



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102019014888-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102019014888-8

(22) Data do Depósito: 19/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 02/02/2021

(51) Classificação Internacional: A61K 8/97; A61Q 17/04.

(52) Classificação CPC: A61K 8/97; A61Q 17/04.

(54) Título: FORMULAÇÕES COSMÉTICAS FOTOPROTETORAS CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO DAS FIBRAS DA CASCA DO COCOS NUCIFERA L. (PALMAE)

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Pessoa Jurídica. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA GOULART; MÔNICA BEZERRA DOS SANTOS OLIVEIRA; ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA; JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS; JAMYLLE NUNES DE SOUZA FERRO; TAUANE DOS SANTOS ROCHA; IARA BARROS VALENTIM; EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 19/07/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 15/07/2025

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

RELATÓRIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO DE
**“FORMULAÇÕES COSMÉTICAS FOTOPROTETORAS CONTENDO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FIBRAS DA CASCA DO *COCOS NUCIFERA* L.
(PALMAE)”**

[001] A invenção consiste na elaboração de formulações cosméticas fotoprotetoras contendo extrato etanólico obtido a partir das fibras da casca do coco da variedade anão amarelo.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[002] A exposição crônica à radiação ultravioleta (UVA e UVB) tem efeitos pronunciados sobre a pele, pode causar o estresse oxidativo (EO), ocasionando danos celulares, alterações cutâneas relacionadas ao processo de envelhecimento prematuro e até desenvolvimento de câncer de pele. A radiação UVB (280-320 nm) é mais energética que a UVA (320-400 nm), possui um menor poder de penetração na pele, entretanto, os seus efeitos sobre a pele são mais prejudiciais, pois afetam a camada epidérmica da pele e estão associados à disfunção imunológica, quadro de eritema e queimaduras solares, desencadeando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzindo diretamente danos ao DNA. Já a radiação UVA apresenta um poder de penetração maior sobre a pele, e consequentemente, é responsável pelo fotoenvelhecimento cutâneo e câncer de pele (SUVA, 2014; AFAQ et al., 2011; HALLIDAY et al., 2008).

[003] A preocupação em proteger a pele frente às manifestações causadas pelas radiações UV, tem aumentado nos últimos anos. Diversas medidas preventivas têm sido utilizadas contra os efeitos danosos causados pelos raios solares, tais como, o uso de chapéu, óculos específicos para proteção solar, vestimentas especiais, exposição segura ao sol e o uso frequente de fotoprotetores. Atualmente, o uso de protetores solares é a alternativa mais eficaz contra os efeitos danosos causados pelos raios UV, inclusive contra o câncer de pele e envelhecimento precoce da pele (MANAIA et al., 2013).

[004] Os protetores solares apresentam em sua composição substâncias denominadas como filtros solares. Segundo Flor e colaboradores (2007), as substâncias fotoprotetoras são classificadas em inorgânicas (filtros físicos) e orgânicas (filtros químicos). Os agentes inorgânicos ou físicos atuam como barreira formada pelo filme sobre a pele, refletindo, dispersando ou absorvendo os raios UV. Os compostos ZnO_2 e TiO_2 representam as substâncias inorgânicas fotoprotetoras comerciais e apresentam amplo espectro de proteção contra as radiações UV (CABRAL et al., 2013). Os agentes orgânicos ou filtros químicos são substâncias hidro ou lipossolúveis que protegem a pele, via absorção da radiação UV de alta energia, com liberação da energia na forma de calor. Esses agentes são compostos aromáticos conjugados com grupos carbonilas e, geralmente, possuem grupos funcionais doadores de elétrons (metoxila e amina), situados nas posições *orto* ou *para* do anel aromático. Podem ser sintéticos (benzofenona-3) ou naturais (constituintes químicos de óleos e extratos vegetais) (COSTA et al., 2015).

[005] Os filtros solares podem proteger a pele nas regiões UVA, UVB e em ambas as radiações como, por exemplo, a benzofenona-3, também conhecida como oxibenzona ou 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, que é um dos filtros comerciais de amplo espectro mais empregados em preparações protetoras. Na aplicação tópica de filtro solar, é necessário que o mesmo permaneça nas camadas mais superficiais da pele, afim de garantir a proteção máxima, sem que ocorra exposição sistêmica. No entanto, filtros como a benzofenona-3 podem penetrar através da barreira epidérmica e causar dermatites de contato (NADEROST et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2017).

[006] Nos últimos anos diversas publicações têm demonstrado o potencial de princípios ativos naturais como os extratos vegetais, que devido à composição química das plantas, na maioria das vezes, apresentam constituintes bioativos como os compostos fenólicos, em particular os flavonóides, que possuem ação antioxidante aliada à ação fotoprotetora. Esses compostos possuem a capacidade de absorver um amplo espectro de radiação UV, diminuindo assim

a penetração dessas radiações na pele, minimizando os efeitos nocivos envolvidos nos processos de envelhecimento precoce, além de capturar as espécies reativas de oxigênio (EROs) gerados pelos raios UV, causados pela exposição excessiva ao sol (SAEWAN et al., 2013; STEVANATO et al., 2014; ZILLICH et al., 2015).

[007] *Cocos nucifera* L. é uma planta nativa de países tropicais e pertence à família Arecaceae (HOODA et al., 2012, LIMA et al., 2015). No Brasil, diferentes variedades são encontradas e estão amplamente distribuídas no litoral nordestino, como o gigante e o anão, sendo este composto por cultivares de cor amarela, verde e vermelha (DEBMANDAL et al., 2011).

[008] A fibra de casca de coco é um subproduto do processamento de *Cocos nucifera* e é constituída de componentes químicos como celulose, hemicelulose, lignina, pentosanas e compostos fenólicos (ESQUENAZI et al., 2002; SILVA et al., 2013). Assim como as outras partes do coco, as fibras podem ser empregadas em diversas áreas. Segundo Lima e colaboradores (2015), nos países asiáticos considerados os maiores produtores de coco do mundo, as fibras são empregadas na agricultura, na indústria e na medicina tradicional, para o tratamento de várias condições patológicas (na amenorreia, asma, doenças venéreas, tratamento da diabetes e como antipirético). De acordo com Esquenazi e colaboradores (2002), no Brasil, a decocção das fibras de coco é utilizada na medicina popular do Nordeste nos tratamentos de afecções como a diarreia e artrite.

[009] Estudos recentes realizados para a caracterização fitoquímica das fibras da casca de coco, demonstraram a presença de compostos fenólicos como, ácido 4-hidroxibenzóico, catequina, epicatequina, rutina, kaempferol, ácido vanílico, ácido gálico e ácido ferúlico (ESQUENAZI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013, VALADEZ-CARMONA et al., 2016). Estes constituintes exercem importantes atividades biológicas, tais como, antimicrobiano (AKYNIELE et al., 2011; SILVA et al., 2013), anti-inflamatório (SILVA et al., 2013), antiviral (ESQUENAZI et al., 2002), antifúngico, antiplasmodial (ADEBAYO et al., 2012),

sequestrador de radicais (ALVIANO et al., 2004), leishmanicida (MENDONÇA-FILHO et al., 2004) e antineoplásico (KOSHEK et al., 2007), antioxidante (ESQUENAZI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013).

[010] Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o extrato etanólico das fibras das cascas de coco da variedade anão amarelo apresentou um elevado poder antioxidante, e, em estudos preliminares sobre a composição fitoquímica do extrato, foi detectada a presença dos compostos fenólicos quercetina e catequina (OLIVEIRA et al., 2013). De acordo com a literatura esses compostos são capazes de reduzir a excessiva absorção de raios UV, envolvidos nos processos de fotoenvelhecimento e câncer de pele (SAWEAN et al., 2013). A variedade do coco anão amarelo também tem sido estudada por outros autores, De Freitas e colaboradores (2017), avaliaram o potencial antioxidante do extrato hidroetanólico da fibra da casca do coco anão amarelo e aplicaram em uma formulação cosmética do tipo máscara facial com ação antioxidante. Segundo os autores, as propriedades antioxidantes do extrato foram atribuídas à presença dos compostos fenólicos catequina e ácido clorogênico. Na presente invenção, o extrato etanólico das fibras da casca do coco anão amarelo foi aplicado em uma formulação cosmética tipo creme com ação fotoprotetora e antiglicante (propriedades biológicas ainda não relatadas na literatura para tal amostra), além da ação antioxidante já comprovada. Assim, até o presente momento a elaboração de um produto com extrato etanólico da fibra da casca do coco anão amarelo como ingrediente ativo em formulações fotoprotetoras ainda não foi documentado.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[011] A presente invenção refere-se à elaboração de formulação fotoprotetora de uso tópico, preparada a partir da incorporação do extrato etanólico das fibras da casca de coco da variedade anão amarelo, possuindo bioativos com ação protetora da pele contra os danos causados pelos raios ultravioleta (UVB). E, ainda, esse extrato possui atividades biológicas como antioxidante,

antiglicante, sem apresentar citotoxicidade, podendo atuar nas áreas cosméticas e/ou farmacêuticas.

ESTADO DA TÉCNICA

[012] No mercado há uma grande quantidade de filtros solares com substâncias sintéticas e são poucos os filtros comerciais encontrados com extratos de produtos naturais como, plantas, frutas e resíduos. Tais resíduos como, cascas, bagaços e sementes são provenientes das indústrias de alimentos e agrícolas, apresentando em sua composição compostos bioativos que exercem uma variedade de atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, antimalárica, antioxidante, fotoprotetora e antiglicante.

[013] O documento PI09018822-0 A2 descreve a elaboração de formulações cosméticas contendo extratos hidroetanólicos de *Cynara scolymus* e/ou *Echinacea purpúrea* com a finalidade fotoprotetora UVA/UVB e um estabilizante sintético e/ou filtros solares sintéticos. No documento BR 102015032464-2 A2, descreve-se o uso do extrato etanólico de *Passiflora cincinnata* em formulações de uso tópico, como ingrediente ativo na atividade fotoprotetora.

[014] No documento BR 102015013241-7 A2, relata-se a elaboração de uma formulação cosmética contendo extrato seco hidroalcoólico de própolis vermelha, destinada à proteção da pele contra os danos causados pela radiação solar.

[015] Nesse contexto, a fibra da casca do *Cocos nucifera* L., um subproduto proveniente da indústria do processamento de coco, apresenta em sua composição compostos como fenóis, flavonóides, taninos, triterpenos e alcalóides. Após investigação em nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2013), foi verificado que a fibra da casca do coco anão amarelo apresenta em sua composição química, flavonóides como a quercetina e a catequina, compostos esses capazes de reduzir a excessiva absorção de raios UV. O

extrato etanólico das fibras de coco pode ser considerado promissor para a elaboração de formulações cosméticas fotoprotetoras.

[016] Diante do exposto, um creme fotoprotetor contendo extrato da fibra da casca do coco da variedade anão amarelo foi elaborado visando proteção contra os danos dos raios UVB. Tal creme pode agregar valor à enorme quantidade de resíduos gerados pelas indústrias de coco, evitando o desperdício e a poluição do meio ambiente. Até o presente momento, desconhecemos a existência de formulações com esse extrato, em relação ao seu perfil fotoprotetor.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[017] A exposição crônica a radiações UV tem efeitos pronunciados sobre a pele, pode causar o estresse oxidativo (EO), ocasionando danos celulares, alterações cutâneas relacionadas ao processo de envelhecimento prematuro e até câncer de pele. A preocupação em proteger a pele tem aumentado cada vez mais. Diversas medidas preventivas têm sido utilizadas contra os efeitos danosos causados pelos raios solares. O uso de protetores solares é a alternativa mais eficaz. Na aplicação de filtro solar de uso tópico, é necessário que o mesmo permaneça nas camadas mais superficiais da pele, afim de garantir a proteção máxima, sem que ocorra exposição sistêmica. No entanto, filtros sintéticos comerciais podem penetrar através da barreira epidérmica e causar dermatites de contato. Nos últimos anos, diversas publicações têm demonstrado o potencial de princípios ativos naturais principalmente aqueles que apresentam compostos fenólicos em sua composição. Estes compostos possuem propriedades farmacológicas, e exibem ação sobre os sistemas biológicos, com efeitos anti-inflamatório, antiviral, antialérgico, anticancerígeno, citotóxico, antioxidante, antiglicante e fotoprotetor. Nesse sentido, a presente invenção preparada com extrato vegetal que possui compostos bioativos, não citotóxicos, em sua composição, surge como alternativa ou complemento à utilização dos filtros comerciais disponíveis, pois, além de promover a proteção cutânea contra as radiações UV, pode neutralizar a ação dos radicais devido

sua ação antioxidante e também atuar como antiglicante, inibindo reações de glicação de proteínas que estão relacionados ao processo de envelhecimento precoce da pele, como, por exemplo, o colágeno, proteína responsável pela sustentação da pele. Pode, ainda, favorecer a diminuição do ativo sintético comercial, evitando a exposição da pele às possíveis reações causadas por esses agentes.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[018] **Figura 1.** Efeito do Extrato etanólico anão amarelo (EEAA), na viabilidade de linhagem de macrófagos J774 usando o método de MTT. As células foram tratadas com EEAA (10, 50 ou 100 µg / mL) e expostas por 24 h. Os dados foram expressos como % de viabilidade celular e representados como média ± desvio-padrão. O controle negativo foi o solvente usado para dissolver os extratos.

[019] **Figura 2.** Espectros de absorção no UV-vis das formulações Creme + Extrato etanólico anão amarelo (EEAA) 5, 10 e 20% (2 mg/mL), Creme + benzofenona-3 a 5% (CB5) (0,2 mg/mL), Creme + quercetina a 5% (CQ5) (0,2 mg/mL) e Creme Lanette (CL).

[020] DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[021] A presente tecnologia descreve o processo de avaliação do extrato etanólico obtido a partir da fibra da casca de *Cocos nucifera* Linnus e sua aplicação como um ingrediente ativo em formulações fotoprotetoras, aliada a ações antioxidante e antiglicante, consistindo das seguintes etapas:

- a) Obtenção do extrato etanólico;
- b) Avaliação do Conteúdo total de fenóis (CTF);
- c) Avaliação da capacidade antioxidante;
- d) Avaliação da atividade antiglicante;
- e) Ensaio de viabilidade celular;
- f) Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* do extrato etanólico;
- g) Preparação das formulações fotoprotetoras;

h) Avaliação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* das formulações.

i) Análises estatísticas

[022] A seguir, as etapas são descritas de maneira mais detalhada:

[023] Obtenção do extrato etanólico:

[024] As fibras das cascas de *Cocos nucifera* L. da variedade anão amarelo (em estágio maduro) foram coletadas em Maceió – AL. A planta foi identificada e a amostra foi depositada no herbário do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas

[025] As fibras foram secas a uma temperatura de 40 °C, e transformadas em pó em triturador de faca forrageira. O extrato etanólico do pó (400 g) foi preparado por percolação com 6 L de etanol, ficando em contato por 3 dias (72 h). Este processo se repetiu por duas vezes. O filtrado foi recolhido e concentrado em rotaevaporador a 35 °C, obtendo-se o extrato seco etanólico das fibras das cascas de coco da variedade anão amarelo codificado como (EEAA), armazenado em frascos de vidro âmbar e mantido sob sistema de refrigeração a 5°C.

Conteúdo total de fenóis (CTF)

[026] O conteúdo total de fenóis foi determinado, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (FC). O EEAA foi diluído em etanol, obtendo-se a concentração de 10 µg/mL. Em tubos de ensaio, foram colocadas alíquotas de 120 µL dos extratos com 180 µL de água Milli-Q. Em seguida, foram adicionados, 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) e, após 2 min, 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v) totalizando um volume de 3 mL. Os tubos foram agitados em um vórtex e mantidos no escuro em banho-maria a uma temperatura de 40 °C por 20 min. Em seguida, uma alíquota de 3 mL da amostra foi colocada em cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) e medida da absorvência a 760 nm, usando um espectrofotômetro (UV - vis modelo Mutispec-1501 Shimadzu, Japão). O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 120 µL de etanol como branco.

[027] O conteúdo total de fenóis (CTF) foi obtido após construção de uma curva analítica, preparada a partir da solução etanólica do padrão fenólico ácido gálico ($1,12 - 10,53 \text{ mg L}^{-1}$), construída a partir do programa Origin 8.0, e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama do extrato (mg de EAG/g do extrato seco).

[028] A Capacidade antioxidante foi determinada através dos seguintes métodos: sequestro do radical DPPH[•] e pelo método de redução de ferro III – FRAP.

Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH[•]

[029] A capacidade antioxidante do EEAA foi determinada usando método já conhecido. A solução etanólica do EEAA foi preparada na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. No preparo das misturas reacionais foram utilizados 300 μL da solução da amostra e 2,7 mL da solução metanólica de DPPH[•] a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. A avaliação da capacidade antioxidante foi determinada monitorando-se a redução do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina), através da medida do decréscimo da absorvência a 516 nm, em espectrofotômetro (UV-vis modelo Multispec – 1501 Shimadzu, Japão). A percentagem da atividade sequestradora de radicais (ASR) do extrato foi calculada utilizando-se o valor absorvência no tempo reacional de 30 minutos, utilizando a equação 1:

Equação 1: $\% \text{ ASR} = [(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100.$

[030] Onde: $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvência inicial da solução metanólica de DPPH[•] e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvência da mistura reacional (DPPH[•] + amostra). As reações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como % ASR média $\pm$ desvio padrão.

[031] necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH[•]), avaliada para os extratos, foi obtida graficamente através da curva de calibração na faixa ($1,5 - 13 \mu\text{g mL}^{-1}$), da concentração *versus* o percentual de

inibição correspondente. A curva foi construída a partir do programa Origin 8.0 e os ensaios foram realizados em triplicata.

Capacidade antioxidante pelo método de redução de ferro III – FRAP

[032] O ensaio de FRAP foi baseado em um método já conhecido. Foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 90 μL da solução do extrato etanólico ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, que foi preparado no momento da análise, por meio da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL da solução de 2,4,6-tris(2-piridil)-5-triazina (TPTZ) (10 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Em seguida, os tubos com tampas foram agitados em um vórtex, e estes foram mantidos em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos. As medidas de absorvência foram realizadas em espectrofotômetro (UV-vis modelo Multispec – 1501 Shimadzu, Japão) a 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco. Utilizou-se o padrão Trolox para a construção da curva de analítica ($0,15 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) e os resultados foram expressos em μmol de equivalentes trolox (ET)/ g do extrato seco.

[033] A avaliação da atividade antiglicante foi determinada utilizando-se os seguintes sistemas: BSA do inglês (Bovine Serum Albumin)- Glicose/Frutose; BSA- MG (metilglioxal); Colágeno – Glicose/Frutose.

Sistema BSA - Glicose/Frutose:

[034] Inicialmente, foram preparadas soluções de BSA (3 mg mL^{-1}), glicose (200 mM), frutose (200 mM) e as soluções do EEAA ($1-33 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para a determinação do IC_{50} foram preparadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, com azida de sódio 0,02%). O sistema consistiu na adição de 500 μL da mistura de glicose e frutose, 500 μL das diferentes concentrações das amostras, e em seguida, foram adicionados 500 μL da solução de BSA. Os sistemas reacionais foram incubados a 37 °C, com agitação constante durante 7 dias. O tampão fosfato (pH 7,4) foi utilizado como controle negativo e a aminoguanidina ($2,5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicata e a intensidade de fluorescência, medida a 37 °C,

utilizando um espectrofluorímetro RF- 5301PC (Shimadzu, Japão) a ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ e $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm). O IC_{50} foi calculado graficamente, usando uma curva de calibração, traçando porcentagem de inibição correspondente (I%) *versus* a concentração do extrato. A porcentagem de inibição dos AGEs foi calculada utilizando a seguinte equação 2:

Equação 2: fórmula: $I\% = (F_{\text{controle negativo}} - F_{\text{controle experimental corrigida}} / F_{\text{negativo}}) \times 100$

[035] Onde o $F_{\text{controle negativo}}$ é a fluorescência para o controle negativo e $F_{\text{experimental corrigida}}$ é a fluorescência do sétimo dia subtraída da fluorescência do primeiro dia.

Sistema BSA- MG:

[036] Soluções de metilgloxal (1,5 mM), BSA (3 mg mL⁻¹) e do EEAA, (1–33 µg mL⁻¹) para a determinação do IC_{50} foram preparadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, com azida de sódio 0,02%). O sistema consistiu na adição de 500 µL da solução de metilgloxal (1,5 mM) a 500 µL da solução das amostras em diferentes concentrações e mantidas a 37 °C, por 1 hora, no escuro. Em seguida, adicionou-se BSA (3 mg mL⁻¹) em cada sistema. Os sistemas reacionais foram incubados no escuro a 37 °C, com agitação constante durante 2 dias. O tampão fosfato (pH 7,4), foi utilizado como controle negativo e a aminoguanidina (1,5 – 50 µg mL⁻¹), como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando um espectrofluorímetro RF- 5301PC (Shimadzu, Japão) a ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm). O IC_{50} foi calculado graficamente, usando uma curva de calibração, traçando porcentagem de inibição correspondente (I%) *versus* a concentração do extrato. A porcentagem da inibição de formação de produtos de glicação avançada (AGEs) foi calculada, usando a mesma fórmula do sistema BSA-glicose/frutose.

Sistema Colágeno – Glicose/Frutose:

[037] Soluções de colágeno (3 mg mL⁻¹), glicose (200 mM), frutose (200 mM) e do EEAA (1–25 µg mL⁻¹) para a determinação do IC_{50} foram preparadas em

tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, com azida de sódio 0,02%). O sistema consistiu na adição de 500 µL da mistura de glicose e frutose, 500 µL das diferentes concentrações das amostras, e em seguida, foram adicionados 500 µL da solução de colágeno hidrolisado. POs sistemas reacionais foram incubados a 37 °C, com agitação constante durante 7 dias. O tampão fosfato (pH 7,4) foi utilizado como controle negativo e a aminoguanidina (5–200 µg mL⁻¹), como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicatas e a intensidade de fluorescência a 37 °C, utilizando um espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão) a ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ e $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm). O IC₅₀ foi calculado graficamente, usando uma curva de calibração, traçando porcentagem de inibição correspondente (I%) *versus* a concentração do extrato. A porcentagem da inibição da formação de AGEs foi calculada usando a mesma fórmula do sistema BSA-glicose/frutose.

Ensaio de viabilidade celular

[038] O efeito citotóxico do extrato etanólico das fibras da casca de coco anão amarelo (EEAA) foi investigado frente à linhagem de macrófagos (J774) por meio do ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com a metodologia descrita por MOSMANN (1983). O ensaio se baseia na redução celular do sal MTT em cristais de formazana de coloração violeta, pela ação da enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis. Assim, a quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. As células de macrófagos foram, inicialmente, distribuídas em placas de 96 poços (1,5 x 10⁵ células/poço) e incubados durante a noite a 37 °C. Após esse período, as células aderentes foram tratadas com EEAA em diferentes concentrações (10, 50 e 100 µg mL⁻¹) dissolvidos em PBS + DMSO (0,037% (m/v)) em meio de cultura (RPMI – 1640 suplementado com 10% (m/v) de soro bovino fetal) e foram posteriormente cultivados durante 24 h a 37 °C. Em seguida, o meio foi substituído por novo meio RPMI contendo 5 mg mL⁻¹ de MTT. Após 4 h de incubação a 37 °C, o sobrenadante foi removido e 150 µL de DMSO foi

adicionado em cada poço. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a absorvência do produto de formazana foi medida espectrofotometricamente a 540 nm. Quatro poços individuais foram avaliados por tratamento e a atividade de redução do MTT foi determinada como percentagem de células controle ([absorvência de células tratadas/absorvência de células não tratadas] x 100).

Avaliação do Fator de proteção solar (FPS) in vitro do extrato:

[039] O fator de proteção solar do EEAA foi determinado de acordo com o método descrito por Mansur e colaboradores (1986), com modificações. Foi preparada solução estoque do extrato bruto (0,1 g mL⁻¹) em etanol P.A. e obtidas diluições nas concentrações de 0,2; 2; 5; 10 e 15 mg/mL. Após esse procedimento, foi realizada a leitura das amostras em triplicata em espectrofotômetro (UV-vis modelo Multispec – 1501 Shimadzu, Japão), na faixa de 290 – 320 nm, com intervalos de leitura de 5 nm. O etanol foi utilizado como branco. Os valores de FPS dos extratos e formulações foram calculados, utilizando equação 3:

$$\text{Equação 3:} \quad FPS = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

[040] Sendo, FC = fator de correção (igual a 10), EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ), I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ) e Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorvência da solução proposta como filtro solar.

[041] A relação entre EE x I apresenta valores constantes em cada comprimento de onda descrita por SAYRE et al., (1979).

[042] Preparo das formulações com extrato etanólico e avaliação do FPS in vitro:

[043] Para o preparo das formulações, o EEAA foi solubilizado em etanol P.A até a completa dissolução, em seguida, foi incorporado ao creme base Lanette (adquirido em farmácia de manipulação do mercado local) com o auxílio de um gral de porcelana e pistilo, variando as concentrações de 5 e 20% (m/m) Da

mesma maneira, formulações foram preparadas contendo padrão químico comercial benzofenona-3 ou padrão fenólico quercetina, ambos na concentração a 5%, para fins de comparação. Assim, cinco formulações foram preparadas e codificadas como: CE5 (creme + extrato a 5%), CE10 (creme + extrato a 10%), CE20 (creme + extrato a 20%), CB5 (creme + benzofenona-3 a 5%) e CQ5 (creme + quercetina a 5%). As formulações foram colocadas em recipientes apropriados e armazenadas à temperatura ambiente. Após 24 horas, as formulações seguiram para análises posteriores. A metodologia utilizada para as medidas de FPS das formulações foi a mesma descrita para o cálculo de FPS do extrato. O creme Lanette foi utilizado como branco. As análises foram realizadas em triplicata.

Análises estatísticas

[044] Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A avaliação estatística foi realizada por análise de variância ANOVA seguida de teste Tukey, ao nível de significância de 95%, empregando o software Graphpad Prism 5.

RESULTADOS OBTIDOS

Rendimento da extração:

[045] O extrato etanólico das fibras da casca de coco anão amarelo foi obtido por meio de extração por maceração e posterior secagem para a eliminação do solvente. Após a preparação, o extrato foi codificado como EEAA e apresentou um rendimento de 7,75%. Este valor foi obtido a partir da massa inicial submetida à extração (400 g) em relação ao extrato etanólico seco obtido.

Conteúdo total de fenóis e capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e ao método de FRAP.

[046] No presente trabalho, o conteúdo total de fenóis foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu e a determinação da capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH• e FRAP.

[047] A partir dos resultados obtidos presentes na Tabela 1, pode-se observar que o EEAA apresentou alto valor de CTF, 673,9 EAG/g extrato seco. A determinação da capacidade antioxidante também foi avaliada. Para o ensaio de DPPH[•], o EEAA apresentou um percentual de inibição de 74,9% e valor de IC₅₀ de 6,6 µg mL⁻¹. Já no ensaio de FRAP, o EEAA apresentou um valor de 3287,0 µmol ET g⁻¹ de extrato seco. A alta capacidade antioxidante presente no extrato pode ser bastante eficaz contra o dano oxidativo na pele, sendo, portanto, matéria prima valiosa para produção de cosméticos fotoprotetores.

Tabela 1. Conteúdo total de fenóis (CTF), DPPH[•] (ASR% e IC₅₀) e FRAP do EEAA.

Extrato	CTF (mg EAG*/g extrato seco)	DPPH [•]		FRAP (µmol ET/g *** extrato seco)
		ASR %**	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
EEAA	673,9 ± 37,01	74,9 ± 0,40	6,6 ± 0,60	3287,0 ± 134,01

*Equivalente de ácido gálico. ** Atividade sequestradora de radicais (DPPH[•]). *** equivalente de Trolox (ET)

Avaliação da atividade antiglicante.

[048] Os ensaios antiglicantes avaliam o potencial de extratos em inibir a formação de produtos de glicação avançada (AGEs), gerados a partir da reação de glicação de proteínas, que estão relacionados a diversas doenças e ao estresse oxidativo e carbonílico. Para tal, a determinação da capacidade antiglicante para o EEAA foi avaliada por dois sistemas diferentes, o primeiro envolvendo o estágio inicial de glicação induzida por glicose/frutose. O segundo sistema envolve o processo de glicação no estágio intermediário, induzido por metilglioxal (MG).

[049] Conforme mostrado na Tabela 2, para o sistema BSA-Glicose/Frutose, verificou-se que o EEAA apresentou maior atividade inibitória, com IC₅₀ no valor de 9,61 µg mL⁻¹, quando comparado com o IC₅₀ de 18,3 µg mL⁻¹, obtido para aminoguanidina que é um padrão com ação antiglicante já conhecido na literatura (THORNALLEY et al., 2003). O mesmo foi observado para o sistema

Colágeno-Glicose/Fructose, onde o EEAA apresentou um valor de IC_{50} de $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a aminoguanidina com $82,87 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, para o sistema BSA-MG, o EEAA não atingiu o 50% de inibição na concentração estudada. Neste caso, foi calculado o valor de IC_{30} que foi $34,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o EEAA, e de $13,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a aminoguanidina.

[050] Os resultados apresentados para o EEAA, demonstram o potencial desse extrato em prevenir reações de glicação, e proteger proteínas como o colágeno, que é responsável pela sustentação e elasticidade da pele, sugerindo a aplicação desse extrato como ingrediente ativo em formulações cosméticas anti-idade para pele.

Tabela 2. Efeitos de inibição do EEAA e aminoguanidina sobre a formação de AGEs, induzida por Glicose/Fructose e metilglioxal.

Tratamento	Induzido		
	BSA - Glicose/Fructose IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	BSA - Metilglioxal IC_{30} ($\mu\text{g/mL}$)	Colágeno- Glicose/Fructose IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EAA	9,61	34,76	4,5
Aminoguanidina	18,3	13,19	82,87

Ensaio de viabilidade celular

[051] A citotoxicidade é um fator de grande relevância na avaliação da segurança e eficácia dos produtos desenvolvidos. Assim, um teste preliminar da avaliação da viabilidade celular foi realizado para determinar o efeito citotóxico do EEAA em diferentes concentrações (10, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$). A viabilidade celular na presença de EEAA em macrófagos murinos J774, células protetoras do sistema imune, durante 24 horas foi medida, usando o teste MTT.

[052] Na Figura 1 é possível observar que o tratamento das células com extrato não diminuiu a viabilidade celular e não exerceu efeito citotóxico

Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) do extrato etanólico e formulações.

[053] Os valores de FPS obtidos para o extrato da fibra da casca do coco e as formulações protetoras variaram em função da concentração e dos percentuais de extrato incorporado ao creme base. Conforme listado na Tabela 3, o EEAA apresentou valores de FPS que variaram de 9,99 a 28,18; já as formulações protetoras preparadas a partir da incorporação do EEAA a 5, 10 e 20% apresentaram valores de FPS que variaram de 0,82 a 31,89. O extrato e respectivas formulações apresentaram bons valores de FPS, quando comparados com resultados obtidos com o padrão quercetina (CQ5) e benzofenona-3 (CB5), que apresentaram valores de FPS variando de 2,88 a 30,09 e 9,76 a 35,90, respectivamente.

Tabela 3. Fator de proteção solar (FPS) do extrato etanólico e formulações.

Amostras	Diluições (mg/mL)				
	0,2	2	5	10	15
EEAA	9,99 ± 0,17 ^c	20,95 ± 1,03 ^b	28,18 ± 1,98 ^a	24,74 ± 0,84 ^{ab}	23,00 ± 0,57 ^b
CE5	0,98 ± 0,35 ^c	4,44 ± 0,14 ^c	15,66 ± 0,40 ^a	30,04 ± 1,73 ^b	28,46 ± 1,28 ^b
CE10	1,14 ± 0,04 ^d	7,02 ± 0,23 ^c	23,78 ± 1,22 ^b	28,22 ± 3,58 ^a	31,87 ± 3,01 ^a
CE20	0,82 ± 0,58 ^c	16,33 ± 3,97 ^b	28,31 ± 2,47 ^a	29,62 ± 2,83 ^a	30,20 ± 2,55 ^a
CB5	9,76 ± 1,24 ^c	33,09 ± 2,69 ^a	35,90 ± 0,90 ^a	33,73 ± 0,21 ^a	28,31 ± 3,61 ^b
CQ5	2,88 ± 0,13 ^c	21,57 ± 1,91 ^b	30,09 ± 3,18 ^a	30,02 ± 1,76 ^a	29,81 ± 1,60 ^a

EEAA = extrato etanólico anão amarelo, CE = creme + extrato etanólico de 5 a 20% (m/m), CB5 = creme + benzofenona-3 a 5% (m/m) e CQ = creme + quercetina a 5% (m/m). Resultados expressos como média ± desvio padrão. O nível de significância foi p < 0,05. Tukey: letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes para a mesma concentração.

[054] De acordo com a agência reguladora brasileira Anvisa RDC no. 30/2012 (Anvisa, 2012), para que uma formulação possa ser considerada fotoprotetora, é necessário que o valor mínimo de FPS seja ≥ 6 . Analisando os resultados, observou-se que os valores de FPS do extrato e formulações podem ser considerados satisfatórios, pois, de um modo geral, apresentaram valores de

FPS superiores ao valor exigido pela Anvisa, e além disso, pode-se observar que as formulações incorporadas com o extrato nas diluições a partir de 10 mg mL⁻¹ apresentaram valores de FPS equivalentes ao padrão benzofenona-3, utilizado na produção de filtros solares comerciais. Por este motivo, o EEAA pode ser considerado um ingrediente ativo na preparação do protetor solar.

[055] Os espectros de absorção das formulações preparadas com EEAA de 5 a 20%, com o padrão benzofenona-3 a 5%, com quercetina a 5% e também do creme Lanette caracterizados por espectrofotometria de absorção na região UV-vis estão apresentados na Figura 2. É possível observar que as formulações CE 5 a 20%, apresentam bandas de absorção na região UVB em torno de 280 nm. Este aspecto também foi observado para o padrão benzofenona-3, um filtro químico comercial de amplo espectro, que possui duas bandas com máximos de absorção de radiações nas regiões UVB/UVA. Já, o padrão fenólico quercetina, substância encontrada no extrato etanólico da fibra da casca do coco anão amarelo, conhecida pelo seu potencial antioxidante e também fotoprotetor, apresentou absorção da radiação UV com máximos de absorvência no UVA/UVC e uma discreta banda na região UVB. Verificou-se que o creme Lanette não absorvia na região estudada, assegurando que as absorções resultantes foram das formulações O creme Lanette não apresenta bandas de absorção nos comprimentos de onda entre 230 a 450 nm.

VANTAGENS DA PATENTE

[056] A referida invenção pode atuar como um antioxidante, antiglicante e um fotoprotetor. E ainda, é preparada a partir de uma matéria prima barata e abundante na região Nordeste, pois, as fibras de coco são resíduos provenientes da agroindústria. A preparação do produto é feita de maneira simples. Além de todas essas vantagens, há a questão ambiental, no caso, o uso de resíduos obtidos em grande proporção em várias regiões brasileiras e usados até o momento em construção civil e agronegócios.

REFERÊNCIAS

- [057] AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 508, n. 2, p. 144–151, 2011.
- [058] AKINYELE, T. A.; AKINPELU, D.A.; OKOH. A. I. In vitro antilisteral properties of crude aqueous and hexane extracts of the of *C. nucifera*, *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.41, p. 8117-8121, 2011.
- [059] ALVIANO, D. S.; RODRIGUES, K. F.; LEITÃO, S. G.; RODRIGUES, M. L.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D.; ANTONIOLLI. A. R.; ALVIANO, C. S. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 269-273, 2004.
- [060] CABRAL, L. D. S. ET AL. Filtros solares e fotoprotetores – uma revisão. *Infarma Ciências Farmacêuticas*, v. 25, n. 2, p. 107–110, 2013.
- [061] COSTA, S. C. C. et al. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 25, n. 4, p. 413–418, 2015.
- [062] DE FREITAS, R. B., Desenvolvimento de fitocosmético antioxidante a partir de extrato padronizado do coco (*Cocos nucifera*): um estudo comparativo entre as variedades amarela e verde. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêutica – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 2017.
- [063] DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 4, n. 3, p. 241–247, 2011.
- [064] ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of olyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, v. 153, n. 10, p. 647–652, 2002.
- [065] FLOR, J. et al. Protetores solares. *Química Nova*. v. 30, n. 1, p. 153–158, 2007.

- [066] HALLIDAY, G. M.; LYONS, J. G. Inflammatory doses of UV may not be necessary for skin carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84, n. 2, p. 272–283, 2008.
- [067] HOODA, V.; SHARMA, N. G.; TYAGI, N.; HOODA, A., phytochemical and pharmacological profile of *Cocos nucifera*: an overview. *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, v. 3, n. 2, p. 130-135, 2012.
- [068] KOSCHEK, P. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; GATTASS, C. R. The rusk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, p. 1339-1343, 2007.
- [069] LIMA, E. B. C. et al. *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 11, p. 953–964, 2015.
- [070] MANAIA, E. B. et al. Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, n. 2, p. 201–209, 2013.
- [071] MENDONÇA-FILHO, R. R.; RODRIGUES, I, A.; ALVIANO, D. S.; SANTOS, A. S.; SOARES, R. M. A, ALVIANO, C. S.; LOPES, A, H.C.S, ROSA, M. S. S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae), *Research in Microbiology*, v. 155, p. 136–143, 2004.
- [072] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods*. 65, 55–63,1983.
- [073] SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 3, n. 9, p. 129–141, 2013.
- [074] SILVA, R. R. et al. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n. 1, p. 107, 2013.
- [075] SILVA, R. V. Princípio ativo para formulação extrato dos frutos de *spondias purpurea* L. Como princípio ativo para formulação fitocosmética

fotoprotetora. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2015.

[076] STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 69, n. 1, p. 71–77, 2014.

[077] SUVA, M. A. Evaluation of Sun Protection Factor of *Zingiber officinale* Roscoe Extract by Ultraviolet Spectroscopy Method. *Jornal of pharmascitech*, v. 3, n. 2, p. 4376, 2014.

[078] THORNALLEY, P. J., Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419, 31–40, 2003.

[079] VALADEZ-CARMONA, L. et al. Effect of microwave drying and oven drying on the water activity, color, phenolic compounds content and antioxidant activity of coconut husk (*Cocos nucifera* L.). *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 9, p. 3495–3501, 2016.

[080] ZILLICH, O. V. et al. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 37, n. 5, p. 455–464, 2015.

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, caracterizadas por compreender uma emulsão cremosa contendo de 5 a 20% (m/m) de extrato etanólico obtido das fibras das cascas da espécie *Cocos nucifera* Linn. (Palmae), incorporado em base cosmética emulsionante, espessantes e umectantes, sendo o extrato presente em concentrações finais entre 200 e 3000 µg/mL na formulação, conferindo fator de proteção solar (FPS) ≥ 6 .
2. FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo fato da espécie de *Cocos nucifera*, compreender preferencialmente a variedade anão amarelo.
3. FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizadas pelo fato de o extrato ser obtido a partir de solvente orgânico etanólico, de fácil obtenção.
4. FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizadas por apresentar:
 - a) um fator de proteção solar (FPS) in vitro na faixa de 7 a 32;
 - b) atividade antioxidante com inibição de radicais em 74,9 % (10 µg/mL) pelo método DPPH e capacidade de redução de ferro de 3287,0 µmol ET/g;
 - c) atividade antiglicante com IC₅₀ de 9,61 µg/mL no sistema BSA-Glicose/Frutose e 4,5 µg/mL no sistema Colágeno-Glicose/Frutose;
 - d) ausência de redução da viabilidade celular de macrófagos J774 até 100 µg/mL.
5. FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizadas por compreenderem concentrações do extrato etanólico da fibra da casca do coco anão amarelo de 5 a 20% (m/m).
6. FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, de acordo com a reivindicação 5, caracterizadas pelo fato de serem emulsões, tais como creme.
7. USO DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS, de acordo com as reivindicações 5 e 6, caracterizadas por compreender formulações com atividade fotoprotetora.
8. USO DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS de acordo com a reivindicação 7, caracterizadas por compreender fator de proteção solar (FPS) de 0,82 a 31,89, preferencialmente de 6 a 31,89.

DESENHOS

FIGURA 01

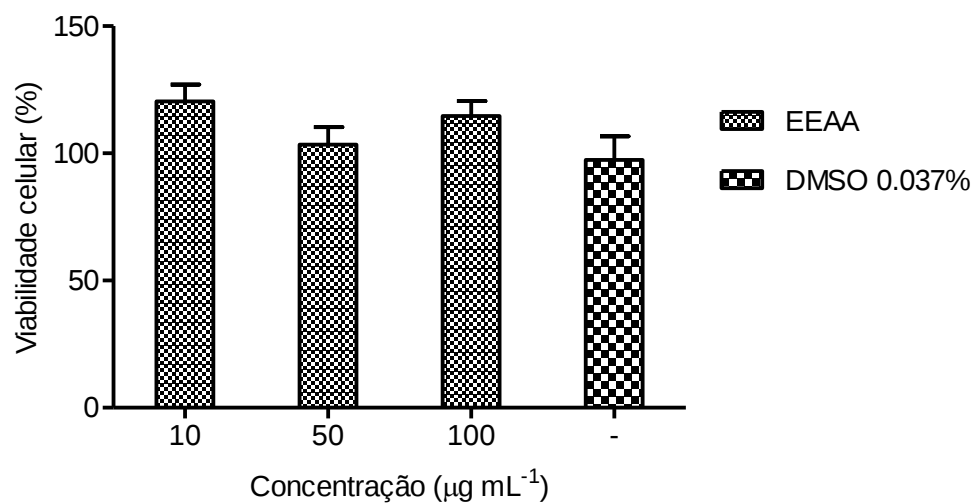


FIGURA 02

