

Avaliação do potencial cosmético do extrato de *Melissa officinalis*

Autoras:

Marina Carneiro Canalle

Farmacêutica pela Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP). Santa Catarina, SC

Rafaela Lima

Graduanda em Medicina pela Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP). Santa Catarina, SC.

Talita Regina Granemann Nunes

Mestre em Ciências e Biotecnologia. Farmacêutica pela Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP). Santa Catarina, SC

Claudriana Locatelli

Doutora em Farmácia pelo Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Sociedade - PPGDS. Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP). Santa Catarina, SC

DOI: 10.58203/Licuri.20276

Como citar este capítulo:

CANALLE, Marina Carneiro et al. Avaliação do potencial cosmético do extrato de *Melissa Officialis*. In: OLIVEIRA, Hilderline Câmara (Org.). **Estudos Multidisciplinares em Ciências da Saúde**. Campina Grande: Licuri, 2023, p. 105-123.

ISBN: 978-65-85562-02-7

Resumo

A *Melissa officinalis*, (erva cidreira) é planta medicinal pertencente à família das Lamiaceas, que possui metabólitos secundários. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial dermocosmético da *Melissa officinalis*, pois existem poucos dados sobre ela em relação à sua eficácia em produtos dermocosméticos naturais. Para tanto, foi determinado o perfil fitoquímico do extrato através da análise de fenóis totais, flavonoides e taninos. O potencial antioxidante foi avaliado pelo método de DPPH. A capacidade de irritação ocular e citotoxicidade foi determinada pela atividade hemolítica. O potencial cosmético foi avaliado pela capacidade de inibição da enzima tirosinase, atividade fotoprotetora pelas técnicas de FPS e UVA, além da estabilidade da preparação cosmética contendo 1% de extrato. Foi observado teor elevado de taninos ($215,69 \pm 3,99$ mg EAT/g extrato). Uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ de extrato mostrou uma capacidade de captura do DPPH de aproximadamente 80%. Quanto à irritação ocular, observou-se uma leve capacidade irritante em concentrações maiores que 500 $\mu\text{g/mL}$. Quanto ao potencial cosmético, verificou-se um FPS de $17 \pm 1,5$, um baixo poder despigmentante, avaliado pela inibição da tirosinase e ausência de fotoproteção UVA. Os resultados de estabilidade da formulação cosmética foram satisfatórios, tanto quanto ao aspecto, pH e características organolépticas. Assim, evidenciou-se que a utilização do extrato de *M. officinalis* é promissora quanto à sua utilização em produtos cosméticos, com capacidade antioxidante e contra oleosidade, haja vista a concentração significativa de taninos no extrato.

Palavras-chave: Erva cidreira. Antioxidante. Fotoprotetor. Despigmentante. Planta medicinal.

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e relaciona-se a diversas funções vitais e de comunicação, dentre as quais destaca-se a de isolar estruturas internas do ambiente externo. Assim, vive em constante transformação e divide-se em três partes: epiderme, derme e hipoderme. Na primeira, existem as células responsáveis pela síntese de melanina, a qual protege o corpo dos raios ultravioletas (Bernardo, 2019).

A pele está em contínuo contato com as radiações solares como a ultravioleta. Dessa forma, a fim de protegê-la, surgiram os fotoprotetores, os quais são preparações cosméticas que a defendem dos efeitos danosos da radiação UV (Gonçalves, 2017). A radiação ultravioleta (UV), proveniente do sol, é não ionizante e provê benefícios como a vitamina D. Entretanto, pode interferir de maneira agressiva ao corpo caso a pele a ela se exponha sem proteção (Silva, 2017).

O envelhecimento cutâneo pode ser dividido entre intrínseco e extrínseco, cronológico e de fotoenvelhecimento, respectivamente. Desse modo, o fotoenvelhecimento se dá pela exposição aos raios UVA e UVB. Uma das formas para combater os danos provocados pelo sol se verifica por meio do uso de antioxidantes. Os antioxidantes vegetais possuem uma vasta natureza, porém os compostos fenólicos, como os flavonoides, fenóis e taninos, são o grupo mais representativo. Os antioxidantes fenólicos atuam sequestrando radicais livres, sendo eficazes na oxidação lipídica (Henrique, 2017).

A indústria cosmética, por interferência de acentuado desenvolvimento científico, possibilitou a comercialização de produtos antissinais, que combatem o envelhecimento cutâneo. Nesse contexto, a tirosinase tem importante papel na biossíntese da melanina e sua inibição pode atrapalhar o processo ou minimizar algumas das suas sequelas. Sendo assim, uma hiperpigmentação ou manchas na pele causadas pelo excesso da melanina podem ser tratadas com fórmulas farmacêuticas que contenham substâncias ricas em anti-tirosinase (Corradi, 2012).

Dessa maneira, a melissa, ou erva cidreira, por ser uma planta medicinal pertencente à família das Lamiáceas (Ciplam, 2017), dispõe de óleo essencial e da sinergia de todos os metabólitos secundários da planta, podendo desempenhar atividade antioxidante, antibiótica, antifúngica, antibacteriana e sedativa.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar, por meio de análises *in vitro*, o potencial dermatológico do extrato hidroalcoólico bruto obtido das folhas de *Melissa officinalis* para o desenvolvimento de um produto dermocosmético.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto de *M. officinalis*

Para esse estudo, utilizou-se extrato seco de *Melissa officinalis* fabricado pela empresa Fagron, de lote 200K06-B020-069550, obtido através das folhas e secadas por método Spray Dryer. A partir disso, preparou-se extrato hidroalcoólico em álcool 50%. Os extratos foram filtrados em bomba a vácuo e concentrados sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotativo e de banho de aquecimento com temperatura de 65 ± 5 °C.

Perfil fitoquímico do extrato bruto hidroalcoólico de *M. officinalis*

Os fenóis totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton Júnior (1965). Os resultados foram obtidos pela leitura em espectrofotometro no comprimento de onda de 750 nm e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de extrato. A determinação de flavonoides deu-se pelo método espectrofotométrico descrito por Rio et al., (1996) e os resultados expressos em mg de equivalente de quercetina (EQ)/g de extrato. Os taninos foram determinados pelo método de Folin Denis descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento- MAPA. Os resultados foram obtidos por espectofotometria e expressos em µg equivalentes de ácido tânico (EAT)/ g de extrato.

Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato foi determinada pelo teste de DPPH descrito por Brand-Willians e Berset (1995). Prepararam-se diluições do extrato nas concentrações de 62,5 a 500 µg/mL, sendo incubadas com solução de DPPH 20 µM por 30 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 518 nm. Utilizou-se etanol (200 µL) como branco e como padrão a quercetina. A atividade de eliminação de radicais (RSA) foi calculada em porcentagem de

capacidade sequestradora de radicais DPPH, usando a Equação: Capacidade sequestradora (%): $100 - [(A0 - A1) \times 100]/A2$. sendo A0: absorbância da amostra; A1: absorbância do branco; A2: absorbância do controle 100% DPPH.

Análise de citotoxicidade

A citotoxicidade do extrato foi analisada pelo ensaio de atividade hemolítica descrito por Pappé et al (1987, 1990). Inicialmente, realizou-se a coleta do sangue total de um indivíduo adulto saudável, que não faz uso de medicamentos. O sangue foi centrifugado e o pellet foi lavado três vezes com tampão fosfato pH 7,4. Após, preparou-se uma suspensão de eritrócitos na concentração de 8×10^9 células/mL. Para análise do efeito citotóxico, diferentes concentrações do extrato (10 a 2000 µg/ml) foram incubadas com a solução de eritrócitos durante uma hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e a leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 541 nm. Utilizou-se água destilada como controle positivo no lugar do extrato, e como controle negativo utilizou-se tampão PBS. Análises foram realizadas em triplicata, e a porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte Equação: % de hemólise = $(ABS541 \text{ extrato} - ABS541 \text{ branco da amostra}) / (ABS 541 \text{ controle positivo} - ABS 541 \text{ branco}) \times 100$.

Ensaio *in vitro* de potencial de irritação ocular

Para determinação do potencial de irritação ocular, inicialmente, deu-se o ensaio de citotoxicidade pelo teste de atividade hemolítica conforme descrito acima, sendo determinada a concentração de extrato necessária para hemólise de 50% (H50) das hemácias em suspensão. Após, verificou-se o ensaio de desnaturação das proteínas, momento no qual se adicionou 1 mg/ml de extrato a uma suspensão de hemácias na concentração de 8×10^9 células/mL, sendo utilizado como controle positivo uma solução de dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS). Para determinação da α -hemoglobina, a absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro a 575 nm. Para determinação da β -hemoglobina, a absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A partir dessas determinações, calculou-se a relação α/ β (Ri), sendo essa usada para caracterizar o índice de desnaturação (ID) da hemoglobina conforme Equação: ID (%) = $((R1 - Ri) / (R1 - R2)) \times 100$

Em que: R1 - relação α/ β hemoglobina (fixo: 1,05 - quando o controle positivo

usado é o SDS); Ri - relação α/ β da substância teste; R2 - relação α/ β da solução SDS 0,1%. A relação da concentração de amostra que causa 50% de hemólise (H50) e índice de desnaturação proteica (ID) da amostra foi empregada para a classificação quanto ao seu potencial de irritação, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das amostras quanto ao seu potencial de irritação no teste RBC.

Faixa (H50/ID)	Classificação
>100	Não irritante (NI)
≥ 10	Irritante Leve (IL)
≥ 1	Irritante Moderado (IM)
≥ 0.1	Irritante Severo (IS)
< 0.1	Irritante Máximo (Imax)

Fonte: Adaptado de Pape (1992).

Teste de inibição da enzima tirosinase *in vitro*

A inibição da tirosinase pelo extrato foi avaliada segundo método descrito por Chan et al. (2008), em triplicata, no qual diferentes concentrações do extrato de *M. officinalis* (10 a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foram adicionadas em placa de 96 poços com solução de tirosinase (333 UI/ml em tampão fosfato). A placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C, e, em seguida, as absorbâncias 1 (A1) foram determinadas em leitor de microplacas a 492 nm. Após, adicionou-se o substrato L-DOPA (diidroxifenilalanina) na concentração de 12 mM e incubou-se novamente os tubos por 20 minutos a 37 °C seguido da determinação das absorbâncias finais (A2) no mesmo comprimento de onda. Como controle positivo, utilizou-se o ácido kójico preparado da mesma forma que a amostra em análise. A porcentagem da inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme Equação: Inibição (%) = $((A2-A1 \text{ amostra}) / (A2-A1 \text{ controle}) \times 100)$.

Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS)

Para a determinação do FPS, utilizou-se o método espectrofotométrico *in vitro* desenvolvido por Mansur et al. (1986). Preparou-se em triplicata uma solução com concentração final de 0,2 mg/mL do extrato de *M. officinalis*. As absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro no intervalo de 290 - 320 nm, faixa

correspondente à radiação UVB responsável por causar eritema à pele. As leituras foram realizadas em um intervalo de 5 nm. Para o cálculo do FPS, utilizou-se a expressão matemática:

$$FPS = FC \cdot \sum^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda)$$

Onde: **FC** = fator de correção; **EE (λ)** = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ); **I (λ)** = intensidade de luz solar no comprimento de onda (λ); **Abs (λ)** = leitura espectrofotométrica da absorvância da formulação em solução no comprimento de onda

Desenvolvimento da formulação cosmética

O produto cosmético foi desenvolvido no laboratório de semi-sólidos e líquidos da Farmácia Escola de Manipulação da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe- UNIARP. A composição quali e quantitativa descreve-se na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da fórmula desenvolvida

Matéria-prima	INCI name	Concentração % (p/p)
Extrato de Melissa officinalis	Melissa officinalis extract	1,5
Emulium delta	Cetyl Alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-75 Stearate (and) Ceteth-20 (and) Steareth20	5
BHT	Hidroxitolueno Butilado	0,05
Manteiga de karité	Butyrospermum Parkii Butter	1,5
Cosmacol OE	Dicaprylyl Ether	4
Água destilada	Water	Qsp
EDTA	Disodium EDTA	0,05
Propilenoglicol	Propylene glycol	1,5
Aristoflex avc	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	1
Transcutol	Ethoxydiglycol	2
Phenogard MP	Phenoxyethanol	0,6

Fonte: Adaptado de Brasil (2004).

INCI name sigla para Internacional Nomenclature Of Cosmetic Ingredients, ou seja, Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos. Trata-se de um sistema

internacional de codificação para designar os ingredientes utilizados em produtos cosméticos, reconhecido e adotado mundialmente.

Separadamente, pesaram-se as matérias-primas da fase oleosa (BHT, manteiga de karité, Cosmacol OE e emulium delta) e da fase aquosa (água, EDTA, propilenoglicol Aristoflex AVC), sendo ambas aquecidas em chapa aquecedora até atingir temperatura de 75°, quando a fase oleosa foi vertida à fase aquosa sob agitação de 1200 rpm, utilizando agitador mecânico de bancada. A agitação foi mantida até a formação da emulsão. Ao final, adicionaram-se o extrato de *Melissa officinalis*, o transcitol e o Phenogard MP.

Avaliação de estabilidade da formulação desenvolvida

O estudo de estabilidade do produto cosmético foi realizado durante 15 dias e iniciou pelo teste de centrífuga seguido do teste preliminar de estabilidade conforme descrito por Brasil (2004). Para o teste de centrífuga, em tubos cônicos, pesaram-se 5g da formulação e submeteram-se à centrifuga com velocidade crescente de 1000, 2000 e 3000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos em cada velocidade.

Após passar pelo teste de centrifuga sem apresentar indícios de instabilidade, 20g da formulação desenvolvida foram acondicionadas em bisnaga cosmética. Em triplicata, as bisnagas contendo o produto cosmético desenvolvido foram armazenadas durante 15 dias em condições extremas de temperatura: Freezer (-10,0°C ± 0,5°C); Estufa (50,0°C ± 5°C); Refrigerador (5,0 ± 1,0°C) e Ciclo (freezer -10,0°C ± 0,5°C por 24 h seguido de Estufa 50,0°C ± 5°C por 24 horas).

As características organolépticas, aspecto, cor e odor das amostras submetidas ao teste de estabilidade preliminar foram analisadas diariamente. O aspecto e a cor foram avaliados visualmente e o odor diretamente através do olfato (Brasil, 2004; Spellmeier, 2005). Além disso, determinou-se diariamente o pH por meio de fitas medidoras de pH.

Avaliação do potencial fotoprotetor uva *in vitro*

Utilizou-se a metodologia proposta por Hommoss (2008), Kerrile (2009), Detoni e colaboradores (2012) apud Costa (2015), que consiste na observação do potencial do extrato em impedir degradação do resveratrol (KERRILEE, 2009; DETONI *et al.*, 2012). Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de resveratrol (RVS) 1 mg/mL em EtOH:H₂O (80):(20). Adicionaram-se 10 mL dessa solução dentro das placas de petri. Em

seguida, pesou-se 0,04 g do cosmético desenvolvido, sendo espalhado homogeneamente na parte superior das tampas de placas de petri (4,5 cm de diâmetro). As placas foram submetidas à radiação com lâmpadas UVA (320-400 nm) com 60.0 W de potência durante 120 minutos. A fotodegradação da RVS irradiada teve sua absorbância medida em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 306 nm. Após 120 minutos, quanto maior a absorbância, maior a proteção, pois menor quantidade do trans-RVS foi transformado em cis-RVS. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de degradação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais com finalidades cosméticas surgiu na antiguidade quando Cleópatra, conhecida pela sua vaidade, motivou a pesquisa cosmética à base de plantas e de óleos vegetais (Teske e Trentini, 2001). Desde então, inúmeras pesquisas vêm se realizando, sendo muitos cosméticos lançados à base de extratos vegetais. No entanto, cabe destacar que, apesar do uso popular da *M. officinalis* para controle de crises nervosas, taquicardia, melancolia, histerismo e ansiedade, os quais são conferidos aos constituintes químicos da planta como os compostos fenólicos (SILVA et al., 2005), não se tem relato de estudos que avaliaram o potencial cosmético da *Melissa officinalis*.

Sendo assim, preparou-se um extrato hidroalcoólico a partir de extrato seco da *M. officinalis*, o qual apresentou um rendimento de 1,13%. Silva et al. (2021) prepararam extratos com todas as partes da planta *Croton Blanchetianus* (raízes e folhas), que foram reduzidas a pó para iniciação do processo de obtenção do extrato. Realizou-se o processo de maceração por um período de sete dias, utilizando-se como solvente etanol e metanol. Obteve-se, desse modo, rendimento do extrato etanólico da folha de 3,37% e metanólico de 2,43%. Tais resultados são maiores que o rendimento do atual estudo, levando em conta a quantidade da planta utilizada para o processo de obtenção do extrato. No entanto, o rendimento, apesar de ser pequeno, mostrou-se eficiente no teor de compostos com atividade antioxidante como compostos fenólicos, flavonoides e taninos.

Perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico de *M. officinalis*

A partir da análise do perfil fitoquímico do extrato de melissa, evidenciaram-se

teores de fenóis totais equivalentes a $0,171 \pm 0,001$ mg EAG/g extrato, flavonoides $0,047 \pm 0,009$ mgEQ/g de extrato e taninos $215,69 \pm 3,99$ mg EAT/g extrato. Pode-se perceber que o principal fitoquímico presente no extrato testado foi tanino. Estudos realizados por Silva et al. (2017) e Vinha et al. (2013) mostram teores maiores de flavonóides totais ($0,228$ mg EQ/mg de decocto e $6,864$ mg EQ/g de extrato bruto respectivamente) e fenóis totais ($2,581$ mg/g de extrato bruto) e menores teores de taninos ($0,115$ mg EAT/g de extrato bruto). Quanto a esses aspectos, o presente estudo apontou menor teor de compostos fenólicos e flavonoides que nas pesquisas citadas anteriormente, ou seja, possui uma menor quantidade de substâncias antioxidantes. Essas diferenças podem ter ocorrido pela forma de obtenção do extrato. Vinha et al. (2013) obtiveram um extrato aquoso a partir de folhas moídas, Silva et al. (2017) prepararam uma decocção com folhas, enquanto, no presente estudo, obteve-se o extrato através de extração hidroalcoólica, usando extrato seco padronizado.

Cabe destacar que os taninos desempenham um importante papel na retirada da camada de gordura do couro cabeludo, que se deve as suas atividades adstringentes, além de uma importante ação antimicrobiana, servindo como barreira à proliferação de micro-organismos (Santos, 2017), evitando assim uma disbiose na pele, fato importante, pois pode ser um extrato utilizado na obtenção de produtos cosméticos para o tratamento de problemas de pele como acne ou de outros que envolvam o desequilíbrio da microbiota cutânea.

Avaliação da atividade antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que têm por características diminuir ou bloquear as reações de oxidação ocasionadas pelos radicais livres. A pele é um dos tecidos que mais sofre a ação desses radicais, sendo assim a obtenção de cosméticos com atividade antioxidante podem reduzir os efeitos danosos ocasionados pelos radicais livres sobre a pele como o envelhecimento precoce e o surgimento de manchas, dermatites ou mesmo tumor de pele (Campos e Frasson, 2011). Com o intuito de avaliar a atividade antioxidante do extrato de *M. officinalis*, verificou-se o teste de DPPH.

Como se pode observar na Figura 1, a concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ de extrato de *M.officinalis* mostrou uma capacidade de captura do radical DPPH de aproximadamente 90%, efeito semelhante ao apresentado pela quercetina na concentração de $80 \mu\text{g/mL}$, o qual é um antioxidante puro.

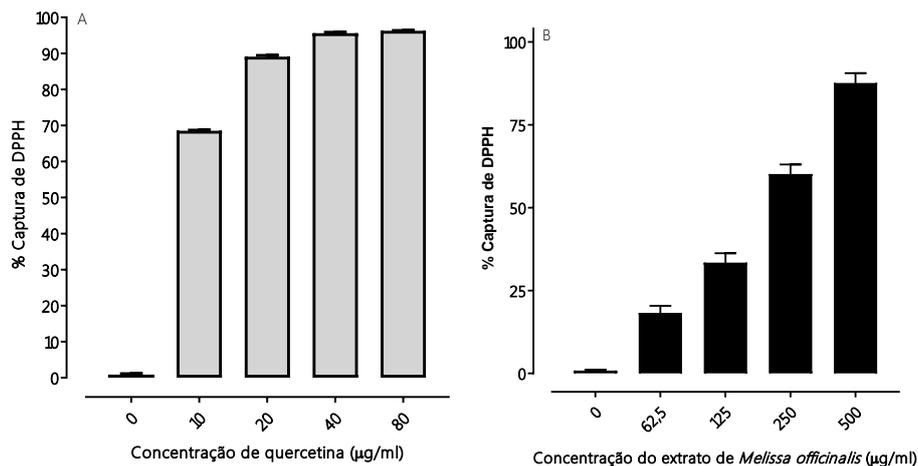


Figura 1. Percentual de captura do radical DPPH em *Melissa officinalis*.

Um estudo realizado por Silva et al. (2017) comparou extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam, para o qual foi preparada uma solução de DPPH 0,2% em etanol 80%, e a solução estoque do extrato aquoso das plantas foram de 50 mg/mL, sendo assim diluídas nas concentrações 250, 500 e 1000 µg/mL. Em relação às amostras, 750 µL delas foram adicionados em tubos de ensaio juntamente com 1500 µL da solução de DPPH. Isso revela que a amostra de *Melissa officinalis* foi a que teve maior desempenho da inibição desse método antioxidante, obtendo os resultados $78,12\% \pm 0,66$; $75,06\% \pm 0,49$ e $72,23\% \pm 2,00$ (porcentagem de inibição \pm desvio padrão), nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente.

Nesse contexto, é possível notar que, tanto no presente estudo quanto no realizado por Silva et al. (2017), a avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH da *Melissa officinalis* apresentaram uma grande porcentagem de inibição desse radical livre.

Análise de citotoxicidade

A análise da atividade hemolítica é responsável por avaliar a capacidade que o extrato tem em hemolisar as células sanguíneas, quanto mais baixo for o poder de hemólise, menor será a toxicidade. Comparando os resultados das concentrações do extrato com os respectivos controles (Tabela 3), pode-se notar que o extrato de *M. officinalis* possui leve poder de toxicidade, mostrando-se favorável à utilização em produtos cosméticos em concentrações baixas de até 500 µg mL⁻¹.

Tabela 3. Comparação entre a atividade hemolítica de diferentes concentrações do extrato de *Melissa* com os respectivos controles.

Porcentagem de Hemólise (Média±Desvio Padrão)	
Concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ext. de <i>Melissa</i> (%)
C-	0,0 ± 0,00
C+	100 ± 0,04
10	0,12 ± 0,17
50	0,37 ± 0,28
125	1,20 ± 1,00
250	2,50 ± 1,20
500	4,80 ± 2,00
1000	10,00 ± 3,00
1500	15,00 ± 1,50
2000	22,00 ± 2,00

Legenda: C- controle negativo; C+ controle positivo.

Os resultados atingidos pela pesquisa base deste artigo vão de encontro aos observados por Ferreira e Nardin (2015), pois tais autores avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de extratos de *Bauhinia glabra* e utilizaram como controle positivo a fitohemaglutinina (PHA) nas concentrações do extrato da planta estudada. Com isso, perceberam não haver efeitos sobre as células já que os valores encontrados foram de 0,668 e 0,759 nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Dessa forma, o extrato resultando da experiência em comento não obteve resultados tóxicos em nenhuma das concentrações, pois ficaram próximos a zero, fato que diverge ao do atual estudo.

Ensaio *in vitro* de potencial de irritação ocular

De acordo com a Tabela 1, a classificação da irritação ocular varia de não irritante a irritante máximo. Se comparados os valores da tabela aos valores achados na presente pesquisa, o extrato de *Melissa officinalis* apresentou resultado de H50/ID de 27,10. Sendo assim, pode ser classificado como irritante leve, podendo ser utilizada em formulações se usada em concentrações baixas de até 500 $\mu\text{g/mL}$ pois o índice foi ≥ 10 .

No trabalho de Alves 2003, utilizaram-se tensoativos para teste, sendo eles, cocoamido propil betaína T.1, lauril éter sulfato de sódio T.2, dodecil sulfato de sódio

T.3 e cloreto de benzalcônis T.4. através da desnaturação da oxiemoglobina e utilizando espectrofotometria com absorvância de 540 nm e 575 nm para leitura das hemoglobinas liberadas dos eritrócitos quando entraram em contato com a água, Dodecil Sulfato de Sódio a 1 mg/mL e a substância teste 1 mg/mL ou 10 mg/mL. O potencial hemolítico determinado a partir do valor do H50 (1126 µg/mL) mostrou que os tensoativos T.1 e T.2 de baixa irritação ocular manifestaram valores na faixa de 60 mcg/mL a 70 mcg/mL. Novamente, é perceptível divergência aos achados do presente estudo como se pode verificar a partir dos dados da N, já explicitados no parágrafo anterior a este.

Teste de inibição da enzima tirosinase *in vitro*

A tabela 4 mostra os resultados obtidos a partir da inibição da enzima tirosinase do extrato de *Melissa officinalis* e do padrão utilizado, ácido kójico. Observa-se que, em uma concentração de 400 µg/mL do extrato, obtiveram-se resultados parecidos com o padrão na concentração de 50 µg/mL, sendo de $28,3 \pm 0,75\%$ a capacidade de inibição da tirosinase. Conclui-se que o extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas de *M. officinalis* possui pouca atividade despigmentante, haja vista um efeito muito leve sobre a enzima, podendo ser levadas em consideração as baixas concentrações do extrato que foram utilizadas para o teste.

Tabela 4. Inibição da atividade enzimática da Tirosinase do extrato hidroalcoólico de melissa.

Concentração (µg/mL)	Melissa Porcentagem de inibição	Á. Kójico Porcentagem de inibição
0,0	$0,0 \pm 0,01$	$0,0 \pm 0,01$
10	$22,7 \pm 0,96$	$16,1 \pm 0,25$
50	$26,6 \pm 0,87$	$28,3 \pm 0,28$
100	$27,1 \pm 0,28$	$40,5 \pm 0,34$
200	$28,2 \pm 0,36$	$56,1 \pm 0,18$
400	$28,3 \pm 0,75$	$67,2 \pm 0,98$
800	$32 \pm 1,20$	$76,31 \pm 0,85$
1000	$32,1 \pm 1,40$	$82,18 \pm 0,48$

Em contraposição ao presente estudo, na pesquisa realizada por Panontin et al. (2020), chegou-se a resultados satisfatórios na inibição da enzima tirosinase do extrato bruto hidroetanólico da casca de jatobá. Após duas horas, tal amostra demonstrou uma

maior porcentagem de inibição da tirosinase. Igualmente, o extrato, passadas mais duas horas de contato com a enzima, obteve uma porcentagem de inibição maior que a do padrão em uma hora, sugerindo que tem ação despigmentante promissora se utilizado em cosméticos.

Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS)

O presente estudo alcançou resultados positivos à fotoproteção obtida através do extrato de *m. Officialis*, pois o fps encontrado foi de $17 \pm 1,5$. Gomes et al. (2022) avaliaram o fator de fotoproteção do extrato etanólico de *p. Guajova*, em espectrofotômetro nas leituras de 290 a 320 nm, obtendo o resultado de $29,79 \pm 0,001$ na concentração de 500 µg/ml, sugerindo que a espécie é eficaz na ação fotoprotetora se usada em formulações cosméticas.

Florencio et al. (2016), ao determinarem a fotoproteção solar *in vitro* da *Matricaria recutita L.*, observaram que se obteve um pico de absorção do extrato em torno de 400 nm. Tal resultado tem significado para a utilização do extrato com ação fotoprotetora, já que a radiação ultravioleta se dispõe entre 290-400 nm, levando a um aumento do FPS. A absorbância encontrada na faixa de fotoproteção foi razoavelmente alta, sendo possível a obtenção da ação fotoprotetora. Quando se compara o extrato hidroalcolico de *M. officinalis* com outros extratos de plantas ou de bagaço de uva (Andrade et al., 2021; Florencio et al., 2016; Gomes et al., 2022) percebe-se um poder fotoprotetor UVB maior da *M. officinalis*.

Avaliação de estabilidade da formulação desenvolvida

Estudos de estabilidade de produtos cosméticos contribuem para orientar o desenvolvimento da formulação e monitorar a estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, aumentando a confiabilidade e a segurança dos produtos (Velasco et al., 2009). A centrifugação simula estresse físico na amostra e serve como parâmetro para a continuidade dos testes de estabilidade, pois caso haja qualquer instabilidade nesse teste, deve-se submeter a reformulação (Brasil, 2004). Esse teste é importante para pré-selecionar as formulações que devem ser submetidas aos testes de estabilidade acelerada. O produto cosmético desenvolvido não apresentou instabilidade no teste de centrífuga.

Estudos de Vieira et al. (2017) e de Schorro et al. (2020), também, não

apresentaram separação de fases no teste de centrifuga. Já Siqueira (2016) encontrou leve separação de fases em duas de suas formulações, representando instabilidade do produto e necessidade de reformulação. Tais autores utilizaram creme com óleo de babaçu, cremes com fotoproteção e cold cream, respectivamente.

Após o teste de centrifuga, o produto cosmético foi analisado quanto ao aspecto, à cor, ao odor, e ao pH. Os resultados estão expressos na tabela 5.

Tabela 5. Características organolépticas e valor de pH da formulação cosmética.

Formulação	Aspecto	Cor	Odor	Valor de pH
Creme contendo 1,5% do extrato de <i>M. officinalis</i>	E.V	Cor creme com leve esverdeado do extrato	CARAC	5

Legenda: EV: emulsão viscosa. CARAC: odor característico.

As características organolépticas do cosmético permaneceram estáveis durante os 15 dias em que esteve submetido às diferentes temperaturas, não havendo alteração. Percebeu-se que as amostras mantidas no freezer congelaram, mas para a realização dos testes, esperou-se seu descongelamento.

Todavia, houve variação de pH entre 4,5 a 6. Nas amostragens armazenadas no refrigerador, a partir do 11° dia, o pH abaixou de 5,5 para 4,5, mas após o pH voltou ao valor inicial de 5,5. As que foram mantidas na estufa, o pH variou entre 5 a 6 na maioria dos dias, e teve alteração somente no 12° dia com valor de 4,5, porém logo o pH se estabilizou para 5. No freezer, as amostras também se mantiveram nos valores de 5 e 6, e assim como as da estufa, no 12° dia, baixou para 4,5 e se estabilizou nos demais dias para 5. E quanto ao ciclo, os valores foram os mesmos, variavam de 5 a 6, e no 13° (freezer) 14° (estufa) e 15° (freezer) dia, o valor ficou em 4,5. Dessa forma, mesmo que tenha ocorrido essa variação, o pH da formulação contínua é aconselhável para ser utilizado em cosméticos.

A partir dos testes de estabilidade preliminar realizados por Rosário et al. (2021), após 90 dias em que os cremes contendo óleo de babaçu foram submetidos a diferentes temperaturas, não se perceberam mudanças organolépticas, dessa forma, não havendo alteração da estabilidade.

No trabalho de Kotwiski (2019), avaliando a estabilidade de creme hidratante à base de azeite de dendê, nas avaliações organolépticas as formulações se mantiveram

estáveis. Com a realização dos testes de estresse térmico, em que as amostras foram submetidas a diferentes temperaturas, sendo elas geladeira, que apresentou pequena modificação, em estufa, não obtendo alterações, e ainda realizado ciclo de congelamento e de descongelamento em estufa 37°C e refrigeração 5°C, os resultados obtidos não sofreram instabilidade, assim como no presente estudo.

Avaliação do potencial fotoprotetor uva *in vitro*

Na fotodegradação do resveratrol, as placas que foram revestidas com o creme possuindo extrato de *M.officinalis* não obtiveram resultados positivos, sem proteção significativa assim como as demais, que continham apenas o veículo e as sem revestimento. Outros estudos com espécies vegetais, tal como o de Daher (2014), o qual avaliou o potencial fotoprotetor UVA de extrato glicólico de açaí também reportaram resultados similares de não proteção contra o espectro UVA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Haja vista a intenção primeira deste estudo, ou seja, a avaliação do potencial cosmético do extrato de melissa, é pertinente apontar que, após diversos testes, houve tanto resultados positivos quanto negativos. Em relação ao perfil fitoquímico, a quantidade de taninos encontrada foi favorável em relação aos flavanóides e aos fenóis, pois tais substâncias se mostraram em menor quantidade se comparado a outros estudos. Ainda, o extrato de *M. officinalis* demonstrou bom poder antioxidante, bom poder fotoprotetor (UVB) e o cosmético produzido contendo o extrato se manteve estável durante os testes.

Por outro lado, vale destacar que não obteve resultados tão positivos em relação aos testes de citotoxicidade e de irritação ocular, sendo o extrato classificado como leve poder tóxico e leve poder de irritação. O poder de inibição da enzima tirosinase foi muito leve, com isso, o extrato não possui grande poder despigmentante, e os resultados do teste *in vitro* de fotoproteção UVA não foram promissores, concluindo que o extrato não possui poder protetor contra o raio UVA.

Dessa forma, acredita-se que extratos hidroalcoólicos de *M.officinalis* terão efeitos favoráveis se usados em cosméticos naturais para tratamento de oleosidade, antioxidante e contra raios UVB. Como, por exemplo, em uma formulação de sabonete

líquido para rosto, se usado em concentrações baixas, tendo em vista o leve poder de irritação ocular. No entanto, salienta-se a necessidade de mais estudos com testes in vivo para avaliar a segurança quando ao potencial citotóxico e alergênico da formulação.

É interessante destacar que o presente estudo partiu de uma amostra pequena, ou seja, para resultados mais conclusivos, fazem-se relevantes outros estudos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.M.D, SANTOS, R.J, GENOVESE, M.I, LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais $dpph^{\bullet}$, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 26, n.2, p. 446-452, 2006.

ALVES, E.N, Red Blood Cell (RBC) - **Teste de hemólise**: Uma alternativa ao Teste de Draize-Irritação Ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no Controle de Qualidade, PPGVS/INCQS FIOCRUZ 2003.

ANDRADE, L.B. HOLLAS, F.F, LOCATELLI, C. Antioxidant and Photoprotector effect from grape marc hydroalcoholic extract: in vitro assays, *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 10433-10443, 2021.

BERNARDO, A.F.C., dos SANTOS, K., da SILVA, D.P. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade, *Revista Saúde em Foco*, v. 1, n. 11, p. 1221-1233, 2019.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lwt - Food Science And Technology*, [s.l.], v. 28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1ª ed. Brasília: ANVISA; 2004. 52p. (Série Qualidade em Cosméticos; v.1).

CAMPOS, J.S.; Frasson, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. *Revista Ciências Farmácia Básica Apl.*, v. 32, n.3, p. 363-368, 2011.

CHAN, E. W. C, LIM, Y.Y., WONG, L.F., LIANTO, F.S. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem*, v. 3, p. 477-483, 2008.

Ciplam-Centro de informações sobre plantas medicinais. A erva cidreira como sedativo. Pernambuco, 2017. Disponível em: <https://ciplamasces.wordpress.com/2017/04/26/a->

beterraba-no-tratamento-da-anemia-ferropriva/ Acesso em: 30 de mar. 2022.

COSTA, S.C.C., DETONI, C.B., BRANCO, C.R.C., BOTURA, M.B., BRANCO, A. In vitro extract and its potential for photoprotective effects of marcetia taxifolia ethanolic sunscreen formulations, **Rev. Bras. Farmacogn.**, V. 25, N. 4, P. 413-418, 2015.

DAHER, C.C. **Desenvolvimento de emulsões o/a contendo extrato glicólico de açaí e avaliação da atividade fotoprotetora**, NATAL-RN, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/19364> Acesso em: 30 out. 2022.

FERREIRA, K.F.C, Nardin, J.M. Avaliação in vitro da citotoxicidade do extrato de bauhinia glabra em células linfocitárias normais, *Cad. da Esc. de Saúde*, v.1, n. 13, p. 79-92, 2017.

FIRMINO, C.R. Avaliação da qualidade de bases farmacêuticas manipuladas no município de Jundiá -SP. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, v. 3, n. 5, p. 2-14, 2011.

FLORENCIO, R.N, SANTIAGO, M., LIMA, E.N., CABRAL, A.G.S. **Determinação in vitro do fator de eficácia fotoprotetora (fps) em extrato de matricaria recoita I**. Associação Caruaruense de Ensino Superior, Av. Portugal, 584, Bairro Universitário- Caruaru - PE - Brasil, 2016 Disponível em:

<http://repositorio.asc.es.edu.br/handle/123456789/651?mode=full> Acesso em: 18 out 2022.

GOMES, E.S.S, SAMPAIO, J.S., SILVA, A.L.S., COSTA, S.C.C., REIS, I.M.A. Avaliação do fator de proteção solar (fps) in vitro do extrato etanólico das folhas de *Psidium guajava* (MYRTACEAE), **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3 n. 3, p. 1-8, 2022.

GONÇALVES, T. ALMEIDA, A.C., LOUCHARD, B.O. **Fotoprotetor: Desenvolvimento, Estudo de Estabilidade Preliminar e Avaliação in vitro do Fator de Proteção Solar (FPS)**. Infarma: Ciências farmacêuticas, 2017.

HENRIQUE, A.S; Lopes, G.C. A biodiversidade e a indústria de cosméticos: o uso dos flavonoides contra o envelhecimento cutâneo, *Revista UNINGÁ Review*, v. 29, n.2, p. 58-63, 2017.

KOTWISKI, F.O. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de creme hidratante à base de azeite de dendê (*Elaeis guineensis*), Faculdade Maria Milza, 2019. Disponível em: <http://famaportal.com.br:8082/jspui/handle/123456789/1620> Acesso em: 30 out. 2022

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

MANSUR, J. S., BREDER, M.N.R., MANSUR, M.C.A, AZULAY, R.D. **Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por**

espectrofotometria. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.61, p.167-172, 1986.

PANONTIN, J.F, CANTUÁRIO, P.L.B., CASTRO, I.P.M., OLIVEIRA JUNIOR, R.A.C., SILVA, P.F., SANTOS, W.C.C., LUCIAN, S.C. Avaliação da atividade despigmentante do extrato hidroetanólico da casca do fruto do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) / Evaluation of the depigmenting activity of the hydroetanolic extract of jatobá fruit (*Hymenaea stigonocarpa*), **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 98742-98748, 2020.

PAPE, W. J. W., PFANNENBECKER, U., ARGEMBEAUX, H., BRACHER, M., ESDAILE, D.J., HAGINO, S., KASAI, Y., LEWIS, R.W. COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. **Present status. Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 343-354, 1999.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** [Dissertação de mestrado], Universidade de São Paulo, São Paulo, 74f, 1996. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-03112011-144830/publico/Ricardo_Gomide_Woisky_do_Rio_Mestrado.pdf Acesso em: 20 out. 2022.

ROSARIO, M.C, GAUTO, M.I.R., SILVA, A.C.L.N, SALES, J.S., PEREIRA, F.S., SANTOS, E.P., RICCI JUNIOR, E., COSTA, M.C.P. Estudo de estabilidade de emulsão cosmética com potencial de creme hidratante para o tratamento da xerose cutânea utilizando o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata martius*). **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p. 29552-29570, 2021.

SANTOS, D.J.M., **Desenvolvimento de xampu à base de extrato glicólico de Hamamelis virginiana L. para auxiliar no tratamento da oleosidade capilar e na prevenção do acometimento de caspas,** LUZ - MG, 2017.

SCHORRO, J. R. S., SILVA, T.P., TEODORO, E.I.S., CHIERRITO, D., TESTON, A.P.M., MELLO, J.C.P., ARAÚJO, D.C.M. Influência de diferentes ativos em formulações de produtos dermocosméticos com fator de proteção solar. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 29741-29754, 2020.

SILVA, A.I.B., SÁ-FILHO, G.F., OLIVEIRA, L.C., GUZEN, F.P., CAVALCANTI, J.R.L.P., CAVALCANTE, J.S. Perfil fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do *Croton Blanchetianus*, **Rev. Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n.1, P. 134-142, 2021.

SILVA, F.C. RIVEIRO, A.B., RIBEIRO, P.R.S. Avaliação da qualidade de plantas medicinais comercializadas no município de Imperatriz, Maranhão, **Rev. Scientia Plena**, v. 13, n. 02, p. 024501-1 - 024501-9, 2017.

SILVA, N.L. ARAÚJO, I.P.C., BATISTA, M.R.F., SANTOS, T.B.A., FERNANDO, W.L., AMARAL, F.R. Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis lam* obtidos por decocção. **Conexão Ci.**, v. 12, n.1, p. 46 -53, 2017.

SILVA, S., SATO, A., LAGE, C.L.S., SAN GIL, R.A.S., AZEVENDO, D.A., ESQUIBEL, M.A. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. in vitro Produced under the Influence of Growth Regulators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1388-1390, 2005.

SINGLETON, V.L., Rossi JR, J. A. Colorimetry of totalphenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagentes. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, p. 144- 158, 1965.

SIQUEIRA, J. C. **Avaliação da estabilidade de uma emulsão cosmética cold cream contendo diferentes tipos de ceras.** [Trabalho de Conclusão de Curso] UNIVATES, 2016. Disponível em: <https://www.univates.br/bduserver/api/core/bitstreams/4451b042-6d3e-44ea-bbfc-61bcde0ef4a3/content> Acesso em: 29 out. 2022.

TESKE, M.; Trentini, A.M. **Herbarium : compêndio de fitoterapia.** 4º ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 2001. 317p Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=297473&biblioteca=vazio&bu> sca=autoria:%22A%22&qFacets=autoria:%22A%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=388 3 Acesso em: 02 nov. 2022.

VIEIRA, I. R. S., SALES, J.S., CERQUEIRA-COUTINHO, C.,S., HELLMANN, T., SOUSA, B.F.S., LOPES, J.T., CAMARA, A.L., COSTA, M.C.P., RICCI-JÚNIOR, E., SANTOS, E.P. Development and in vivo evaluation of the moisturizing potential of cosmetic formulations containing Babassu (*Orbignya phalerataMartius*) oily extract. **Journal of Biomedical and Biopharmaceutical Reseach**, v. 14, p. 204-219, 2017.

VIEIRA, L. M., CASTRO, C.F.S.1; DIAS, A.L.B.1; SILVA, A.R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae), **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n.4, p.521-527, 2015.

VINHA, A.F., COSTA, A., SANTOS, A., HERDEIRO, M.T., MACHADO, M. Estudo da composição de fitoquímicos bioativos em plantas medicinais portuguesas, **Egitania Scientia**, v. 1, p. 233-249, 2013.