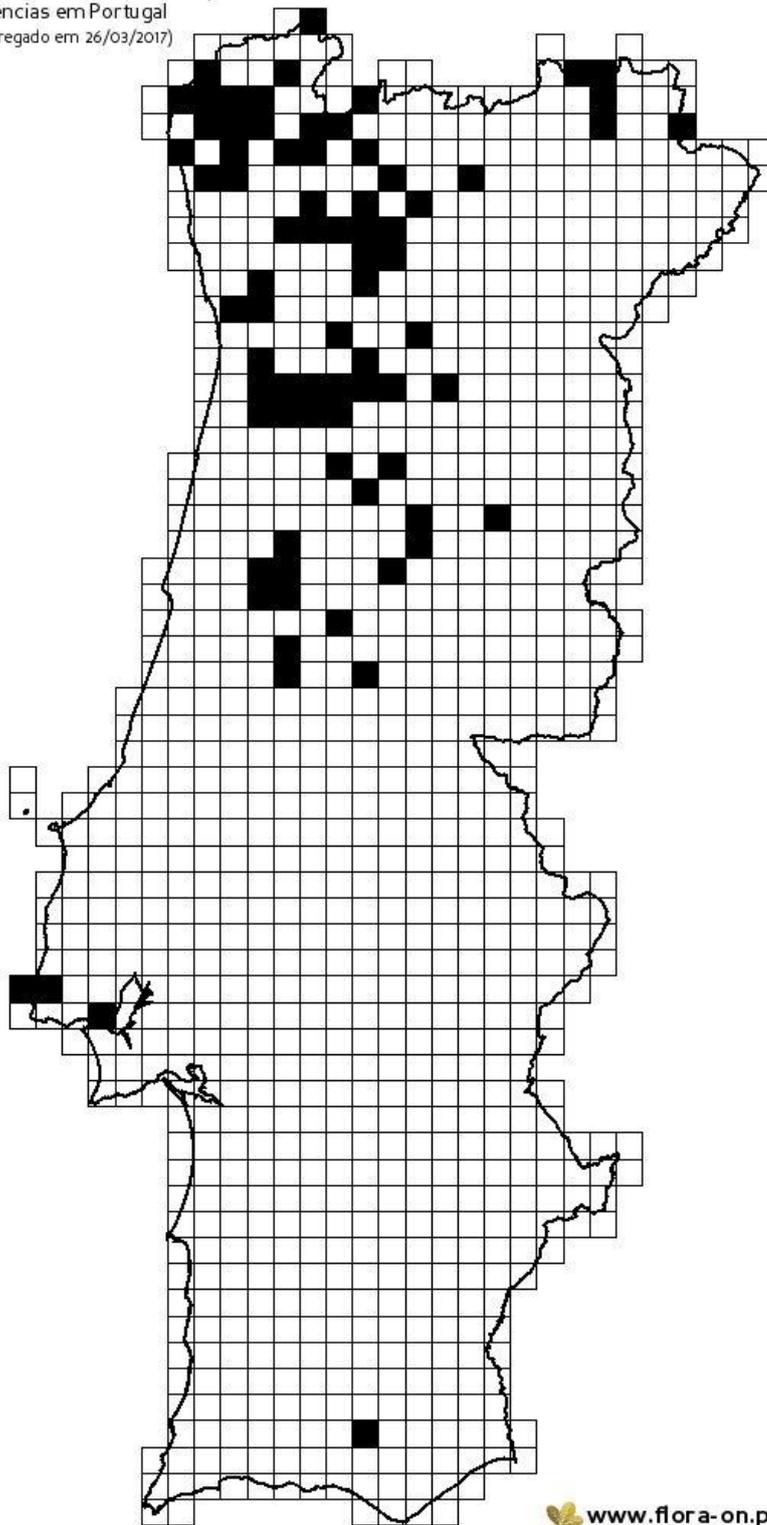
Fig. 2 – Folhas, flores e frutos de *Fragaria vesca* (adaptado de flora-on.pt)

Fragaria vesca L. subsp. *vesca*

ocorrências em Portugal

(desarregado em 26/03/2017)

Dados: P. V. Araújo, J. D. Almeida, J. Lourenço, F. Clamoite, A. Carapeto, A. Silva, M. Porto, C. Aguiar, D. T. Holyoak, J. Farminhão, A. J. Pereira, T. M. Henriques
 A informação contida neste mapa é alvo de actualizações frequentes, podendo estar incompleta
 O quadrícula usa UTM/10km Datum WGS84



 www.flora-on.pt

Fig. 3 – Ocorrência de *Fragaria vesca* em Portugal

1.3.1 Compostos bioativos presentes

O morangueiro apresenta um elevado conteúdo em compostos bioativos, dos quais os mais importantes são: flavonoides (flavonóis, como a quercetina e canferol e seus derivados), ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico), elagitaninos (agrimonina, lambertianina C), proantocianidinas e antocianinas (pelargonidina, cianidinas) (Vrhovsek, Guella e Gasperotti, 2012; Dyduch-Siemińska *et al*, 2015; Liberal *et al.*, 2015). Contém ainda catequinas, epicatequinas, epigalocatequinas, resveratrol e astringina (Mudnic *et al.*, 2009; Buřičová *et al.*, 2011).

As folhas demonstram a presença de flavonoides, antocianidinas, elagitaninos, ácidos fenólicos, óleos voláteis, catequinas, citral, metil salicilato, ácido elágico, borneol e quantidades vestigiais de alcalóides (Kanodia e Das, 2008; Madhuri e Pandey, 2009; Mudnic *et al.*, 2009; Yildirim e Turker, 2014; Liberal *et al.*, 2015). Os frutos contêm taninos, borneol, flavonoides, ácido elágico e também ácido salicílico (Kanodia e Das, 2008; Dias *et al.*, 2015). Nas raízes de *Fragaria vesca* foram identificados compostos fenólicos: flavonóis e derivados de ácido elágico (Dias *et al.*, 2015).

O conteúdo em metabolitos secundários varia de acordo com a origem da planta (habitats naturais ou de cultivo). As plantas provenientes de habitats naturais contêm mais flavonoides, taninos e compostos fenólicos que as cultivadas. As plantas de cultivo apresentam maior conteúdo em ácido elágico (Najda *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2015).

1.3.2 Atividade biológica

As partes da planta mais utilizadas são as folhas e os frutos. As folhas, pela presença de alta quantidade de compostos polifenólicos, exercem uma ação protetora sobre a pele (Cunha *et al.*, 2004). Os frutos são benéficos no tratamento de problemas de fígado e rins, reumatismo e gota (Kanodia e Das, 2008). As raízes foram tradicionalmente usadas na preparação de infusões pois possuem propriedades diuréticas e antissépticas (Najda *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2015).

À *Fragaria vesca* atribuem-se atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, adstringentes, anticoagulantes, analgésicas, vasodilatadoras, antitrombóticas, antibacterianas e anticarcinogénicas (Liberal *et al.*, 2014; Yildirim e Turker, 2014).

Um extrato etanólico dos frutos de *Fragaria* apresentou atividade significativa contra doenças inflamatórias intestinais induzidas em animais; os resultados obtidos são atribuídos

principalmente à presença de ácido salicílico nos frutos, um importante agente inflamatório, que atua por inibição da ciclooxigenase (Kanodia, Borgohain e Das, 2011).

Extratos etanólicos da planta e dos frutos revelaram atividade analgésica central e periférica, dependente da dose e com ação mediada pelos recetores opióides. Os resultados são comparáveis com a ação da aspirina, embora esta se revele mais potente (Kanodia e Das, 2008).

Encontra-se descrita atividade antioxidante de extratos hidrometanólicos das raízes do morangueiro. Os compostos responsáveis por esta atividade são flavonoides e derivados de ácido elágico (Madhuri e Pandey, 2009; Dias *et al.*, 2015). No caso dos frutos, os compostos antioxidantes são flavonoides, antocianidinas e ácidos fenólicos (Najda *et al.*, 2014; Dyduch-Siemińska *et al.*, 2015). Infusões e extratos etanólicos das folhas de *Fragaria vesca* apresentam também atividade antioxidante, que se correlaciona positivamente com o conteúdo das plantas em polifenóis (Oktyabrsky *et al.*, 2009). Um maior conteúdo em flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e antocianidinas nos frutos traduz-se numa maior atividade antioxidante (Oktyabrsky *et al.*, 2009; Buřičová *et al.*, 2011).

O papel cardioprotetor de *Fragaria vesca* pode ser explicado pela presença de fitoquímicos antioxidantes, particularmente compostos fenólicos. Foi estudado em modelos *in vitro* o potencial vasodilatador de um extrato aquoso das folhas de *Fragaria vesca*, onde foram identificadas catequinas e proantocianidinas em maiores concentrações. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso das folhas constitui um vasodilatador endotélio-dependente, dependente da dose e com ação vasodilatadora mediada pelo óxido nítrico (NO) e produtos da ciclooxigenase (Mudnic *et al.*, 2009).

1.4 Estrutura e funções da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e a sua principal função é constituir uma barreira entre o organismo e o ambiente externo, protegendo-o contra radiações perigosas e agentes externos (Weller *et al.*, 2008; Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015). Mantém a homeostasia corporal através de funções de termorregulação, e controlo da perda de água e previne a permeação de potenciais substâncias perigosas (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015). A perceção cutânea e diferenciação de formas e texturas são conseguidas devido à localização de células de Merkel nos extremos sensoriais, como as pontas dos dedos (Paul e Sharma, 2015). A presença de células de Langerhans na epiderme, com funções imunológicas, representa uma primeira linha de defesa contra

invasão de organismos patogênicos (McGrath, Eady e Pope, 2004; Paul e Sharma, 2015). Adicionalmente, a pele representa a via de administração de compostos ativos, tanto para ação local como sistêmica. Integra duas camadas: epiderme e derme, cada uma com estrutura e funções específicas (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

1.4.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa, sendo constituída por cerca de 20% de água, o que mantém a integridade e elasticidade da pele. A espessura varia entre 0,06 mm e 1mm. Na epiderme não existem vasos sanguíneos (Weller *et al.*, 2008; Benson e Watkinson, 2012). É formada por um conjunto de cinco camadas, em constante regeneração – estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (Angelopoulou, 2013).

Da camada mais interna, o estrato basal ou germinativo, provêm as células germinais para a regeneração das restantes camadas; ocorre a formação de uma camada de queratinócitos no estrato basal que, com a perda do núcleo e de outros organelos, se diferenciam progressivamente em corneócitos que atingem a superfície da pele (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015). Este é um processo constante de maturação, designado de queratinização (Angelopoulou, 2013). Deste modo, a estrutura da epiderme é variável, desde o estrato basal até ao estrato córneo, o mais superficial (Benson e Watkinson, 2012). O processo de renovação da epiderme dura aproximadamente 6 semanas (Paul e Sharma, 2015).

No estrato espinhoso os queratinócitos distribuem-se entre duas a seis camadas, têm forma poliédrica e grandes citoplasmas, organelos e núcleos. Ocorre a formação de desmossomas que permitem as conexões entre queratinócitos adjacentes. Nesta camada, principalmente, estão presentes as células de Langerhans, imunologicamente ativas, que capturam e processam antígenos (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

No estrato granuloso continua a diferenciação dos queratinócitos, agora anucleados. Normalmente, chamam-se células granuladas – libertam lípidos polares para os espaços extracelulares que são convertidos em lípidos apolares e formam uma barreira lipídica. Esta barreira hidrofóbica é a precursora da camada de lípidos existente no estrato córneo (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

O estrato lúcido está presente em partes do corpo onde a pele é mais espessa, como as palmas das mãos e pés (Angelopoulou, 2013). No estrato lúcido, o núcleo e os organelos

desintegram-se e as células sofrem compactação. A sua função é reduzir a fricção entre os estratos córneo e granuloso (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

A camada mais externa, o estrato córneo, é constituída por camadas de corneócitos – que são os queratinócitos no seu último estágio de diferenciação, perderam o núcleo e os organelos (McGrath, Eady e Pope, 2004; Paul e Sharma, 2015). São ricas em queratina e encontram-se envolvidas numa matriz de lípidos intercelulares, num arranjo estrutural em camadas. O estrato córneo forma assim uma barreira eficaz contra as perdas de água e previne a permeação de substâncias potencialmente perigosas e de microorganismos (Weller *et al.*, 2008; Benson e Watkinson, 2012). É portanto a barreira primária à permeação de fármacos, especialmente para compostos hidrossolúveis (Kaur e Guleri, 2013).

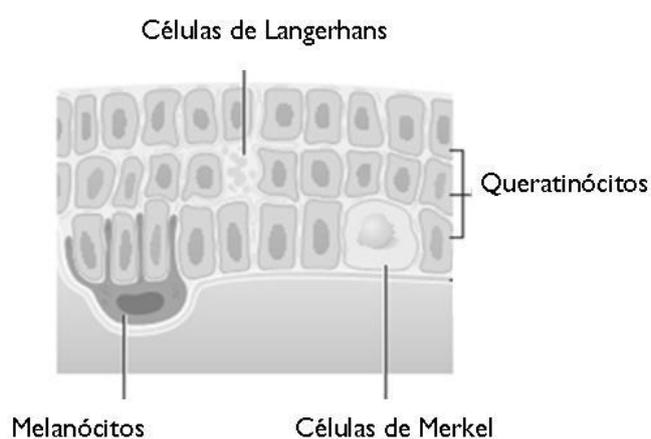


Fig. 4 – Células da epiderme (melanócitos, queratinócitos, células de Langerhans e células de Merkel) (adaptado de Weller *et al.*, 2008)

1.4.2 Derme

A derme é a segunda camada da pele e confere-lhe a sua flexibilidade, elasticidade e força. A sua espessura varia entre 2 e 5 mm e é constituída por fibras de colagénio que têm como função fornecer suporte e integridade aos tecidos (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

É bastante vascularizada, com vasos sanguíneos e linfáticos, e fornece os nutrientes necessários à epiderme (Angelopoulou, 2013). A rede vascular regula a temperatura corporal, fornece oxigénio e nutrientes e remove toxinas dos tecidos (Benson e Watkinson, 2012). Encontra-se nesta camada uma grande quantidade de células: fibroblastos, que segregam componentes de tecido conjuntivo (colagénio, laminina, fibronectina e elastina);

células imunitárias (mastócitos, monócitos, macrófagos) (McGrath, Eady e Pope, 2004; Benson e Watkinson, 2012).

A derme divide-se em duas camadas: a camada papilar mais externa contém a rede vascular; a camada reticular, mais espessa, acondiciona as glândulas sebáceas, sudoríparas e os folículos (Angelopoulou, 2013). O sebo produzido protege e lubrifica a pele e mantém o pH da superfície por volta de 5 e também age como uma barreira contra substâncias estranhas (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

1.4.3 Hipoderme

Existe uma camada mais interna, a hipoderme, ou tecido subcutâneo, que interliga a pele às estruturas internas (músculos e ossos) através de tecido conetivo especial (septa) constituído por vasos sanguíneos, células nervosas, elastina e colagénio (Cunha, Cunha e Machado, 2014; Paul e Sharma, 2015). Cerca de 50% da hipoderme são células gordas (adipócitos) interligadas por fibras de colagénio e elastina, responsáveis por manter uma barreira de isolamento térmico e pela regulação da temperatura corporal. Fornece reservas de energia e confere proteção contra choques físicos (Benson e Watkinson, 2012; Paul e Sharma, 2015).

1.5 Melanina

A melanina é o pigmento responsável pela cor da pele, olhos e cabelo em humanos. As suas propriedades são benéficas para o organismo: absorve os UV, é antioxidante e captura radicais livres, protegendo assim as células epidermais de danos (Cichorek *et al.*, 2013; Nasti e Timares, 2015). É sintetizada em células especializadas designadas melanócitos, que se localizam na camada basal da epiderme, onde se associam individualmente a aproximadamente 30-40 queratinócitos (Cichorek *et al.*, 2013; Videira, Moura e Magina, 2013). Estas estruturas constituem unidades epidermais que estão presentes em menor abundância na derme (Costa *et al.*, 2011; Nasti e Timares, 2015). As unidades epidermais são responsáveis pela produção e distribuição da melanina num processo designado por melanogénese (Gillbro e Olsson, 2011; Videira, Moura e Magina, 2013). A presença de melanócitos no corpo humano não está limitada à epiderme, cabelo e olhos, as estruturas às quais conferem cor. Os melanócitos também existem no ouvido interno, sistema nervoso e coração (Cichorek *et al.*, 2013).

No interior dos melanócitos existem organelos citoplásmicos, os melanossomas, onde ocorre a melanogénese (Angelopoulou, 2013). Neste processo, os melanossomas são secretados para o exterior dos melanócitos e para o interior dos queratinócitos adjacentes. Os mecanismos desta transferência não estão ainda claramente definidos, mas a literatura propõe, maioritariamente, um mecanismo de processos dendríticos (Cichorek *et al.*, 2013; Nasti e Timares, 2015). Por sua vez os queratinócitos contendo a melanina ascendem pelas camadas da epiderme como parte do seu processo constante de regeneração (Angelopoulou, 2013). Deste modo, a melanina é formada nas camadas mais interiores da pele e, associada aos queratinócitos na forma de melanossomas, movimenta-se progressivamente para as camadas exteriores até atingir o estrato córneo (figura 5) (Angelopoulou, 2013).

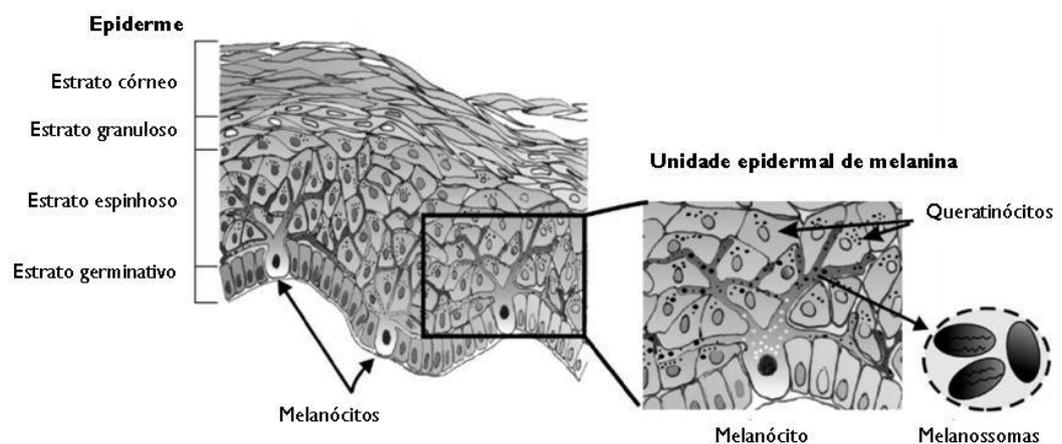


Fig. 5 – Estrutura da epiderme e localização dos melanócitos (adaptado de Cichorek *et al.*, 2013)

1.5.1 Melanogénese

Quando sujeita a exposição à radiação UV, a melanogénese é favorecida por diferentes mecanismos: proliferação de melanócitos; ativação da enzima tirosinase, localizada na membrana dos melanossomas; libertação por parte dos queratinócitos de citocinas e outros fatores que sinalizam os melanócitos para aumentar a melanogénese (Yamakoshi *et al.*, 2003; Gillbro e Olsson, 2011; Nasti e Timares, 2015).

Nos melanossomas são sintetizados dois tipos de melanina: eumelanina e feomelanina. A eumelanina é um pigmento insolúvel de coloração preta e acastanhada; a feomelanina, solúvel em meio alcalino, apresenta coloração amarela e vermelha (Gillbro e Olsson, 2011; Solano, 2014). Ambas são formadas a partir do aminoácido essencial

fenilalanina através de uma série de passos enzimáticos no fígado e na pele. A tirosina é formada no fígado por hidroxilação da fenilalanina, pela fenilalanina hidroxilase, e torna-se o substrato para as reações subsequentes nos melanócitos (Weller *et al.*, 2008).

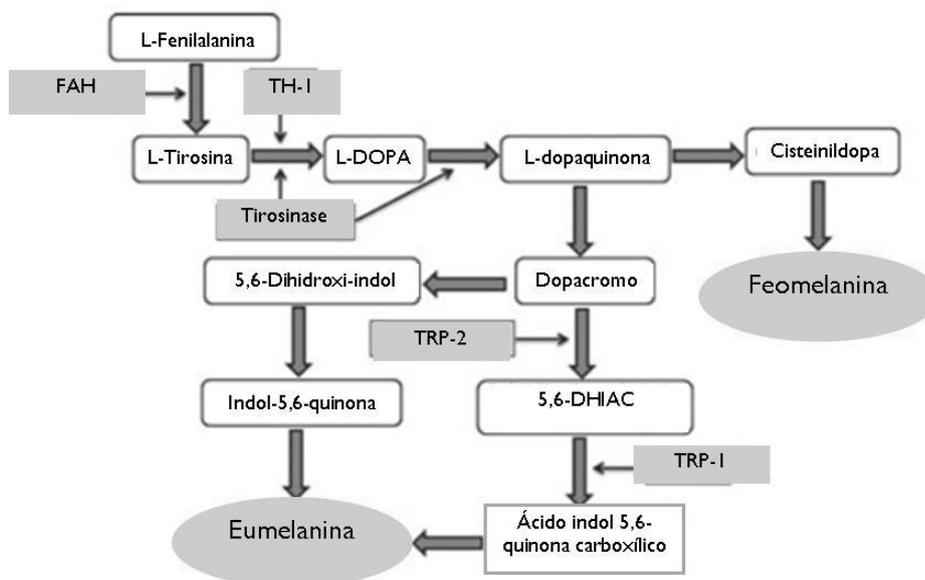


Fig. 6 – Via sintética da melanina (adaptado de Gillbro e Olsson, 2011)

A tirosinase é uma metaloenzima contendo cobre e é a enzima chave na melanogênese. Catalisa as primeiras duas reações na síntese endógena de melanina: a hidroxilação da L-tirosina a L-dihidroxfenilalanina (L-DOPA) e a subsequente oxidação deste *o*-difenoil à correspondente *o*-quinona, a L-dopaquinona (Kusumawati *et al.*, 2015; Ortiz-Ruiz *et al.*, 2016). Esta é instável e extremamente reativa: polimeriza espontaneamente para formar a melanina e, nesta fase, a via sintética divide-se entre a síntese da eumelanina e da feomelanina (Gillbro e Olsson, 2011; Kusumawati *et al.*, 2015). A via da feomelanina é dependente da presença de cisteína. Através de reação com a L-dopaquinona, forma cisteinil-dopa que posteriormente oxida e polimeriza em feomelanina. Na ausência de cisteína, a L-dopaquinona cicliza espontaneamente em dopacromo que, por sua vez, pode seguir uma via espontânea, ou uma via enzimática (mediada pelas enzimas TRP-1 e TRP-2), até terminar com a formação da eumelanina (figura 6) (Gillbro e Olsson, 2011; Cichorek *et al.*, 2013).

A pele humana contém uma mistura dos dois tipos de melanina. A eumelanina fornece as cores escuras, de castanho a preto, portanto é maioritária em indivíduos de pele e cabelo escuros; a feomelanina confere as cores amareladas e avermelhadas, sendo predominantemente encontrada nos indivíduos de pele clara (Cichorek *et al.*, 2013; Videira, Moura e Magina, 2013; Solano, 2014).

A diversidade fenotípica da pigmentação da pele de indivíduos humanos não depende do número de melanócitos – estima-se que existam 1200 melanócitos por mm² de pele humana – mas está diretamente relacionada com o número, tamanho e distribuição dos melanossomas nos melanócitos (Angelopoulou, 2013; Cichorek *et al.*, 2013; Videira, Moura e Magina, 2013). Os melanossomas nos indivíduos de pele negra são maiores, mais numerosos e alongados, o que se traduz numa degradação mais tardia nos queratinócitos, e consequentemente num aumento da pigmentação visível. Nestes indivíduos, 18 a 43% do volume da epiderme é ocupado por melanossomas. Contrariamente, os melanossomas produtores de feomelanina são pequenos e ovais, e nos indivíduos de pele clara os melanossomas atingem apenas 1,5-6,3% do volume da epiderme (Angelopoulou, 2013; Videira, Moura e Magina, 2013). Estas diferenças estão presentes à nascença e não são determinadas por fatores extrínsecos, como a exposição posterior aos raios UV (Videira, Moura e Magina, 2013).

1.5.2 Exposição da pele à radiação UV

O espectro da radiação ultravioleta divide-se em três categorias, consoante o comprimento de onda: UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) (Saewan e Jimtaisong, 2013; Slominski e Postlethwaite, 2015). Os raios UVC são muito perigosos para a pele, mesmo em exposição curta, mas são totalmente absorvidos pelo ozono na estratosfera terrestre, que absorve também uma parte dos UVB (Saewan e Jimtaisong, 2013). Aproximadamente 95% dos raios UV que atingem a superfície terrestre são UVA, e 5% são UVB (Nasti e Timares, 2015).

A radiação UV favorece a formação de espécies reativas de oxigénio nas células da pele e reduz significativamente os antioxidantes endógenos, o que acelera os processos de envelhecimento da pele (Deuschle *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016). O excesso de radicais livres e stress oxidativo resulta em cascatas de eventos mediadores de deterioração progressiva das estruturas celulares e conduz à perda de integridade celular, modificações no DNA e, consequentemente, à expressão anormal de genes. O fotoenvelhecimento e a fotocarcinogénese são os efeitos crónicos dos raios UV, induzidos pelas mutações e imunossupressão (Brenner e Hearing, 2008; Saewan e Jimtaisong, 2013).

Os raios UVA são os principais responsáveis pelo aumento da síntese de melanina aquando da exposição solar. A exposição crónica aos UVA pode danificar as estruturas na derme, produzir danos estruturais indiretos no DNA pela produção de espécies reativas de

oxigénio, debilitar o sistema imunitário e causar o fotoenvelhecimento prematuro da pele (Brenner e Hearing, 2008; Saewan e Jimtaisong, 2013; Solano, 2014).

A radiação UVB é muito energética e constitui um potente agente mutagénico que exerce danos diretos no DNA e induz alteração da estrutura dos nucleótidos. Outros efeitos biológicos envolvem a indução dos cancros de pele e efeitos de imunossupressão. A radiação UVB consegue atingir a derme superficial, e é 1000 vezes mais capaz de causar queimaduras solares que os UVA (Brenner e Hearing, 2008; Saewan e Jimtaisong, 2013; Slominski e Postlethwaite, 2015). A radiação UVB estimula a produção e libertação de prostaglandinas, leucotrienos, histamina, interleucinas. Estes fatores, por sua vez, estimulam a produção da iNOS, que gera altas concentrações de óxido nítrico e, após algumas horas, origina a vasodilatação e vermelhidão características de uma queimadura solar (Weller *et al.*, 2008).

Com base na cor de pele e na resposta à exposição solar, foi desenvolvida uma classificação de fototipos de pele (tabela I). Os fatores que influenciam o fototipo são essencialmente a reação da pele à exposição solar e a disposição genética (Sachdeva, 2009).

Tabela I – Fototipos de pele (Sachdeva, 2009)

Fototipo	Reação à exposição solar
I	Queima com facilidade, nunca bronzeia
II	Queima com facilidade, bronzeia pouco e com dificuldade
III	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente e uniformemente
IV	Queima pouco, bronzeia moderadamente e facilmente
V	Raramente queima, bronzeia sempre
VI	Nunca queima

I.5.3 Mecanismos de proteção

A melanina previne os danos na pele causados pela exposição aos raios UV. A exposição da epiderme humana ao sol origina um efeito bronzeado, devido à produção aumentada do pigmento fotoprotetor. O efeito bronzeador envolve duas reações distintas: 1. Pigmentação imediata, que ocorre poucas horas após a exposição e é devido à oxidação da melanina já existente e sua redistribuição nos melanossomas das camadas superficiais da epiderme. Desaparece pouco tempo depois. 2. Bronzeamento tardio, que ocorre 3-4 dias após a exposição e consiste na produção de eumelanina, fornecendo fotoproteção. Depende da proliferação dos melanócitos, de um aumento na atividade da tirosinase e produção de melanossomas (Weller *et al.*, 2008; Videira, Moura e Magina, 2013; Solano, 2014).

A eumelanina e a feomelanina diferem entre si em termos de propriedades físicas, químicas e estruturais e, deste modo, são definidas as suas funções (Meredith e Sarna, 2006; Nasti e Timares, 2015).

Os efeitos benéficos da melanina são atribuídos à eumelanina, a mais eficiente na fotoproteção. O pigmento na forma reduzida pode doar um eletrão a uma espécie reativa de oxigénio e, deste modo, a eumelanina reduz a quantidade de ROS prevenindo os danos. A estrutura fica oxidada, resultando no escurecimento do pigmento. É também capaz de absorver e dispersar a radiação UV, diminuindo assim os efeitos nefastos do sol (Draelos *et al.*, 2013; Videira, Moura e Magina, 2013; Nasti e Timares, 2015; Slominski e Postlethwaite, 2015).

A feomelanina não apresenta as mesmas propriedades. A estrutura não pode doar eletrões e, como resposta à radiação, gera radicais livres, favorecendo efeitos mutagénicos e carcinogénicos. É o tipo de melanina mais comum nos fototipos de pele I e II e, por esta razão, as pessoas de pele clara estão 70 vezes mais propensas a desenvolver cancro de pele, melanomas e fotoenvelhecimento precoce que indivíduos dos fototipos V e VI (Draelos *et al.*, 2013; Nasti e Timares, 2015). Perante estes dados, naturalmente questionamos a razão de nos processos evolutivos não ter sido eliminado um fator carcinogénico e se existe algum efeito positivo adicional que tal justifique. As funções benéficas da feomelanina não estão totalmente esclarecidas, mas a frequência elevada de população loira e ruiva em latitudes elevadas sugere que a produção elevada de feomelanina permite que a radiação UVB atinja camadas mais internas da pele, onde favorece a conversão de precursores da vitamina D nos passos essenciais da síntese (Nasti e Timares, 2015; Slominski e Postlethwaite, 2015).

1.6 Efeito despigmentante

A melanogênese é um processo complexo com diferentes etapas e, quando perturbada, determina diferentes defeitos de pigmentação, classificados em hipo ou hiperpigmentação. A produção excessiva de melanina causa hiperpigmentação, que se reflete em marcas na pele como melasma e sardas. Hipopigmentação surge quando ocorrem mutações que inativam a tirosinase e são responsáveis pelo albinismo tipo I (albinismo oculocutâneo), a sua forma mais grave caracterizada pela ausência total de melanina – (Videira, Moura e Magina, 2013; Ortiz-Ruiz *et al.*, 2016).

Dada a crescente preocupação com a aparência da pele, aumenta a procura por produtos cosméticos com capacidade de alterar o nível de pigmentação. O efeito despigmentante é, normalmente, atingido através da inibição da atividade ou expressão da tirosinase. Hoje conhecem-se variadas substâncias capazes de reduzir o nível de pigmentação da pele, através deste efeito inibitório, tais como ácido kójico, arbutina, proantocianidinas, e alguns extratos de plantas, como *Magnolia grandiflora* L., e *Rhodiola rosea* – (Yoshimura *et al.*, 2005; Gillbro e Olsson, 2011; Lee *et al.*, 2016).

O ácido elágico encontra-se descrito como inibidor da melanogênese, nos primeiros passos da biossíntese de melanina. A literatura sugere que o seu efeito despigmentante é largamente devido à capacidade antioxidante desta molécula, que pode reagir com as o-quinonas originadas na melanogênese. Outros mecanismos indicam que o ácido elágico inibe a atividade da tirosinase ao quelatar os iões de cobre no local ativo e regula assim a produção de melanina na camada basal da epiderme – (Shimogaki *et al.*, 2000; Draelos *et al.*, 2013; Ortiz-Ruiz *et al.*, 2016).

1.7 Administração na pele

Os produtos de aplicação cutânea inserem-se em duas categorias: a produção de efeito tópico por ação local ou de um efeito sistémico por via transdérmica. Os produtos aplicados para ação sistémica são designados transdérmicos. Nesta via existe a vantagem de se evitar o efeito de primeira passagem hepática; quando aplicados na pele intacta libertam o fármaco por difusão através da pele até atingir a circulação sistémica (Ueda *et al.*, 2009).

A via de administração tópica consiste na aplicação direta na pele, que produz um efeito local e maximiza a concentração de princípio ativo no tecido alvo. Estes produtos têm a sua atividade à superfície da pele no estrato córneo, ou modulam funções na epiderme. Os

cremes, géis, loções, pomadas, suspensões e *sprays*, com características físicas variáveis enquadram-se nesta categoria de produtos (Ueda *et al.*, 2009).

A via de administração tópica tornou-se importante para a administração de compostos para tratamentos de variadas condições de pele (Vromen, 2007). Entre as vantagens desta via, encontram-se a melhor aceitação por parte dos doentes, pois trata-se de um método não invasivo que possibilita a auto administração (Goyal *et al.*, 2011). O efeito localizado maximiza a obtenção do efeito terapêutico e minimiza a ocorrência de efeitos secundários (Goyal *et al.*, 2011; Guleri e Preet, 2013). É, no entanto, mais suscetível de causar irritações ou alergias e é frequentemente difícil obter concentrações elevadas do princípio ativo. No caso de formulações aquosas não é possível utilizar compostos ativos hidrófobos (Vromen, 2007).

1.8 Cosméticos

Um produto cosmético é qualquer substância ou mistura destinada a ser colocada em contacto com qualquer parte externa do corpo humano (epiderme, sistema piloso, sistema capilar, unhas) ou com os dentes e mucosas bucais. Os objetivos principais incluem limpeza, proteção, alteração do aspeto e correção de odores corporais. Abrangem os produtos de higiene corporal e produtos de beleza (INFARMED).

Em Portugal, o INFARMED é a entidade nacional responsável pelo controlo e regulação do mercado de cosméticos, e por prevenir e gerir os riscos relacionados com a utilização dos mesmos (INFARMED).

O Regulamento (CE) 1223/2009 estabelece os requisitos que um cosmético deve cumprir para poder ser colocado no mercado, assegurando assim um elevado nível de proteção da segurança humana. Os produtos cosméticos não necessitam de uma autorização de colocação no mercado; existe uma pessoa singular ou coletiva responsável pela colocação no mercado, e pela segurança dos produtos, pelo que deve garantir o cumprimento das obrigações aplicáveis previstas no Regulamento (CE) 1223/2009. A mesma pessoa deve criar um ficheiro de informações sobre o produto, que contém uma descrição do mesmo, uma descrição do processo de fabrico e uma declaração de conformidade com as boas práticas de fabrico. Estas informações são reportadas através do CPNP (Portal de Notificação de Produtos Cosméticos) – (INFARMED; Regulamento (CE) n° 1223/2009).

É ainda necessário assegurar que os produtos foram submetidos a uma avaliação da segurança e que a rotulagem se encontra segundo as normas. Na embalagem devem,

obrigatoriamente, constar uma lista de ingredientes, a função do produto, nome e endereço da pessoa responsável, entre outras menções (Regulamento (CE) n° 1223/2009).

A utilização de substâncias classificadas como mutagénicas, carcinogénicas e/ou tóxicas para a reprodução é proibida. Contudo, podem ser utilizadas mediante exceções, como a ausência de substâncias alternativas adequadas, ou quando sejam consideradas seguras para utilização em produtos cosméticos, atendendo à exposição a esses produtos. Uma base de dados da Comissão Europeia, *CosIng*, permite o acesso a informações sobre os ingredientes e substâncias em cosméticos, incluindo requisitos legais e restrições – (COMISSÃO EUROPEIA; Regulamento (CE) n° 1223/2009).

No caso de surgirem efeitos indesejáveis, estes devem ser notificados à autoridade competente do Estado-Membro indicando a ocorrência, o produto cosmético em causa e as medidas de precaução tomadas. O estudo destes dados pode gerar a alteração das menções na rotulagem ou retirada do produto cosmético do mercado – (INFARMED; Regulamento (CE) n° 1223/2009).

1.8.1 Géis

Um gel é uma rede tridimensional, de dois componentes, onde os materiais estruturais se encontram intercalados por uma quantidade adequada de líquido. Como resultado, forma-se uma estrutura reticulada rígida, que imobiliza no interior a fase líquida. Os materiais estruturais podem ser pequenas partículas inorgânicas, ou grandes moléculas orgânicas (Kaur e Guleri, 2013).

A classificação dos géis segue dois parâmetros: consoante a natureza da fase colóide podem ser orgânicos ou inorgânicos; e de acordo com a natureza do solvente podem ser géis aquosos ou não aquosos. Os polímeros constituem a rede estrutural essencial para a formação do gel. São classificados em polímeros naturais, semissintéticos e sintéticos (Goyal *et al*, 2011).

Uma formulação em gel fornece melhores propriedades de aplicação e estabilidade e ocorre, neste caso, uma libertação mais rápida da substância ativa, independentemente da solubilidade do fármaco, comparativamente aos cremes e pomadas. Os géis para uso dermatológico possuem propriedades favoráveis: são fáceis de espalhar, são emolientes, não corantes, compatíveis com variados excipientes e solúveis ou miscíveis em água. Adicionalmente, os géis são facilmente preparados, biocompatíveis e, portanto, com um

menor risco de inflamação quando aplicados e não necessitam de remoção (Abdel-Hamid et al, 2006; Helal et al, 2012; Kaur e Guleri, 2013).

Os extratos naturais em formulações cosméticas, produtos designados fitocosméticos, são extensamente utilizados, mas deve-se ter em conta aspetos relacionados com a sua estabilidade quando incorporados nas formulações (Deuschle et al., 2015). Os testes de estabilidade física e química são parâmetros a considerar no processo de preparação, armazenamento e aplicação dos produtos formulados. As formas de aplicação tópica devem apresentar propriedades mecânicas apropriadas, tais como bioadesão, viscosidade aceitável e libertação adequada dos ingredientes ativos (Hurler et al. 2012).

1.9 Objetivos

Para a realização deste trabalho foram definidos os seguintes objetivos:

- A otimização de um processo extrativo para a obtenção de um extrato enriquecido com elagitaninos, conhecidos pela sua atividade inibidora de tirosinase, a partir das folhas de *Fragaria vesca*;
- A determinação da atividade do extrato sobre a tirosinase;
- A caracterização do extrato por HPLC, para determinar a sua composição em compostos fenólicos;
- O desenvolvimento de uma formulação cosmética em gel, para aplicação tópica, com posterior incorporação do extrato de *Fragaria vesca*;
- O estudo da estabilidade da formulação, tendo em conta parâmetros como a temperatura, pH, a exposição e ausência de luz solar;
- A avaliação da segurança do gel e do extrato *in vitro*, utilizando para tal uma cultura de células HaCaT e o método do MTT para avaliação da viabilidade celular;
- A avaliação em testes de segurança com voluntários humanos do potencial irritativo da preparação cosmética.

II - Materiais e métodos

2.1 Reagentes e materiais

Os reagentes e materiais usados no trabalho laboratorial encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Materiais utilizados

Material	Proveniência	Utilização
Acetonitrilo	Merck	Fase móvel para TLC
Acido fórmico 98-100%	Merck	Fase móvel para TLC
Água destilada	Lab. Tecnologia Farmacêutica	Preparação dos géis
Carbopol (carbómero 940)	Fagron	Polímero
Carbonato de sódio	Merck	Doseamento dos taninos
Etanol absoluto	Merck	Obtenção do extrato
Etanol a 96%		Conservante
Cloreto de ferro III hexahidratado	Acros	Revelador na TLC
Hidroxietilcelulose (250 hx)	Natrosol pharm	Polímero
L-DOPA (0,5 mM)	Sigma-Aldrich	Ensaio de atividade da tirosinase
Metanol	VWR	Fase móvel de HPLC
Metilcelulose-1000	Acofarma	Polímero
Metilparabeno	Acros organics	Concentrado de parabenos
Pirogalhol	Sigma	Padrão no doseamento dos taninos
Pó de pele		Doseamento de fenóis
Propilenoglicol	José Manuel Gomes dos Santos, Lda	Conservante Concentrado de parabenos
Propilparabeno	Acros organics	Concentrado de parabenos
Reagente de Folin-Ciocalteu	Merck	Doseamento dos taninos
Sorbato de potássio		Conservante
Tetrahidrofurano	Koch-Light	Fase móvel para TLC
Tirosinase de cogumelo	Sigma-Aldrich	Ensaio de atividade da tirosinase

2.2. Material botânico

O material vegetal usado consistiu num lote de folhas secas de *Fragaria vesca*, colhidas em Maio de 2011, em Granja de Figueira do Lorvão, Penacova.

2.3 Otimização do processo extrativo

O presente procedimento laboratorial foi adaptado do descrito na bibliografia, por Liberal *et al* (2014).

Numa fase inicial foi utilizada uma quantidade pequena da amostra, para proceder à otimização do extrato. As folhas secas foram trituradas, tamisadas (Tamis ENDECOTT'S de 2500 malhas/cm²) e preparados extratos etanólicos em tubos *eppendorf*, na proporção de 1:20 (m/v), nas seguintes diluições: 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Realizou-se agitação mecânica por 1 minuto e foram colocados no frio. No dia seguinte, retirou-se o sobrenadante que foi transferido para novo *eppendorf*. A fim de verificar a presença de elagitaninos na presente amostra, foi realizada uma cromatografia em camada fina (TLC), em placa de sílica gel, com fase móvel de água:acetonitrilo:THF:ácido fórmico nas proporções 80:5:15:2 e um sal de FeCl₃ a 3% em metanol, como revelador, segundo o procedimento descrito por Piwowarski e Kiss (2013).

2.3.1 Preparação do extrato de *Fragaria vesca*, com etanol a 50%

As folhas de *Fragaria vesca* foram trituradas e tamisadas, até que ficassem em pó, totalizando uma massa inicial de amostra de 96 g. A extração foi realizada numa proporção de 1:10 (m/v) com etanol a 50%, à temperatura ambiente e com agitação magnética de 750 rpm durante 1 hora. Para este efeito, o volume foi dividido por dois balões *Erlenmeyer*. O segundo passo consistiu na filtração a vácuo do extrato. Foram realizadas três extrações no total, que foram controladas por TLC até não ser revelada presença de elagitaninos. O filtrado foi concentrado num evaporador rotativo para eliminação do etanol e posteriormente liofilizado.

O extrato obtido foi conservado a -22°C até à data de utilização.



Fig. 7 – Agitação magnética

2.3.2 Caracterização do extrato por HPLC

A análise do extrato por HPLC foi realizada num cromatógrafo Gilson, equipado com duas bombas (modelos 305 e 306); misturador (modelo 811); módulo manométrico (modelo 805); injetor automático (Gilson 234 Autoinjeter) acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) (Gilson, modelo 107) e uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint 2.10).

Foram utilizadas uma coluna analítica RP18 Spherisorb Waters, fase ODS-2, tamanho de partículas de 5 μm (4,6 x 250 mm) e uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, fase C-18, Macherey-Nagel (Düren, Germany).

Como fase móvel foi utilizado ácido fórmico a 5% (v/v) (eluente A) e metanol (eluente B), num gradiente que variou do seguinte modo: 5-15% B (0-10m), 15-25% B (10-15m), 25-50% B (15-50m), 50-80% B (50-60m), 80-100% B (60-70m).

Foram injetados 100 μL de amostra (1,8 mg de extrato solubilizadas em 1 mL de metanol a 50%). A eluição foi efetuada à temperatura de 21°C a um fluxo de 1 mL/min. Os compostos foram identificados pelos tempos de retenção obtidos e ordem de eluição, em comparação com os cromatogramas e espectros UV obtidos anteriormente por Liberal *et al* (2014).

2.3.3 Avaliação de atividade inibidora da tirosinase

O ensaio foi realizado com algumas modificações ao procedimento descrito por Masamoto *et al.*, 2003.

A mistura de reação, contendo solução 0,5 mM de L-DOPA, tampão de fosfato de sódio com ou sem amostra, no volume total de 1 mL foi pré-incubada a 25°C por 10 minutos. Foi então adicionado 0,1 mL de solução aquosa de tirosinase de cogumelo (35U/mL) e a reação foi monitorizada, com a variação de absorvância a 475 nm durante 3 min, a intervalos de 10 s. Uma reação de controlo foi conduzida em DMSO.

A percentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada através da seguinte expressão, onde A representa a variação de absorvância da amostra controlo entre 30 e 90s de incubação; e B representa a variação de absorvância da amostra teste entre 30 e 90s de incubação.

$$\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

2.4 Preparação das formulações em gel

Numa fase inicial foram preparados diversos géis, de várias viscosidades, com os polímeros metilcelulose, hidroxietilcelulose e carbopol, tomando como base o Formulário Galénico Português (2001). A composição de cada um dos três géis mais promissores nesta fase está representada nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Composição por 100g do gel de metilcelulose a 3%, com parabenos como conservante

Componentes	Quantidade
Metilcelulose	3 g
Água	96 g
Concentrado de parabenos	1 g

Tabela 4 – Composição por 100g do gel de hidroxietilcelulose a 2,5%, com etanol como conservante

Componentes	Quantidade
Hidroxietilcelulose	2,5 g
Água	75 g
Etanol 96%	22,5 g

Tabela 5 – Composição por 100g do gel de carbopol a 1%, com parabenos como conservante

Componentes	Quantidade
Carbopol	1 g
NaOH (aq) 10% m/V	1,6 mL
Água	q.b.p. 100 g
Concentrado de parabenos	1,5 g

Os géis preparados apresentaram características de viscosidade e pH compatíveis com a aplicação tópica. Os procedimentos da preparação foram posteriormente adaptados para a incorporação do extrato a concentração de 2% na formulação final, segundo a composição indicada nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – Composição por 100 g do gel de metilcelulose a 3%, com parabenos como conservante

Componentes	Quantidade
Extrato	2 g
Metilcelulose	3 g
Água	94 g
Concentrado de parabenos	1 g

Tabela 7 – Composição por 100 g do gel de hidroxietilcelulose a 2,5%, com etanol como conservante

Componentes	Quantidade
Extrato	2 g
Hidroxietilcelulose	2,5 g
Água	73 g
Etanol 96%	22,5 g

Tabela 8 – Composição por 100 g do gel de carbopol a 1%, com parabenos como conservante

Componentes	Quantidade
Extrato	2 g
Carbopol	1 g
NaOH (aq) 10% m/V	1,6 mL
Água	q.b.p. 100 g
Concentrado de parabenos	1,5 g

A formulação com o polímero de metilcelulose não gelificou, mostrando-se incompatível com o extrato. De modo a desenvolver uma formulação com o mínimo de ingredientes e o mais natural possível, foi dada preferência à otimização do gel de hidroxietilcelulose.

Foram preparados géis de hidroxietilcelulose com diferentes conservantes (sorbato de potássio; propilenoglicol) segundo a composição indicada nas tabelas 9 e 10.

Todos os componentes foram pesados numa balança semi-micro OHAUS DV215CD Discovery. A HEC foi transferida para um almofariz de porcelana. O extrato foi incorporado no volume de água, onde posteriormente foi adicionado o conservante. Esta mistura foi adicionada com agitação à HEC no almofariz, em três vezes intervaladas por 10 minutos. O gel permaneceu em repouso durante pelo menos 6 horas antes de ser armazenado em recipiente apropriado (F.G.P., 2001).

Tabela 9 – Composição por 100 g do gel de hidroxietilcelulose, com sorbato de potássio como conservante

Componentes	Quantidade
Extrato	2 g
Hidroxietilcelulose	3 g
Água	94,4 g
Sorbato de potássio	0,6 g

Tabela 10 – Composição por 100 g do gel de hidroxietilcelulose, com propilenoglicol como conservante

Componentes	Quantidade
Extrato	2 g
Hidroxietilcelulose	5 g
Água	88 g
Propilenoglicol	5 g

A formulação com propilenoglicol a 5% desenvolveu fungos uma semana após a preparação; a formulação com sorbato de potássio a 0,6% não tinha sido preparada há tempo suficiente para se avaliar a eficácia do conservante, pelo que poderia também desenvolver fungos. Dada esta incerteza, foi selecionada a formulação de hidroxietilcelulose com etanol 96% como conservante para avanço no trabalho (tabela 7).

O aspeto final do gel encontra-se representado na figura 8. Esta formulação foi preparada em maiores quantidades e foi sujeita a estudos de estabilidade pela avaliação da variação dos seguintes parâmetros: pH, viscosidade e características organoléticas.



Fig. 8 – Aspeto final do gel de hidroxietilcelulose, contendo 2% de extrato de *Fragaria vesca*

2.5 Estudos de estabilidade das formulações

A formulação selecionada foi preparada em maior quantidade (400 gramas do gel de hidroxietilcelulose foram divididos em 4 lotes de 100 g) e sujeita a estudos de avaliação dos seguintes parâmetros: pH, viscosidade, características organolépticas e ensaios de estabilidade. Os lotes foram armazenados em condições diferentes (Tabela II): uma amostra em copo de vidro foi armazenada à temperatura ambiente, sujeita aos ciclos solares; dos restantes, um lote foi conservado à temperatura ambiente, mas sem influência dos ciclos diurnos; outro lote a 5°-9°C (frigorífico), e o quarto em estufa, à temperatura de 40°C e 75% de humidade.

Tabela II – Condições de armazenamento dos géis

Amostras	Condições
Lote 1	Temperatura ambiente Exposto a ciclos diurnos de luz solar
Lote 2	Temperatura ambiente Ao abrigo da luz solar
Lote 3	5°-9°C, ao abrigo da luz
Lote 4	40°C, 75% de humidade Ao abrigo da luz

2.5.1 Análise organoléptica

Foram avaliadas as características organolépticas dos quatro lotes da formulação, nomeadamente a cor, o aspeto e o odor, no dia da preparação (dia 0), após 14 dias, e após 28 dias de armazenamento nas condições da tabela II.

2.5.2 Determinação do pH

Os produtos para aplicação na pele devem ter um pH compatível com a mesma, que varia entre 4 e 6 consoante a zona, sendo em média ligeiramente abaixo de 5 – (Ali e Yosipovitch, 2013; Lambers *et al.*, 2006).

O pH dos lotes foi determinado com recurso a um medidor digital de pH Consort C3010 (Dias de Sousa Portugal), calibrado previamente com soluções tampão de pH 4,00, 7,00 e 10,01. Para efeito de medição de pH, um grama de gel foi diluído em 10 mL de água destilada e agitado em placa magnética até completa dissolução. Os resultados apresentados são a média de três medições, sujeitos ao teste de Grubbs para eliminação de *outliers*.

As medições foram realizadas no dia 0, e nos dias 7, 14, 20 e 28.

2.5.3 Determinação da viscosidade

A viscosidade de uma formulação depende das características físico-químicas e das condições de temperatura a que está sujeita, e pode afetar a sua aplicação no local de tratamento e influenciar a libertação do princípio ativo – (Ueda *et al.*, 2009; Deuschle *et al.*, 2015).

Foi utilizado um viscosímetro rotacional Viscostar plus para medição da viscosidade dos géis. Foi utilizada a sonda R6, sujeita a uma velocidade de 30 rpm. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (20-25°C). Os resultados apresentados são expressos em centipoise (cP) e representados como a média de 3 registos, sujeitos a teste de Grubbs para eliminação de *outliers*. As medições foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 20 e 28, após a preparação.

2.5.4 Textura

A análise de textura constitui um método adequado para a caracterização mecânica de formas farmacêuticas semi sólidas e para avaliação da influência dos componentes nas propriedades do gel. A partir de gráficos de compressão são extraídos parâmetros como compressibilidade, dureza, adesividade, elasticidade e coesão (Vitorino *et al.*, 2013).

Os ensaios de textura foram realizados no texturómetro Dias de Sousa TA-XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). As amostras foram colocadas em tubos cilíndricos, evitando a introdução de bolhas de ar. Foi utilizada uma sonda analítica P10. Esta foi inserida duas vezes na amostra, a uma velocidade definida (5mm/s), sendo as compressões consecutivas intervaladas por um período de recuperação de 8 s.

A partir do gráfico tempo-força obtido (figura 9), procede-se à determinação dos seguintes parâmetros mecânicos: dureza (H) – dada pelo pico máximo da primeira compressão; compressibilidade – calculada a partir da área sob a curva I (AUC_I);

adesividade – calculada a partir da AUC_2 , correspondente à parte negativa do primeiro ciclo de compressão; coesão – equivale à razão AUC_3/AUC_1 ; elasticidade – corresponde à razão entre os tempos necessários para adquirir a máxima deformação das estruturas, entre a segunda compressão e primeira compressão, separadas por um período de recuperação, ou seja, é a razão entre as diferenças temporais 3-4/1-2 – (Şenygit *et al.*, 2011; Vitorino *et al.*, 2013).

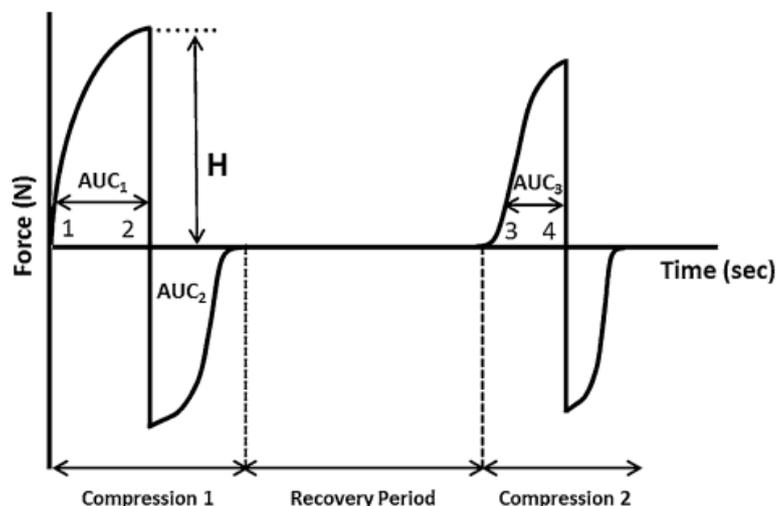


Fig. 9 – Gráfico tempo-força obtido com o texturómetro (Vitorino *et al.*, 2013)

As medições com o texturómetro foram realizadas nos dias 0 e 28, em cada um dos quatro lotes, à temperatura ambiente (20-25°C).

2.6 Doseamento dos taninos totais no extrato e na formulação

O método de Folin-Ciocalteu é uma técnica analítica colorimétrica, com boa reprodutibilidade, para a determinação dos polifenóis totais em materiais biológicos. O reagente de Folin-Ciocalteu contém uma mistura de ácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos, onde o molibdénio e tungsténio se encontram no estado de oxidação +6. O molibdénio VI na presença de compostos fenólicos é reduzido a molibdénio V, originando uma cor azul que pode ser medida espectrofotometricamente a 760 nm. A reação é lenta a pH ácido e, como tal, utiliza-se carbonato de sódio para fornecer um ambiente alcalino. Podem ser utilizados vários padrões de referência, como o pirogalhol, ácido gálico, entre outros (Prior, Wu e Schaich, 2005; Agbor, Vinson e Donnelly, 2014; Chen, Cheng e Liang, 2015; Vázquez *et al.*, 2015).

O doseamento foi realizado no extrato e na formulação final de gel conservada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O método utilizado foi o descrito na Farmacopeia Portuguesa VII para a determinação de taninos em fármacos vegetais.

Para doseamento dos polifenóis totais, foram dissolvidos 14 mg do extrato (m_1) em 25 mL de água. Desta solução foram retirados 2 mL que foram misturados com 10 mL de água, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e perfazendo 25 mL de volume com uma solução de carbonato de sódio a 290 g/mL. Após 30 minutos ao abrigo da luz, foi medida a absorvância da solução a 760 nm (A_1). Foi realizada a leitura de absorvância de um branco nas mesmas condições.

Para doseamento dos polifenóis não adsorvíveis pelo pó de pele, foram dissolvidos 14 mg do extrato em 25 mL de água e desta preparação foram retirados 4 mL. Juntamente com 0,1 g de pó de pele, a mistura foi sujeita a agitação por 60 min e posteriormente filtrada. Foram retirados 2 mL do filtrado para um balão de 25 mL ao qual se adicionaram 10 mL de água, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e fez-se o volume de 25 mL com a solução de carbonato de sódio a 290 g/mL. Após 30 minutos ao abrigo da luz, foi medida a absorvância desta solução a 760 nm (A_2). Foi realizada a leitura de absorvância de um branco nas mesmas condições.

Na preparação do padrão, foram dissolvidos 50 mg de pirogalhol (m_2) em 100 mL de água. A partir desta solução foi preparada uma diluição de 20 vezes, em água. Da solução diluída foram retirados 2 mL para um balão de 25 mL, ao qual se adicionaram 10 mL de água, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, e o volume restante foi preenchido com a solução de carbonato de sódio a 290 g/mL. Após 30 minutos ao abrigo da luz, foi medida a absorvância desta solução a 760 nm (A_3) e, tal como nos procedimentos anteriores, foi realizada a leitura de absorvância de um branco nas mesmas condições.

Para o doseamento no gel foi repetido o procedimento para determinar A_1 , A_2 e A_3 , sendo utilizada uma quantidade de gel equivalente à quantidade de extrato do correspondente ensaio.

O conteúdo de taninos, em percentagem expressos em pirogalhol, foi calculado através da diferença de absorvância dos polifenóis totais (A_1) e polifenóis não adsorvíveis pelo pó de pele (A_2), utilizando a expressão seguinte, onde F é o fator de diluição em cada procedimento.

$$\frac{F (A_1 - A_2)m_2}{A_3 \times m_1}$$

A absorvância a 760 nm foi medida em triplicado num espectrofotómetro de duplo feixe Cintra 101 (GBC, Australia).

2.7 Cultura das células HaCaT e avaliação da viabilidade celular

As células HaCaT constituem uma linha celular de queratinócitos humanos. Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas numa incubadora com atmosfera humidificada e com 5% de CO₂ a 37°C. Sempre que a densidade celular atingia uma confluência de aproximadamente 80%, as células eram sub-cultivadas (um frasco de 75 cm² era dividido para 4 novos frascos de 75 cm²) ou semeadas em caixas para a realização de ensaios.

2.7.1 Avaliação da viabilidade celular

Os potenciais efeitos citotóxicos do extrato e do gel foram avaliados nas células HaCaT através da determinação da viabilidade celular pelo ensaio com o brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este método colorimétrico baseia-se na redução do MTT (cor amarela) por desidrogenases de células metabolicamente ativas (células viáveis) a cristais de formazana, um produto arroxeadado e insolúvel em água que se acumula no interior das células viáveis. Assim, a formação de cristais de formazana é tanto maior quanto maior for o número de células viáveis (Sittampalam *et al.*, 2016).

Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em caixas de 24 poços com 0,5 mL de DMEM. Foram ensaiadas as seguintes concentrações de extrato nas células: 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,1 mg/mL. As concentrações testadas da formulação em gel foram: 5 mg/mL; 2 mg/mL; 1 mg/mL.

Após 24h foi removido o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS. De seguida procedeu-se à adição do MTT (na concentração final de 0,5 mg/mL preparado em PBS) a cada um dos poços contendo células. Após um período de incubação de 60 minutos a 37°C numa incubadora com atmosfera humidificada e 5% de CO₂, o MTT foi removido e os cristais de formazana foram dissolvidos através da adição de 0,5 mL de DMSO por poço. Os cristais de formazana foram quantificados pela determinação da absorvância a 540 nm num leitor de microplacas Synergy HT.

Os resultados são expressos em termos de percentagem de células viáveis relativamente ao controlo, isto é, células que não foram submetidas a qualquer tratamento.

2.8 Estudos de segurança em humanos

Foram realizados dois estudos de segurança com voluntários humanos: teste de contacto simples e teste de contacto repetitivo. Os estudos foram realizados em Lisboa, na empresa PhD Trials, que cumpre com os requisitos da norma NP EN ISO 9001:2008, e é acreditada pelo IPAC.

2.8.1 Teste de contacto simples

Os testes de contacto são ferramentas usadas na determinação e identificação de potenciais agentes alergénicos externos que em contacto com a pele desencadeiam uma reação inflamatória manifestada em condições de pele como dermatite de contacto ou eczema de contacto (Marzulli e Maibach, 1976; Lazzarini, Duarte e Ferreira, 2013).

O método envolve a aplicação do produto teste na pele do paciente, protegido por um adesivo oclusivo durante 48 horas. A pele é examinada e avaliada para evidências de eritema, edema ou alterações severas nos 15 minutos após a remoção do adesivo, e também após 24 e 48 horas. É aconselhado estender as observações até às 72 e 96 horas, pois deste modo é possível verificar a evolução das reações que surgiram, e determinar se ocorreu melhoria ou regressão (Marzulli e Maibach, 1976; Wahlberg e Lindberg, 2011; Lazzarini, Duarte e Ferreira, 2013).

O teste de contacto foi realizado em 10 voluntários, de idades compreendidas entre os 18 e 65 anos, com fototipos de pele entre I e IV. O gel foi aplicado uma vez, numa quantidade de 20 µL, em contacto com a pele durante 48 horas, protegido por um adesivo que favorece a passagem dos componentes através da pele. A área experimental de aplicação foi examinada aos 15 min, 24 h e 48 h após a remoção do adesivo.

Os critérios para exclusão dos voluntários envolviam a existência de marcas cutâneas ou eczemas na área experimental que pudessem interferir com a avaliação das reações da pele; reatividade da pele ao adesivo ou a produtos cosméticos da mesma categoria do produto testado; hiper-reatividade da pele e exposição solar intensa antes ou durante o período de teste.

O estudo envolveu algumas condicionantes impostas aos participantes tais como: a ausência de aplicação de outros produtos na área experimental além do produto teste; a inexistência de tratamentos antialérgicos ou anti-inflamatórios coincidentes com toda a duração do estudo; a exposição solar estava desaconselhada, especialmente no período após a remoção do adesivo; a ausência de vacinação durante todo o período de teste. Em caso de banho, a área de teste deveria ser protegida a fim de evitar a remoção do adesivo e os voluntários não deveriam usar vestuário apertado na área experimental, pois a fricção causada poderia descolar o adesivo.

2.8.2 Teste de contacto repetitivo em humanos

O método HRIPT (teste de contacto repetitivo em humanos) foi inicialmente proposto em 1944. O método determina se os humanos desenvolvem uma resposta adversa a determinada formulação e, em caso afirmativo, avalia as respostas irritativas ou alérgicas da pele (McNamee *et al.*, 2008).

A metodologia envolve uma fase de indução de 3 semanas, seguida de um período de repouso de duas semanas, e numa fase final de uma semana. Na fase de indução o produto a ser testado é aplicado três vezes por semana no mesmo local. Após 24 horas o produto é removido, e o local de aplicação é avaliado consoante a reação da pele como eritema, edema e vesículas. Este procedimento é repetido durante as três semanas de duração. O período de repouso dura entre 14 a 17 dias, durante os quais não há aplicação de produto, o que permite que surjam possíveis respostas imunológicas. Adicionalmente permite que as reações observadas durante a fase de indução se desenvolvam, o que proporciona uma avaliação mais exata dos padrões de reação observados. A fase final de desafio consiste na aplicação do produto no local original e num local oposto do corpo onde não houve aplicação prévia. Após 24 horas o produto é removido e a pele é avaliada após 48 e 96 horas. Esta fase permite a deteção de possíveis respostas cutâneas atrasadas. Todos os procedimentos estão sujeitos a variações tais como o número de indivíduos, o local de aplicação, o tempo de aplicação ou a duração da fase de repouso (McNamee *et al.*, 2008).

O teste de compatibilidade com a pele foi realizado em 50 voluntários, de idades compreendidas entre os 18 e 65 anos, com fototipos de pele entre I e IV. Os critérios de exclusão dos voluntários foram os mesmos do teste de contacto simples, referidos na secção 2.8.1.

O estudo teve a duração de seis semanas: uma fase de indução de 3 semanas, 2 semanas de repouso e a semana final de desafio.

A área experimental escolhida para aplicação foram as costas. Na fase de indução foram aplicados 20 μ L de produto, protegido por um adesivo oclusivo. Foi mantido em contacto com a pele por 48 ou 72 horas durante o fim-de-semana, sendo depois removido e avaliada a reação da pele. A aplicação foi repetida 9 vezes na fase inicial de 3 semanas. O período de repouso durou duas semanas, durante as quais não se procedeu à aplicação de produto. Na fase de desafio o produto foi reaplicado no mesmo local da fase de indução e num local complementar onde não houve aplicação prévia. A remoção foi feita após 48 horas e a reação da pele foi avaliada nas 48, 72 e 96 horas após a aplicação.

Foram respeitadas as regras das Boas Práticas Clínicas. Todos os exames clínicos foram realizados por uma dermatologista, à luz do dia, entre 18 e 26°C de temperatura ambiente. O estudo envolveu as mesmas condicionantes impostas aos participantes para o teste de contacto simples.

2.9 Análise estatística

Todos os resultados das medições de pH, viscosidade e absorvância foram sujeitos ao teste de Grubbs a 5% de confiança para eliminação de outliers, utilizando o Microsoft Excel.

A análise estatística dos resultados relativos à viabilidade celular foi efetuada usando o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, utilizando o software SPC for Excel.

III - Resultados e discussão

3.1 Otimização da extração

A TLC realizada revelou uma maior quantidade extraída de elagitaninos nas diluições de 40%, 50% e 60%. O cromatograma obtido por HPLC revela que na diluição de etanol de 50% a extração é superior (figura 10). Como tal foi a diluição de etanol selecionada para o procedimento de extração total.

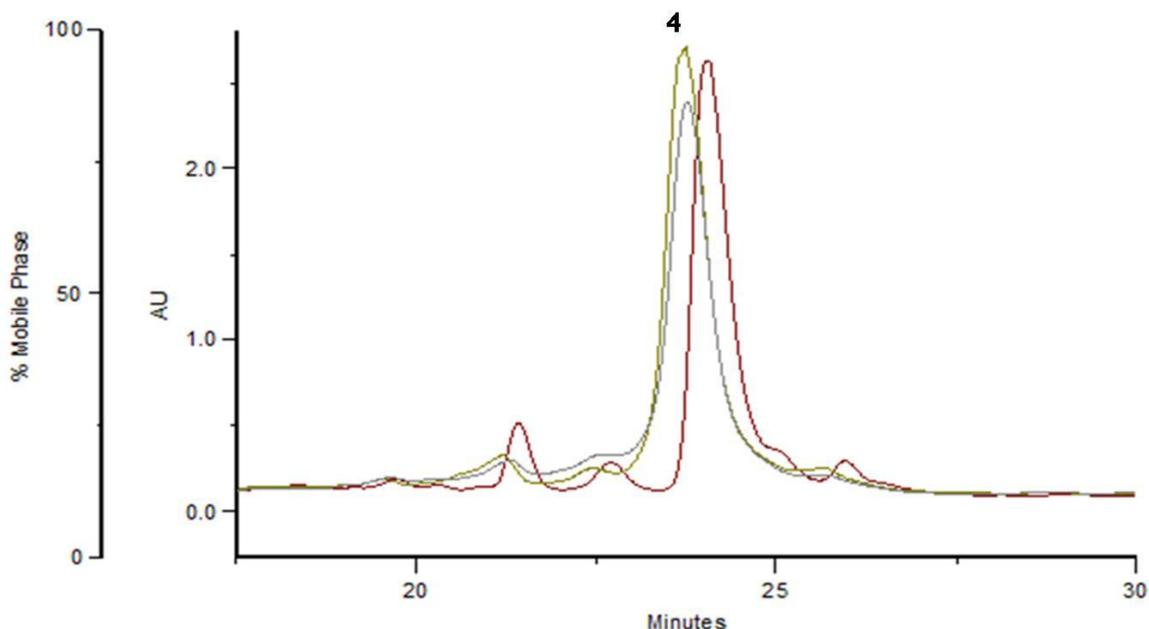


Fig. 10 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA dos extratos a 60% (azul), 50% (verde) e 40% (vermelho) de *Fragaria vesca* (280 nm)

3.2 Rendimento de extração

O processo de extração com etanol a 50% originou um rendimento de 28,44%. A bibliografia da qual foi adaptado o procedimento refere um rendimento extrativo de 30% (Liberal *et al.*, 2014). Já Yildirim e Turker (2014) referem um rendimento de 20% numa extração direta das folhas de *Fragaria vesca* com metanol.

No caso de extrações com etanol, a partir dos frutos, encontram-se relatados rendimentos de extração de 12,24% (Kanodia, Borgohain e Das, 2011).

3.3 Caracterização do extrato por HPLC

A figura 11 representa o cromatograma obtido por HPLC a 280 nm, relativo à extração com etanol a 50%. Pela análise dos espectros UV é possível detetar a presença de proantocianidinas (1-2), um ácido fenólico (3), elagitanino (4), flavonoides (5, 7, 8, 10) e derivados de ácido elágico (6, 9 e 11).

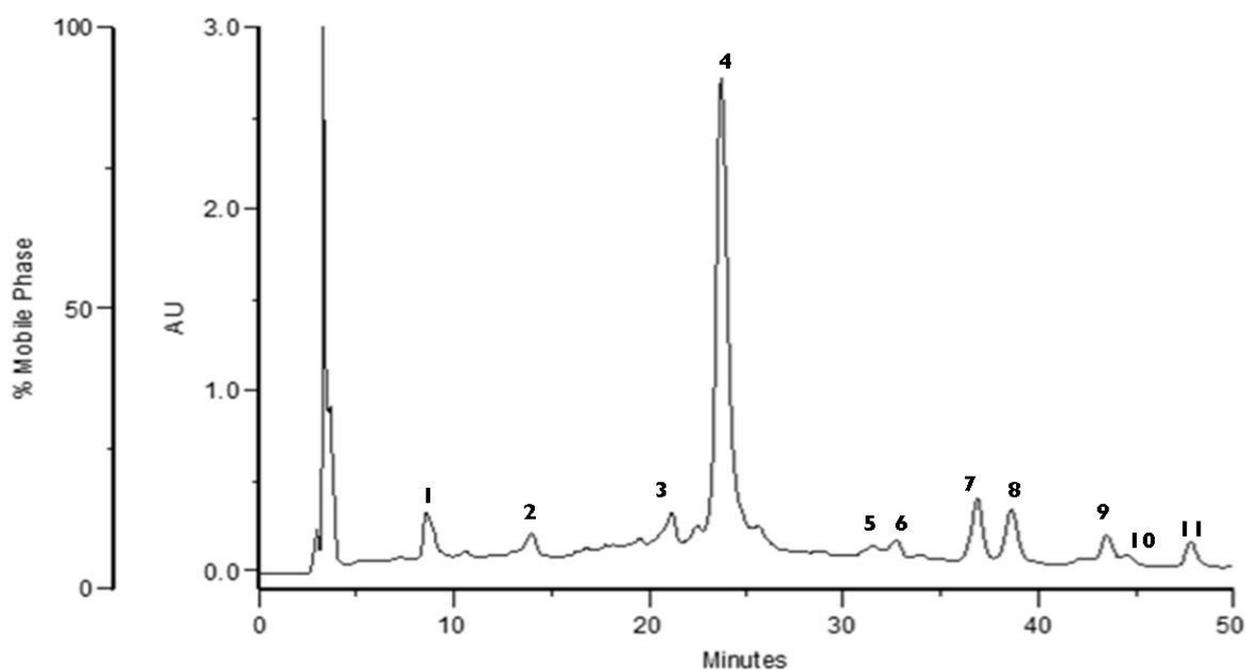


Fig. 11 – Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA do extrato a 50% de *Fragaria vesca* (280 nm)

Os compostos 1, 2 são essencialmente proantocianidinas e 3-flavanóis do tipo catequina. Os espectros UV indicam que o ácido fenólico presente (composto 3) é derivado do ácido cafeico.

A atribuição dos compostos de acordo com Liberal *et al* (2014) pela ordem de eluição indica que o composto maioritário no extrato (4) é um isómero do elagitanino agrimonina ou sanguina H-6, estrutura determinada por HPLC-ESI-MSn. Efetivamente, estudos anteriores revelam que a agrimonina é o principal elagitanino presente nas espécies *Fragaria vesca* e *Fragaria ananassa* (Vrhovsek, Guella e Gasperotti, 2012).

Os flavonoides presentes no extrato são essencialmente derivados do canferol (7, 10) e quercetina (5, 8). Os espectros UV dos flavonoides apresentam duas bandas de absorção características: a banda I, devida ao anel B, surge entre 320 e 385 nm; a banda II, devida ao anel A, surge entre 240 e 285 nm. Nos flavonoides com hidroxilação no carbono

3, a banda I aparece por volta dos 352 nm: nos derivados do canferol, o máximo de absorção da banda I ocorre a 346 nm e nos derivados da quercetina surge a 352 nm – (Merken e Beecher, 2000; Buendía *et al.*, 2010; Pinheiro e Justino, 2012; Shashank e Abhay, 2013; Liberal *et al.*, 2014).

Os compostos 7 e 10 serão respectivamente um canferol glucoronil-ramnósido e um canferol glucoronídeo. Já os compostos 5 e 8 são identificados como quercetina glucoronil-ramnósido e quercetina glucoronídeo (Liberal *et al.*, 2014).

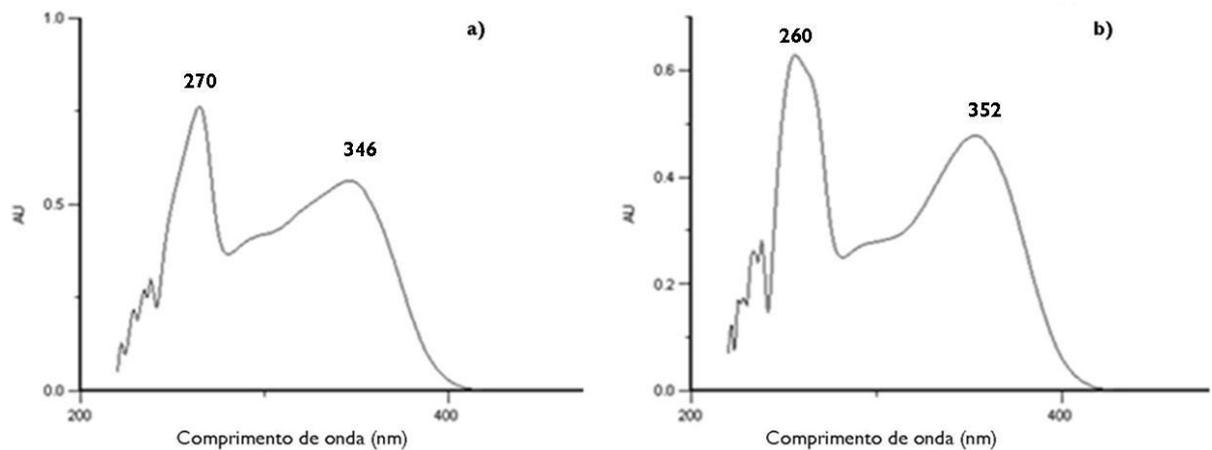


Fig. 12 – Espectros UV característicos dos flavonoides: a) pico 7, derivado de canferol; b) pico 8, derivado de quercetina

O composto 10 apresenta um espectro UV com um máximo por volta de 260 nm e um pico de absorção a aproximadamente 350 nm, consistentes com as características dos espectros de absorção atribuídos aos derivados da quercetina. Este resultado é também confirmado pela ordem de eluição dos compostos em Liberal *et al.* (2014), pelo que é provavelmente uma quercetina glucoronídeo.

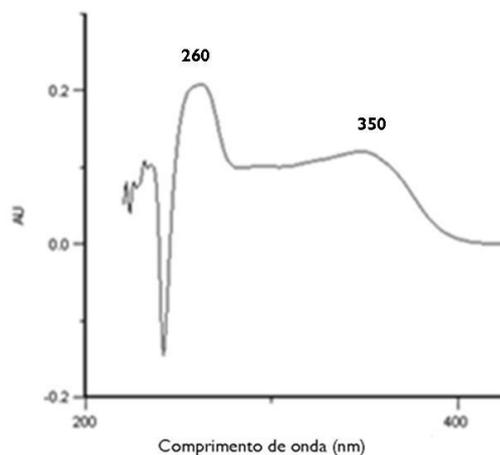


Fig. 13 – Espectro UV relativo ao composto 10

Os compostos 6, 9 e 11 foram identificados como derivados de ácido elágico, dadas as características distintas observadas nos espectros UV, que apresentam máximos de absorção por volta dos 254 nm e no intervalo 360-368 nm (Tulipani *et al.*, 2008; Buendía *et al.*, 2010).

Segundo a eluição verificada em Liberal *et al* (2014) o pico 9 corresponde ao ácido elágico e o pico 11 a um ácido metil-elágico ramnosídeo.

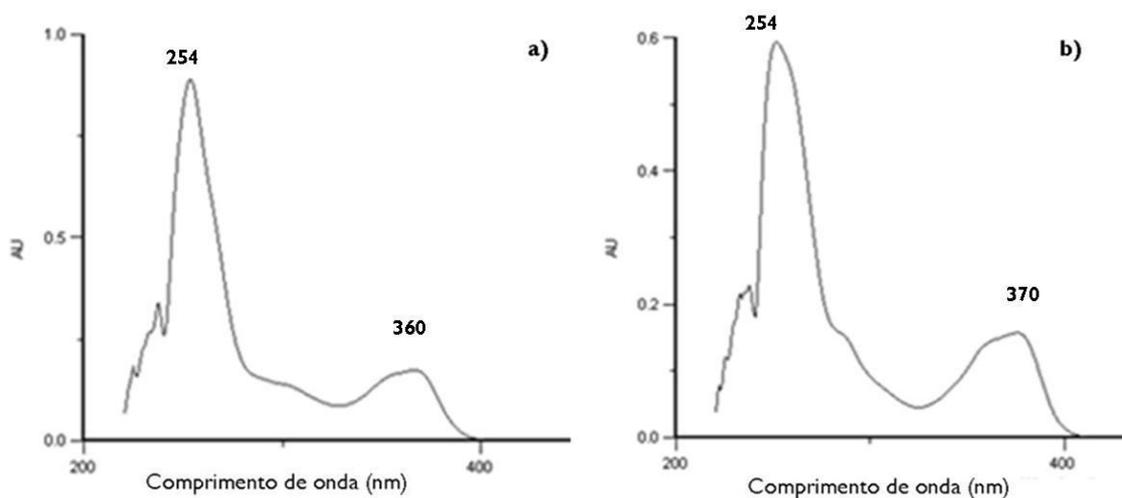


Fig. 14 – Espectros UV característicos dos derivados de ácido elágico: a) composto 9; b) composto 11

3.4 Avaliação de atividade inibidora da tirosinase

A amostra de *Fragaria vesca* revelou um IC_{50} $238,10 \pm 15,51 \mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos foram semelhantes aos da arbutina, que apresenta IC_{50} $193,84 \pm 14,15 \mu\text{g/mL}$.

Dado que a arbutina é utilizada nos cosméticos despigmentantes em concentrações de 2%, foi incorporado o extrato de *Fragaria vesca* no gel na concentração de 2% (SCCS e Degen, 2016).

3.5 Caracterização das formulações

3.5.1 Análise organolética

A análise organolética realizada sobre os quatro lotes decorreu no dia da preparação, e semanalmente até ao fim de 28 dias. Os dados relativos à análise após 14 e 28 dias estão representados nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Análise organolética após 14 dias

Formulação	Cor	Cheiro	Aspeto
1. Ciclos diurnos	Verde acastanhado	Inalterado	Homogéneo
2. Escuro	Verde-escuro	Inalterado	Homogéneo
3. Frio	Verde-claro	Inalterado	Pastoso
4. Estufa	Castanho esverdeado	Inalterado	Homogéneo Líquido

Tabela 13 – Análise organolética após 28 dias

Formulação	Cor	Cheiro	Aspeto
1. Ciclos diurnos	Verde acastanhado	Inalterado	Homogéneo
2. Escuro	Verde-escuro	Inalterado	Homogéneo
3. Frio	Verde-claro	Inalterado	Pastoso
4. Estufa	Castanho esverdeado	Inalterado	Homogéneo Líquido

As alterações verificadas ao fim de uma semana mantiveram-se até ao fim dos 28 dias. Ambos os lotes conservados à temperatura ambiente mantiveram a consistência inicial. Destes, o lote sujeito aos ciclos de luz solar desenvolveu uma cor verde acastanhada, o que indica a oxidação dos compostos. O lote conservado na ausência de luz foi o que manteve as características iniciais.

As principais alterações verificadas devem-se à influência da mudança de temperatura. O lote armazenado a 40°C tornou-se mais escuro com o passar do tempo e a sua consistência tornou-se mais fluida que as restantes. Estas alterações indicam que as elevadas temperaturas causaram a alteração e degradação dos compostos do extrato. O lote

conservado no frio perdeu a consistência de gel e adquiriu uma consistência muito pastosa e viscosa. A cor inicial alterou-se para verde-claro.

3.5.2 Determinação do pH

Os resultados relativos à variação do pH estão representados na figura 15. Pela observação do gráfico constata-se que em todas as formulações o pH inicial de 5,38 diminuiu, verificando-se um ligeiro aumento na semana final.

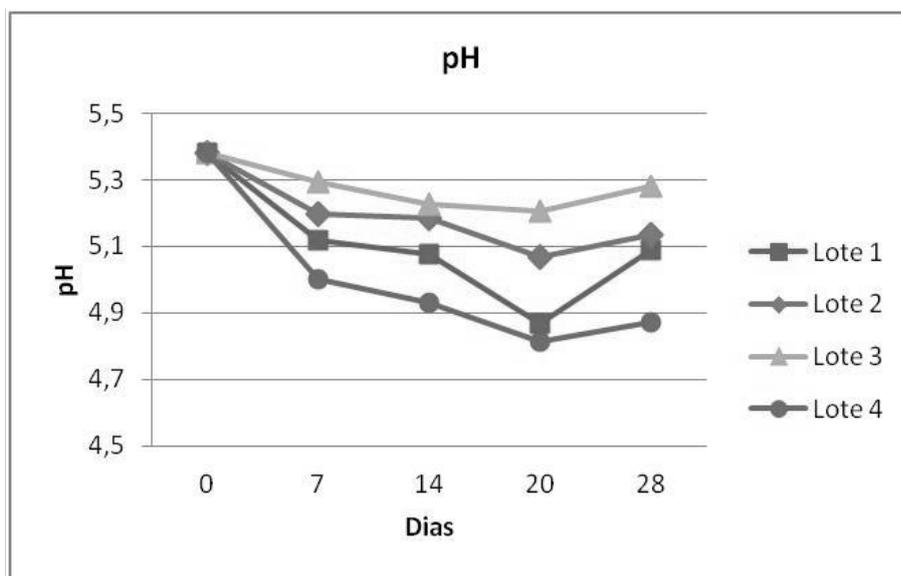


Fig. 15 – Variação do pH dos géis entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

A maior variação registada deve-se ao efeito da humidade e temperatura elevadas – lote 4. O lote sujeito ao frio manteve os valores mais consistentes e menos variáveis.

A superfície da pele tem naturalmente um pH ácido, de extrema importância na regulação das funções protetoras, na manutenção da homeostase da barreira lipídica e da integridade do estrato córneo. A acidificação do estrato córneo tem uma função antimicrobiana, uma vez que o pH ácido inibe a colonização por bactérias patogénicas. O uso de produtos cosméticos com valores de pH que rondem o pH natural da pele minimiza os distúrbios às condições de desenvolvimento da microflora residente – (Fluhr *et al.*, 2001; Lambers *et al.*, 2006; Yutaka *et al.*, 2009).

O pH do lote 2 manteve-se no intervalo de valores 5 – 5,38 revelando-se adequado para aplicação na pele sem causar irritação.

3.5.3 Determinação da viscosidade

Os resultados relativos à variação da viscosidade encontram-se representados na figura 16. As viscosidades registadas variam entre 12000 e 31000 cP. Estas variações eram expectáveis, uma vez que normalmente a viscosidade é diretamente influenciada por alterações de temperatura (Deuschle *et al.*, 2015).

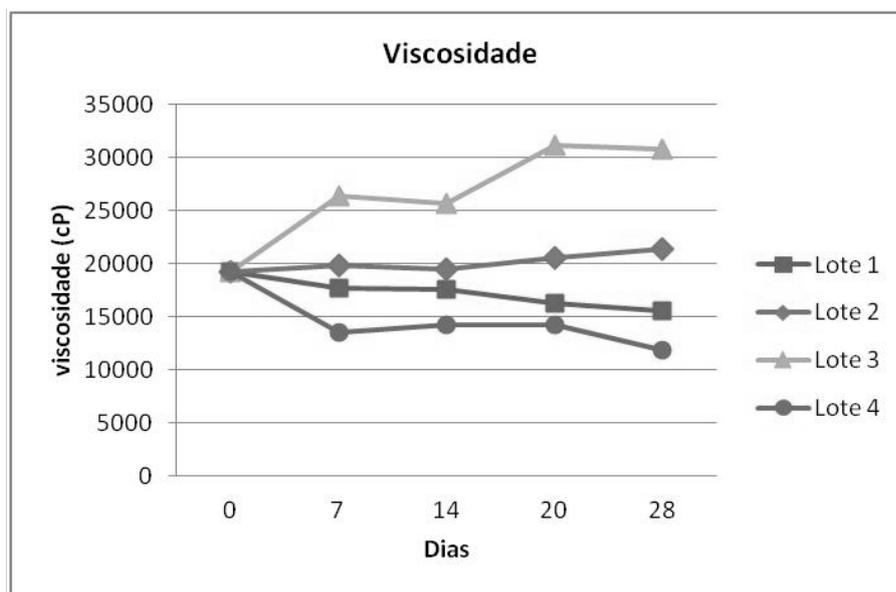


Fig. 16 – Variação da viscosidade dos géis entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

No lote 1, onde a análise organolética tornou evidente a degradação dos compostos, é também visível uma diminuição da viscosidade.

O lote 2, conservado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar, manteve valores de viscosidade a rondar os 20000 cP. Nos restantes lotes a maior variação ao longo dos 28 dias é observada no lote 3, que aumentou dos 20000 iniciais para 30000 cP.

As condições de armazenamento do lote 4 propiciaram uma diminuição da viscosidade devido à temperatura elevada, concordante com o descrito na bibliografia por Wang *et al* (2015). Comparando com o verificado na análise organolética, onde se verificou a alteração da aparência e cor da formulação, é evidente que neste lote as propriedades do extrato foram alteradas. Os efeitos das altas temperaturas envolvem a alteração da atividade dos componentes e favorecem a degradação dos compostos fenólicos, dado que são sensíveis à hidrólise (Deuschle *et al.*, 2015).

3.5.4 Textura

As propriedades texturais são um critério para a otimização da formulação tópica, uma vez que influenciam a aplicabilidade do gel no local de administração (Hurler *et al.*, 2012). Os parâmetros mecânicos obtidos para os 4 lotes estão representados nos gráficos das figuras 17 a 21.

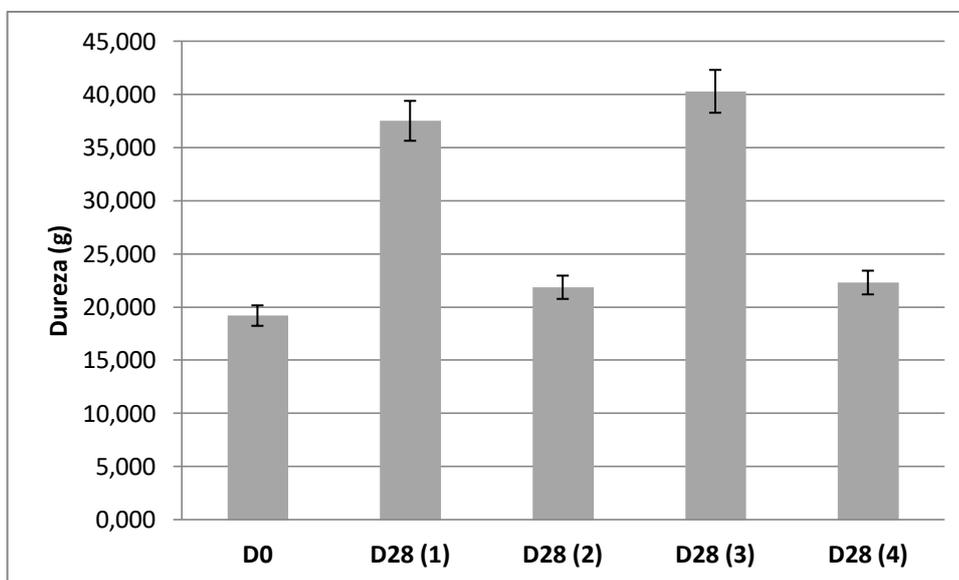


Fig. 17 – Variação da dureza dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

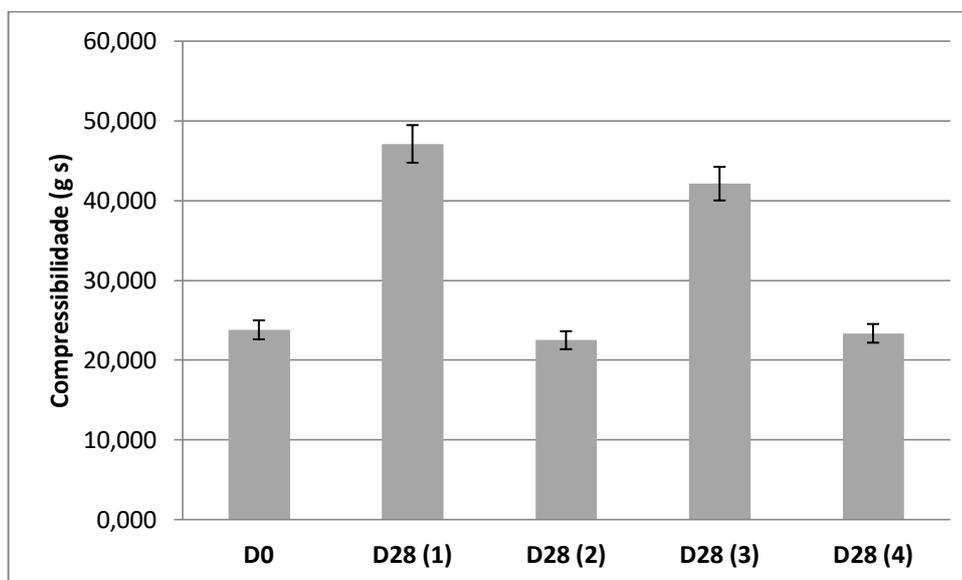


Fig. 18 – Variação da compressibilidade dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

A dureza e a compressibilidade de uma formulação estão relacionadas com a facilidade da retirada do produto da embalagem e sua aplicação; se estes valores forem baixos, assegura-se que o gel é facilmente aplicável na pele (Hurler *et al.*, 2012; Vitorino *et al.*, 2013).

Os parâmetros estão também correlacionados com a concentração do polímero. Uma vez que todos os lotes contêm HEC a 3%, o critério da viscosidade torna-se mais influente. Uma formulação mais viscosa oferece maior resistência à deformação, o que se reflete em valores mais elevados de dureza e de força por unidade de tempo (Jones, Woolfson e Brown, 1997; Şenyigit *et al.*, 2011; Hurler *et al.*, 2012).

O lote 1 apresenta um comportamento semelhante ao do lote 3, apesar de as viscosidades não serem comparáveis. Tal pode ser explicado com a oxidação dos compostos ativos e a degradação do polímero no lote 1, pela exposição à luz.

O lote 2 é o equivalente ao lote inicial e as suas variações em relação a este não são consideradas significativas.

O lote de maior viscosidade (lote 3) apresenta valores de dureza e compressibilidade previsivelmente superiores ao lote do dia 0, duplicando os valores no geral.

No lote 4, a diminuição dos valores está relacionada com um aumento de temperatura. Seria expectável, dada a sua menor viscosidade relativamente aos restantes, que apresentasse menores valores que o controlo. No entanto, entre a retirada da estufa e a preparação da amostra para as medições, a amostra, quando à temperatura ambiente recupera parte da consistência o que explica os resultados obtidos.

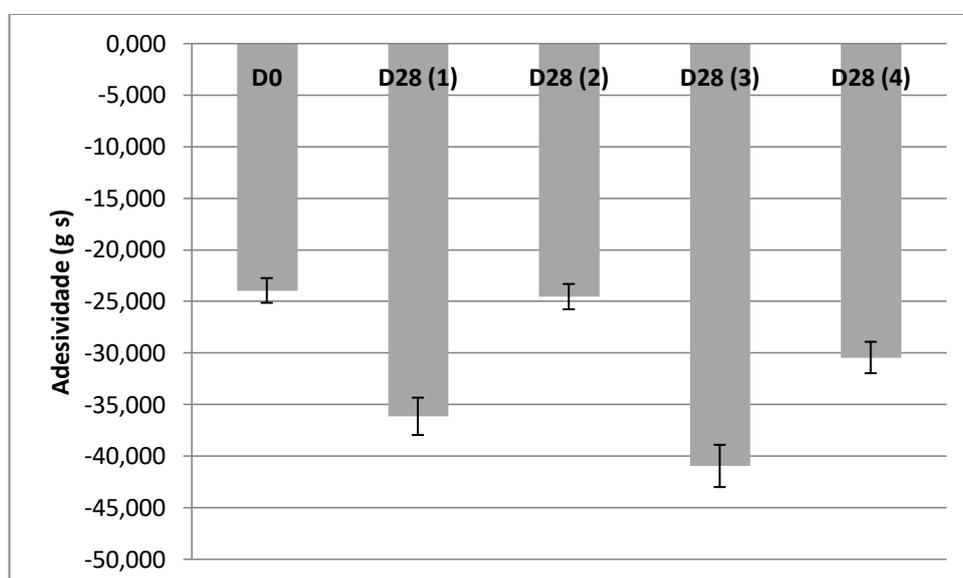


Fig. 19 – Variação da adesividade dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

A adesividade é o trabalho necessário para ultrapassar as forças atrativas entre a superfície da amostra e da sonda, e encontra-se relacionada com a retenção do gel na pele (Şenygit *et al.*, 2011; Hurler *et al.*, 2012; Vitorino *et al.*, 2013).

A figura 19 representa a variação de adesividade dos lotes, onde a tendência é concordante ao verificado para a compressibilidade e dureza, já que as maiores áreas negativas determinadas correspondem aos lotes 1 e 3. Ao lote 3, de maior viscosidade, está também associada uma maior área negativa, uma vez que a adesividade é um parâmetro também dependente da concentração de polímero (Hurler *et al.*, 2012).

Os resultados relativos à determinação da coesão dos lotes estão expressos na figura 20. Este parâmetro é definido como o trabalho necessário para deformar o gel durante o movimento descendente da sonda. Fornece informação acerca da reformação estrutural do gel após aplicação; em regra um valor elevado está associado com uma recuperação estrutural total. Os dados obtidos relativos à coesão do gel de hidroxietilcelulose são relativamente pouco variáveis e concordantes com os descritos na literatura (Jones, Woolfson e Brown, 1997; Şenygit *et al.*, 2011; Hurler *et al.*, 2012; Vitorino *et al.*, 2013).

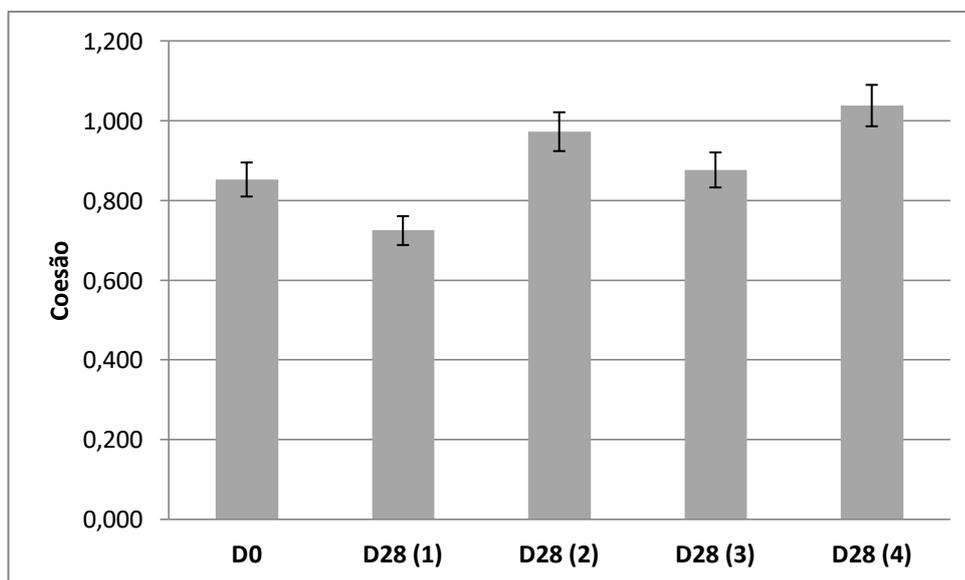


Fig. 20 – Variação da coesão dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

A elasticidade é definida como o ritmo a que a amostra deformada retoma a sua condição original após remoção da força deformante. Valores baixos revelam que a formulação se encontra mais suscetível a deformações estruturais (Jones *et al.*, 2000; Şenygit *et al.*, 2011; Vitorino *et al.*, 2013). A variação deste parâmetro encontra-se representada na figura 21.

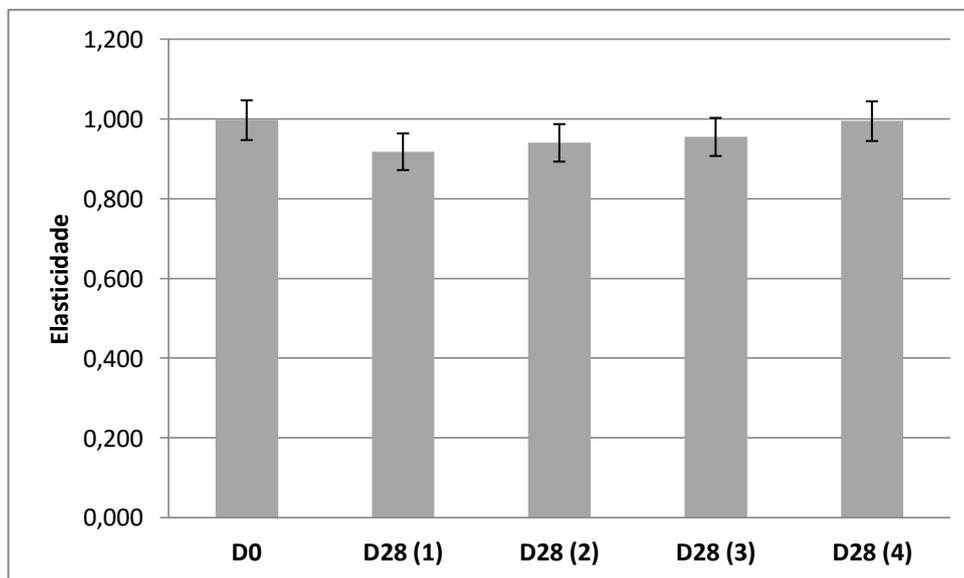


Fig. 21 – Variação da elasticidade dos géis, entre os dias 0 e 28 (1: T. ambiente, luz; 2: T. ambiente, escuro; 3: T=5°-9°C; 4: T=40°C, 75% humidade)

A elasticidade revelou-se o parâmetro mais consistente e menos variável entre os quatro lotes, e entre as diferentes temperaturas. Os valores aproximam-se da unidade, o que leva a concluir que todos os lotes facilmente recuperam a forma original após a deformação.

3.6 Doseamento dos taninos totais no extrato e na formulação

O doseamento dos taninos totais foi realizado segundo o procedimento descrito na secção 2.6. Os resultados revelaram que o extrato contém um teor de 11,79 % em taninos, o que corresponde a 3,35 % de taninos em planta; já o gel contém 0,5%.

O valor obtido para o extrato é semelhante ao dos estudos disponíveis na literatura. Encontra-se relatada uma percentagem de aproximadamente 2,3% de taninos em folhas de *Fragaria vesca*, segundo o mesmo método (Zugic et al., 2014).

O conteúdo de taninos nos frutos de *Fragaria vesca* atinge valores de 3% e, no caso de outras variedades de morangos, o teor atinge máximo de 6% (Najda et al., 2014; Dyduch-Siemińska et al., 2015).

Em todos estes estudos o conteúdo em polifenóis demonstra uma correlação positiva com o potencial antioxidante dos extratos (Dyduch-Siemińska et al., 2015; Ivanov et al., 2015).

3.7 Avaliação da viabilidade celular

De modo a avaliar a potencial toxicidade do extrato e do gel, o efeito de ambos na viabilidade das células HaCaT foi determinado, por intermédio do teste do MTT, tal como descrito na secção 2.7.1. O tratamento estatístico dos resultados não revelou as médias significativamente diferentes.

Na figura 22 são apresentados os resultados relativos às concentrações testadas de extrato. Da análise destes resultados verifica-se que o extrato numa concentração de 2 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade das células HaCaT, apresentando assim citotoxicidade nesta concentração. Alguns flavonoides – canferol, quercetina, isorhamnetina – estão descritos como inibidores do crescimento celular. Dada a abundância de derivados de canferol e quercetina presentes no extrato, estes compostos em elevada concentração poderão ser os responsáveis pela redução da viabilidade celular observada (Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006).

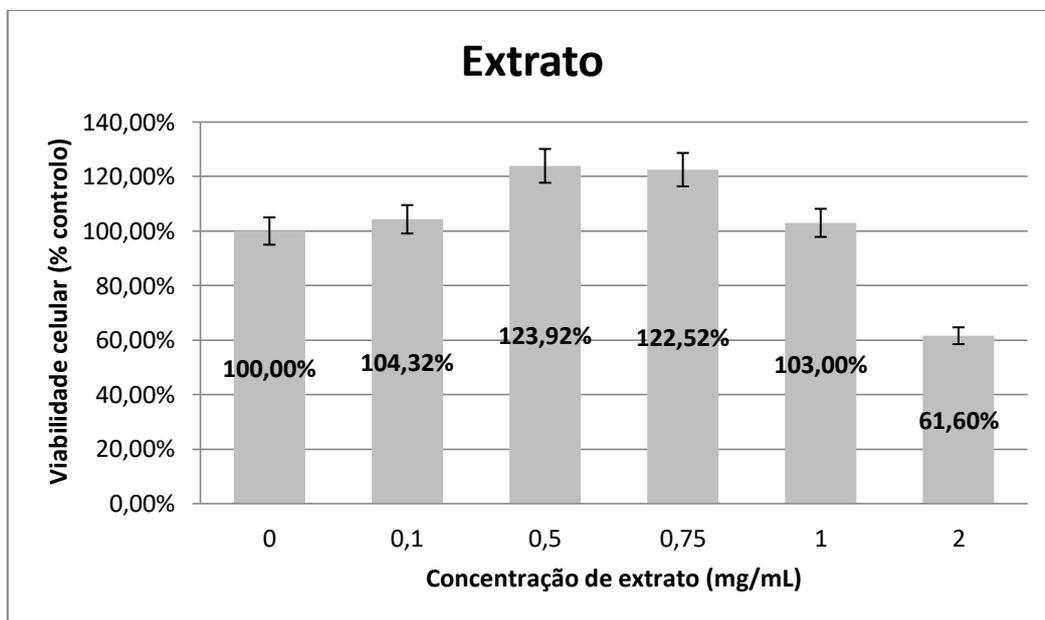


Fig. 22 – Efeito do extrato de *Fragaria vesca* na viabilidade das células HaCaT. As células HaCaT semeadas em caixas de 24 poços foram incubadas com diferentes concentrações de extrato durante 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT e expressa como percentagem (%) relativamente à situação controlo (100%). As barras representam o valor médio de cinco experiências independentes realizadas em quadruplicado.

Em oposição, o extrato nas concentrações de 0,75 mg/mL e 0,5 mg/mL parece aumentar a viabilidade celular relativamente ao controlo. Embora este aumento não seja estatisticamente significativo, mais estudos serão necessários no sentido de explorar um eventual efeito destas concentrações de extrato na proliferação dos queratinócitos.

Efetivamente, Agyare *et al.* (2009) descrevem um aumento na viabilidade celular de queratinócitos, acompanhado de proliferação celular, efeitos induzidos pelo conteúdo elevado de extratos aquosos em taninos. Os possíveis compostos do extrato de *Fragaria vesca* responsáveis pelo efeito de aumento da viabilidade celular nos queratinócitos serão os elagitaninos geranina e furosina, isómeros de eriodictiol e ainda o flavonoide 3,4-dihydroxiflavona – (Agyare *et al.* 2011; Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Urrutia *et al.*, 2016).

Os resultados relativos ao efeito de diversas concentrações testadas de gel na viabilidade das células HaCaT estão representados na figura 23. O gel demonstra claramente ausência de toxicidade em todas as concentrações testadas: 5 mg/mL, 2 mg/mL e 1 mg/mL.

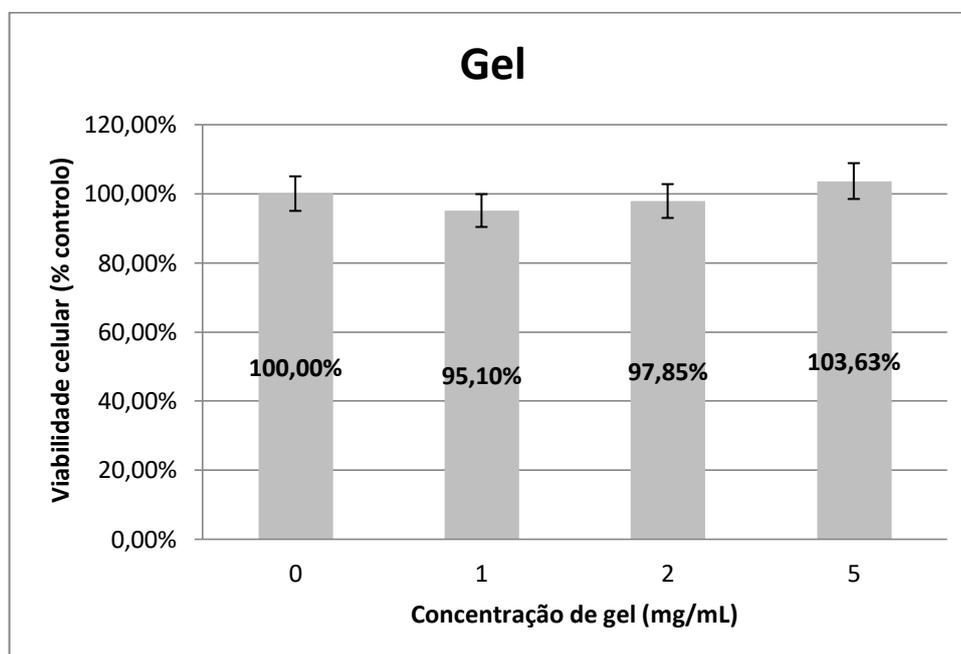


Fig. 23 – Efeito do gel com incorporação de extrato de *Fragaria vesca* nas células HaCaT. As células HaCaT semeadas em caixas de 24 poços foram incubadas com diferentes concentrações de gel durante 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT e expressa como percentagem (%) relativamente à situação controlo (100%). As barras representam o valor médio de seis experiências independentes realizadas em quadruplicado.

Os efeitos citotóxicos do etanol em células envolvem diversos mecanismos. Retarda o crescimento, diminui a proliferação celular e acelera a apoptose, através de várias vias de sinalização (Do *et al.* 2013).

Considerando que a formulação em gel contém etanol com função de conservante e que o etanol poderá ter efeitos citotóxicos, o efeito do etanol na viabilidade das células HaCaT também foi avaliado, não tendo revelado qualquer toxicidade nas concentrações utilizadas. Assim, dado que a formulação não revelou efeitos nefastos nos queratinócitos, considera-se segura para aplicação tópica.

3.8 Estudo em voluntários humanos

O teste de contacto simples realizado em 10 voluntários, demonstrou a existência de uma boa compatibilidade do produto com a pele. Neste estudo a percentagem de reações observadas foi 0%.

Adicionalmente, as aplicações repetidas da formulação em 50 voluntários não originaram reações irritantes, nem na fase de indução nem na fase de desafio. Do mesmo modo não houve indução de quaisquer reações alérgicas durante o estudo.

Estes resultados confirmam o que foi verificado na avaliação da viabilidade celular, relativamente ao gel. Deste modo, foi comprovado que a formulação em gel contendo extrato de *Fragaria vesca* é hipoalergénica e segura para aplicação tópica.

IV - Conclusões e perspectivas futuras

IV – Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foi desenvolvida uma formulação em gel, para aplicação por via tópica, que se revelou hipoalergénica, segura e estável. Quando conservada nas condições ambientais, o pH mantém-se adequado para uma aplicação na pele e conserva as propriedades relativas a viscosidade, cor e aspeto.

O gel não se revelou tóxico para a cultura celular HaCaT, mas o extrato revelou toxicidade em concentrações elevadas, devida à presença de derivados de quercetina e canferol. Em menores concentrações, o extrato revela um aumento da viabilidade celular.

Para projetos futuros existem diversos pontos de trabalho possíveis:

- Avaliação da eficácia da formulação, ou seja, confirmar se ocorre despigmentação em testes com voluntários;
- Preparação das formulações em gel com os conservantes propilenoglicol a 15% e sorbato de potássio a 0,6%, e para as mesmas realizar de igual modo todo o estudo de estabilidade e segurança, para avaliar comparativamente os resultados;
- A realização do mesmo trabalho para uma colheita de folhas de *Fragaria vesca* de outra época, para comparação da composição do extrato e dos efeitos biológicos; existe também a possibilidade de incorporar extratos de outras plantas, com a mesma atividade biológica associada;
- Determinar quais os compostos do extrato responsáveis pela redução da viabilidade celular na cultura de células HaCaT, e quais os mecanismos que lhe estão associados.

V - Referências bibliográficas

ABDEL-HAMID, Sameh M. *et al.* – Formulation of an antispasmodic drug as a topical local anesthetic. “International Journal of Pharmaceutics” 326 (2006) 107–118.

AGBOR, Gabriel A.; VINSON, Joe A.; DONNELLY, Patrick E. – Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. “International Journal of Food Science Nutrition and Dietetics.” 3:38 (2014) 147–156.

AGYARE, Christian *et al.* – An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. “Journal of Ethnopharmacology.” 125:3 (2009) 393–403.

AGYARE, Christian *et al.* – Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. “Phytomedicine.” 18:7 (2011) 617–624.

ALI, Saba M.; YOSIPOVITCH, Gil – Skin pH: From basic science to basic skin care. “Acta Dermato-Venereologica.” 93:3 (2013) 261–267.

ANGELOPOULOU, Elli – Understanding the color of human skin. “Journal of Chemical Information and Modeling” 53:9 (2013) 1689–1699.

BENSON, Heather A. E.; WATKINSON, Adam H. – Transdermal and Topical Drug Delivery, Principles and Practice. New Jersey: John Wiley & Sons. Inc, 2012. ISBN 978-0-470-45029-1.

BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent – The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. “Photochemistry and Photobiology.” 84:3 (2008) 539–549.

BUENDÍA, Begoña *et al.* - HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. “Journal of Agricultural and Food Chemistry.” 58:7 (2010) 3916–3926.

BUŘIČOVÁ, Lucie *et al.* – Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. “Czech Journal of Food Sciences.” 29:2 (2011) 181–189.

BURROWS, Ian – Food from the wild. UK: New Holland Publishers, 2005. ISBN 1 84330 891 6.

CHEN, Liang Yu; CHENG, Chien Wei; LIANG, Ji Yuan – Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. “Food Chemistry.” 170 (2015) 10–15.

CICHOREK, Mirosława *et al.* – Skin melanocytes: Biology and development. “Postepy Dermatologii i Alergologii” 30:1 (2013) 30–41.

COMISSÃO EUROPEIA – “Cosmetics.” [Acedido a 26 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics_pt

CORRADINI, Eleonora *et al.* – Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. “Natural Product Research.” 25:5 (2011) 469–495.

COSTA, Adilson *et al.* – Evaluation of the whitening properties of combined kojic acid, arbutin, sepiwhite® and achromaxyl® vs. 2% and 4% hydro-quinone in the treatment of melasma. “Surgical and Cosmetic Dermatology.” 3:4 (2011) 22–30.

CUNHA *et al.* – Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2004. ISBN 972-31-1069-5.

CUNHA, Marisa Gonzaga Da; CUNHA, Ana Lucia Gonzaga Da; MACHADO, Carlos A. – Hypodermis and subcutaneous adipose tissue two different structures. “Surgical & Cosmetic Dermatology.” 6:4 (2014) 355–359.

DEUSCHLE, Viviane Cecília Kessler Nunes *et al.* – Physical chemistry evaluation of stability, spreadability, *in vitro* antioxidant, and photo-protective capacities of topical formulations containing *Calendula officinalis* L. leaf extract. “Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences” 51:1 (2015) 63-75.

DIAS, Daniel A.; URBAN, Sylvia; ROESSNER, Ute – A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. “Metabolites”2:2 (2012) 303–336.

DIAS, Maria Inês *et al.* – Phenolic profile and antioxidant properties of commercial and wild *Fragaria vesca* L. roots: A comparison between hydromethanolic and aqueous extracts. “Industrial Crops and Products” 63 (2015) 125–132.

DRAELOS, Zoe *et al.* – Dyspigmentation, skin physiology, and a novel approach to skin lightening. “Journal of Cosmetic Dermatology.” 12:4 (2013) 247–253.

DYDUCH-SIEMIŃSKA, Magdalena *et al.* – The Content of Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of Wild Strawberry Fruit (*Fragaria vesca* L.).“Journal of Analytical Methods in Chemistry.”2015 (2015).

EVRAŃOS AKSÖZ, Begüm; ERTAN, Rahmiye - Chemical and Structural Properties of Chalcones I. “Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences.” 36 (2011) 223–242.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. – The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. “Environmental Health Perspectives” 109:1 (2001) 69–75.

Farmacopeia Portuguesa VII – INFARMED. Lisboa, 2002.

FERREIRA, Daneel; SLADE, Desmond - Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. “Natural Product Reports.” 19:5 (2002) 517–541.

FIRENZUOLI, Fabio; GORI, Luigi – Herbal medicine today: Clinical and research issues.“Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.”4:51 (2007) 37–40.

FLUHR, Joachim W. *et al.* – Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. “Journal of Investigative Dermatology.” 117:1 (2001) 44–51.

Formulário Galénico Português – 1ª Adenda (2005).

FUMAGALI, Elisângela *et al.* – Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. “Brazilian Journal of Pharmacognosy.” 18:4 (2008) 627–641.

GANESAN, A. – The impact of natural products upon modern drug discovery. “Current Opinion in Chemical Biology.” 12:3 (2008) 306–317.

GEORGE, Philomena – Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview. “Journal of Applied Pharmaceutical Science.” 1:6 (2011) 40–44.

GHASEMZADEH, Ali; GHASEMZADEH, Neda - Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. “Journal of Medicinal Plants Research.” 5:31 (2011) 6697–6703.

GIAMPIERI, Francesca *et al.* - Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. “Journal of Agricultural and Food Chemistry.” 60:9 (2012b) 2322–2327.

GIAMPIERI, Francesca *et al.* – The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. “Nutrition.” 28:1 (2012a) 9–19.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. – The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. “International Journal of Cosmetic Science.” 33:3 (2011) 210–221.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. – Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. “Química Nova” 30:2 (2007) 374–381.

GOYAL, S. *et al.* – Novel Anti-Inflammatory Topical Herbal Gels Containing *Withania somnifera* and *Boswellia serrata*. “International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives” 2:4 (2011) 1087–1094.

GULERI, Tarun Kumar; PREET, Kaur Loveleen – Formulation and Evaluation of Topical Gel of Aceclofenac. “Journal of Drug Delivery & Therapeutics.” 3:6 (2013) 51–53.

HEIM, Kelly E.; TAGLIAFERRO, Anthony R.; BOBILYA, Dennis J. – Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. “Journal of Nutritional Biochemistry.” 13:10 (2002) 572–584.

HELAL, Doaa A. *et al.* – Formulation and evaluation of fluconazole topical gel. “International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.” 4:5 (2012) 176–183.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. - Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. “Food and Chemical Toxicology.” 37:9–10 (1999) 937–942.

HURLER, Julia *et al.* – Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization: Gel Cohesiveness, Adhesiveness, and Hardness. “Journal of Applied Polymer Science.” 125 (2012) 180–188.

INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde) – “Cosméticos.” [Acedido a 10 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>;
<http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/cosmeticos>.

IVANOV, Ivan *et al.* – Polyphenols Content and Antioxidant Activities in Infusion and Decoction Extracts Obtained From *Fragaria vesca* L. Leaves. “Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies.” 19 (2015) 145–148.

JAGTAP, Shradha V; KHAN, Ayesha A. - Synthesis and biological activities of aurones: A Review. “International Journal of Pure & Applied Bioscience.” 4:2 (2016) 137–155.

JOHNSON, Anna L.; GOVINDARAJULU, Rajanikanth; ASHMAN, Tia-lynn – Bioclimatic evaluation of geographical range in *Fragaria* (Rosaceae): consequences of variation in breeding system, ploidy and species age. “Botanical Journal of the Linnean Society” 176 (2014) 99–114.

JONES, David S. *et al.* – Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. “Journal of Controlled Release.” 67:2–3 (2000) 357–368.

JONES, David S.; WOOLFSON, A. David; BROWN, Andrew F. – Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. “Pharmaceutical Research.” 14:4 (1997) 450–457.

KANODIA, L., BORGOHAIN, M., & DAS, S. – Effect of fruit extract of *Fragaria vesca* L. on experimentally induced inflammatory bowel disease in albino rats. “Indian Journal of Pharmacology.” 43:1 (2011) 18–21.

KANODIA, Lalit; DAS, Swarnamoni – A comparative study of analgesic property of whole plant and fruit extracts of *Fragaria vesca* in experimental animal models. “Bangladesh Journal of Pharmacology.” 4:1 (2008) 35–38.

KAUR, Loveleen Preet; GULERI, Tarun Kumar – Topical Gel: A Recent Approach for Novel Drug Delivery. “Asian Journal of Biomedical & Pharmaceutical Sciences.” 3:17 (2013) 1–5.

KRUGER, Maria J. *et al.* – Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. “Food Research International.” 59 (2014) 41–52.

KUSUMAWATI, L. A. I. *et al.* – Tyrosinase Inhibition Assay and Skin Whitening Cream Formulation of Edamame Extract (Glycine Max). “International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.” 7:6 (2015) 1167–1171.

LAMBERS, H. *et al.* – Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. “International Journal of Cosmetic Science.” 28:5 (2006) 359–370.

LAZZARINI, Rosana; DUARTE, Ida; FERREIRA, Alessandra Lindmayer – Patch tests. “Anais brasileiros de dermatologia.” 88:6 (2013) 879–88.

LEE, Eung-Ryoung *et al.* - Effects of Flavonoids on the Etoposide- or Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Human Keratinocyte HaCaT Cells. “Cancer Prevention Research.” 11 (2006) 58–64.

LEE, Eung-Ryoung *et al.* – Modulation of Apoptosis in HaCaT Keratinocytes via Differential Regulation of ERK Signaling Pathway by Flavonoids. “The Journal of Biological Chemistry.” 280:36 (2005) 31498–31507.

LEE, Shih Chieh *et al.* – Inhibitory effect of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira ethanol extracts on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression. “Journal of Bioscience and Bioengineering.” 122:3 (2016) 263–269.

LI, Jia *et al.* - Geraniin induces apoptotic cell death in human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo. “Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.” 97 (2013) 1016–1024.

LIBERAL, Joana *et al.* – Bioactivity of *Fragaria vesca* leaves through inflammation, proteasome and autophagy modulation. “Journal of Ethnopharmacology.” 158 (2014) 113–122.

LIBERAL, Joana *et al.* – Chemical characterization and cytotoxic potential of an ellagitannin-enriched fraction from *Fragaria vesca* leaves. “Arabian Journal of Chemistry.” (2015).

LOSSO, Jack N. *et al.* – *In vitro* anti-proliferative activities of ellagic acid. “Journal of Nutritional Biochemistry.” 15:11 (2004) 672–678.

MÄÄTTÄ-RIIHINEN, Kaisu; KAMAL-ELDIN, Afaf; TÖRRÖNEN, A.Riitta - Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). “Journal of Agricultural and Food Chemistry.” 52 (2004) 6178–6187.

MADHURI, S.; PANDEY, Govind – Some anticancer medicinal plants of foreign origin. “Current Science” 96:6 (2009) 779–783.

MARTINS, A. P. – Aspectos legais da utilização de plantas aromáticas e medicinais. Em **Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais: Curso Teórico-Prático**. 3. ed. Lisboa: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. ISBN 978-972-9348-16-7. p. 29–35.

MARTINS, João Cristóvão – Medicamentos à base de plantas: contributo para o aproveitamento dos recursos naturais nacionais. “Revista Portuguesa de Farmacoterapia.” 5:1 (2013) 22–38.

MARZULLI, Francis N.; MAIBACH, Howard I. – Contact allergy: Predictive testing in man. “Contact Dermatitis.” 2:1 (1976) 1–17.

MASAMOTO, Yukimitsu *et al.* - Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. “Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.” 67:3 (2003) 631–634.

MCGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. – Anatomy and Organization of Human Skin. Em **Rook’s Textbook of Dermatology** 7. ed. Oxford: Blackwell Publishers, 2004. ISBN 0-632-06429-3. p. 45–128.

MCNAMEE, Pauline M. *et al.* – A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. “Regulatory Toxicology and Pharmacology.” 52:1 (2008) 24–34.

MEREDITH, Paul; SARNA, Tadeusz – The physical and chemical properties of eumelanin. “Pigment Cell Research.” 19:6 (2006) 572–594.

MERKEN, Howard M.; BEECHER, Gary R. – Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. “Journal of Agricultural and Food Chemistry” 48:3 (2000) 577–599.

MUDNIC, I. *et al.* – Cardiovascular effects *in vitro* of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. “Phytomedicine.” 16 (2009) 462–469.

NAJDA, Agnieszka *et al.* – Comparative analysis of secondary metabolites contents in *Fragaria vesca* L. fruits. “Annals of Agricultural and Environmental Medicine.” 21:2 (2014) 339–343.

NASRI, Hamid; SHIRZAD, Hedayatollah – Toxicity and safety of medicinal plants. “Journal of HerbMed Pharmacology” 2:2 (2013) 21–22.

NASTI, Tahseen H.; TIMARES, Laura – MCIR, Eumelanin and Pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. “Photochemistry and Photobiology.” 91:1 (2015) 188–200.

NATURDATA – “*Fragaria vesca* Linnaeus”. [Acedido a 7 de Março de 2017]. Disponível na Internet: <http://naturdata.com/Fragaria-vesca-3541.htm>

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. – Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. “Journal of Natural Products” 79:3 (2016) 629–661.

OKTYABRSKY, O. *et al.* – Assessment of anti-oxidant activity of plant extracts using microbial test systems. “Journal of Applied Microbiology.” 106:4 (2009) 1175–1183.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) – Regulatory situation of herbal medicines: A worldwide review. (1998) 49.

ORTIZ-RUIZ, Carmen Vanessa *et al.* – Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. “Journal of Dermatological Science.” 82:2 (2016) 115–122.

PATIL, Chetana B.; MAHAJAN, S. K.; KATTI, Suvarna A. - Chalcone: A Versatile Molecule. “Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.” 1:3 (2009) 11–22.

PAUL, Willi; SHARMA, Chandra – The Anatomy and Functions of Skin. Em **Advances in Wound Healing Materials: Science and Skin Engineering**. Shrewsbury, Shropshire, UK: Smithers Rapra, 2015. ISBN 978-1-90903-038-1. p. 25–34.

PEREIRA, David M. *et al.* - Phenolics: From Chemistry to Biology. “Molecules.” 14 (2009) 2202–2211.

PINHEIRO, Pedro F.; JUSTINO, Gonçalo C. - Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. Em **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health** InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0296-0

PIWOWARSKI, Jakub P.; KISS, Anna K. – C-glucosidic ellagitannins from lythri herba (European Pharmacopoeia): Chromatographic profile and structure determination. “Phytochemical Analysis.” 24:4 (2013) 336–348.

POTTER, D. *et al.* – Phylogeny and classification of Rosaceae. “Plant Systematics and Evolution” 266 (2007) 5–43.

PRIOR, R. L.; WU, X. – Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. “Free Radical Research.” 40:10 (2006) 1014–1028.

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen – Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. “Journal of Agricultural and Food Chemistry.” 53:10 (2005) 4290–4302.

Regulamento (CE) n° 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, 30 de Novembro de 2009, L 342/59. [Acedido a 20 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=CELEX%3A32009R1223>

SACHDEVA, Silonie – Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. “Indian journal of dermatology, venereology and leprology.” 75:1 (2009) 93–96.

SAEWAN, Nisakorn; JIMTAISONG, Ampa – Photoprotection of natural flavonoids. “Journal of Applied Pharmaceutical Science.” 3:9 (2013) 129–141.

SCALBERT, Augustin – Antimicrobial properties of tannins. “Phytochemistry.” 30:12 (1991) 3875–3883.

SCCS; DEGEN, Gisela H. - Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) - Opinion on the safety of the use of α -arbutin in cosmetic products. "Regulatory Toxicology and Pharmacology." 74 (2016) 75–76.

ŞENYIGIT, Taner *et al.* – Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. "International Journal of Pharmaceutics." 403:1–2 (2011) 123–129.

SHASHANK, K.; ABHAY, KP – Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. "The Scientific World Journal." 4:2 (2013) 32–48.

SHIMOGAKI, H. *et al.* – In vitro and in vivo evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. "International Journal of Cosmetic Science." 22:4 (2000) 291–303.

SHIRAKAWA, Kotaro *et al.* – Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity. "eLife" 5 (2016) 1–17.

SILVA, N. C. C.; JÚNIOR, A. F. – Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. "The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases." 16:3 (2010) 402–413.

SISA, Miroslav *et al.* - Photochemistry of Flavonoids. "Molecules." 15 (2010) 5196–5245.

SITTAMPALAM, G. *et al.* – **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

SLOMINSKI, Andrzej; POSTLETHWAITE, Arnold E. – Skin under the sun: When melanin pigment meets vitamin D. "Endocrinology." 156:1 (2015) 1–4.

SOLANO, F. – Melanins: Skin Pigments and Much More - Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. "New Journal of Science." 2014 (2014) 1–28.

TULIPANI, Sara *et al.* – Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes Quality of Different Strawberry Genotypes. “Journal of Agricultural and Food Chemistry.” 56 (2008) 696–704.

UEDA, Clarence T. *et al.* – Topical and transdermal drug products. “Pharmacoepial Forum.” 35:3 (2009) 750–764.

URRUTIA, Maria *et al.* - Genetic dissection of the (poly)phenol profile of diploid strawberry (*Fragaria vesca*) fruits using a NIL collection. “Plant Science.” 242 (2015) 151–168.

VASSALLO, Antonio *et al.* – Identification of the Plant Compound Geraniin as a Novel Hsp90 Inhibitor. “PLoS ONE” 8:9 (2013).

VÁZQUEZ, Cecilia Velázquez *et al.* – Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. “Food Chemistry.” 176 (2015) 480–486.

VEIGA, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. – Plantas medicinais: Cura segura? “Química Nova” 28:3 (2005) 519–528.

VIDEIRA, Inês Ferreira Dos Santos; MOURA, Daniel Filipe Lima; MAGINA, Sofia – Mechanisms regulating melanogenesis. “Anais brasileiros de dermatologia.” 88:1 (2013) 76 - 83.

VIEGAS, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. – Os produtos naturais e a química medicinal moderna. “Química Nova” 29:2 (2006) 326 – 337.

VITORINO, Carla *et al.* – Design of a dual nanostructured lipid carrier formulation based on physicochemical, rheological, and mechanical properties. “Journal of Nanoparticle Research.” 15:10 (2013).

VRHOVSEK, Urska; GUELLA, Graziano; GASPEROTTI, Mattia – Clarifying the Identity of the Main Ellagitannins in the Fruit of the Strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. “Journal of agricultural and food chemistry.” 60 (2012) 2507–2516.

VROMEN, J. (2007). Formulations for topical delivery of bioactive substances and methods for their use.

WAHLBERG, Jan E.; LINDBERG, Magnus – Patch Testing. Em **Contact Dermatitis**. 5. ed. [S.l.]: Springer, 2011. ISBN 978-3-540-24471-4

WANG, Wencong *et al.* – Influence of substitution on the rheological properties and gelation of hydroxyethyl cellulose solution in NaOH-water solvent. “Carbohydrate Polymers.” 124 (2015) 85–89.

WANG, Yan *et al.* - A potential antitumor ellagitannin, davidiin, inhibited hepatocellular tumor growth by targeting EZH2. “Tumor Biology.” 35:1 (2013) 205–212.

WELLER, Richard *et al.* – **Clinical Dermatology, Fourth edition**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2008. ISBN 978-1-405-14663-0.

YAMAKOSHI, Jun *et al.* – Lightening Effect on Ultraviolet-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin by Oral Administration of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds. “Pigment Cell Research.” 16:6 (2003) 629–638.

YILDIRIM, Arzu Birinci; TURKER, Arzu Ucar – Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). “Scientia Horticulturae. 169 (2014) 169– 178.

YOSHIMURA, Mineka *et al.* – Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. “Bioscience, biotechnology, and biochemistry” 69:12 (2005) 2368 – 2373.

YUTAKA, Hatano *et al.* – Maintenance of an Acidic Stratum Corneum Prevents Emergence of Murine Atopic Dermatitis. “Journal of Investigative Dermatology.” 129:7 (2009) 1824–1835.

ZUGIC, Ana *et al.* - Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. “Industrial Crops and Products.” 52 (2014) 519–527.