



34° Congresso Brasileiro
de Cosmetologia
Caminhos Expandidos por Meio de uma
Cosmetologia Translacional

REGULAMENTO PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS CIENTÍFICOS:

APRESENTAÇÃO E-POSTER

O presente Regulamento normatiza os procedimentos, regras e critérios para inscrição, seleção, apresentação e avaliação e premição de trabalhos científicos na forma de e-poster no **34° Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, a realizar-se no período de **07 a 09 de junho de 2022** no formato presencial.

Notas importantes

Caso o autor opte pelo cancelamento da submissão do trabalho deverá comunicar pelo e-mail info@abc-cosmetologia.org.br até a data de **05 de maio de 2022** para excluirmos do programa de apresentação de trabalhos. Para qualquer outra orientação, o e-mail acima é o nosso canal de comunicação dedicado aos autores.

Artigo 1 – Formas de apresentação

Os trabalhos científicos submetidos ao Congresso serão apresentados na forma de *e-poster*, *presencial*.

Até o dia **20 de abril de 2022** os autores deverão formalizar o interesse em apresentar o seu trabalho por meio do preenchimento do Formulário de Submissão de Trabalho, disponível no *site* do Congresso (www.congressodecosmetologia.com.br). É obrigatório incluir o anexo do **Resumo** em formato .PDF no Formulário. Ao enviar o seu resumo, você está automaticamente autorizando a publicação do seu resumo na Revista indexada **Biomedical and Biopharmaceutical Research / Revista de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica**, e para isso deverá enviar o RESUMO em PORTUGUÊS E INGLÊS e assinalar sua intenção no formulário de inscrição do trabalho.

Até o dia **02 de maio de 2022**, a Comissão Científica avaliará os resumos dos trabalhos e divulgará, via e-mail e também no *site* do evento, a lista de trabalhos pré-selecionados e pré-aprovados para apresentação *e-poster*.

Até o dia **13 de maio de 2022** os autores deverão enviar o seu trabalho completo por meio do preenchimento do Formulário de Submissão de Trabalho, disponível no *site* do Congresso (www.congressodecosmetologia.com.br). É obrigatório incluir o anexo do **Trabalho Completo** em formato .PDF no Formulário. O trabalho completo: o trabalho completo deverá ser escrito e submetido no sistema em idioma de língua portuguesa.

No item COAUTORES do Formulário, informar **TODOS** os nomes, incluindo o do autor, atentando-se para a ordem de autoria e coautoria, pois esta será utilizada posteriormente para a emissão do certificado. O certificado será emitido em até 7 dias após o término do evento, no formato digital.



Somente serão aceitos trabalhos escritos em **português**. Lembrando que somente o resumo deve ser em português e inglês.

Artigo 2 – Comissão Científica

A Comissão Científica é constituída por membros de *experts* convidados pela Associação Brasileira de Cosmetologia que possuem vasta experiência profissional, conhecimentos diferentes e complementares na academia e na indústria, estando apta para avaliação e decisão soberana na premiação de trabalhos científicos. É composta por, no mínimo, 5 membros.

Artigo 3 – Instruções para a confecção dos trabalhos

Os trabalhos deverão atender as instruções abaixo:

- Forma gráfica:

Digitar o texto do trabalho na íntegra no programa Word, em um arquivo com extensão .DOC, com fonte **Arial** (corpo 10), espaço entre linhas simples, margens esquerda e superior de 3,0 cm e margens direita e inferior de 2,0 cm; título (corpo 12) em maiúscula e negrito; abaixo do título adicionar os nomes dos autores (nome e sobrenome, Arial, corpo 10), relacionando a Instituição a que cada autor está afiliado. Indicar o autor para correspondência com o respectivo endereço eletrônico. Deve-se pular uma linha entre as informações do título/autores e o corpo do texto. Todo o conteúdo do texto deverá ter o formato inteiramente justificado (esquerda e direita). O trabalho na íntegra deverá conter no máximo 15 (quinze) páginas, sendo o resumo limitado a no máximo 350 palavras.

- Conteúdo:

É obrigatório que o trabalho na íntegra contenha título, resumo, introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados e discussão*, conclusões e referências (eletrônicas e bibliográficas).

***Os autores deverão apresentar os resultados e discussão em um único subtítulo do trabalho.**

Trabalhos que não tenham aderência (ou pertinência) e aplicabilidade na área cosmética serão desclassificados pela Comissão Científica.

O anexo 1 traz um exemplo de trabalho apresentado em congressos anteriores e que atendem às normas desse regulamento.

Artigo 4 - Critérios de aceitação e seleção dos trabalhos e publicação nos Anais da revista Portuguesa Biomedical and Biopharmaceutical Research / Revista de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

4.1 Todos os trabalhos enviados serão selecionados para a modalidade e-poster e receberão uma pontuação para os quesitos (i) adequação as áreas temáticas, (ii) originalidade, ineditismo



34° Congresso Brasileiro
de Cosmetologia

Caminhos Expandidos por Meio de uma
Cosmetologia Translacional

e inovação, (iii) aplicabilidade na área cosmética, (iv) uso da metodologia científica, (v) formatação e (vi) ortografia, para que sejam selecionados para apresentação.

4.2 O texto deverá ser exclusivo e original, e não poderá ter sido publicado anteriormente à realização deste Congresso.

4.3 O conteúdo do trabalho não poderá caracterizar-se como apresentação de finalidade promocional ou comercial de ingredientes e/ou produtos.

4.4 Não será permitida a divulgação de nomes comerciais, tanto na arguição oral quanto na apresentação escrita, porém, poderão ser feitas menções de agradecimentos às empresas que comercializam as matérias-primas, produtos e/ou equipamentos contidos no trabalho.

4.5 Caso o autor não receba via e-mail o status do seu trabalho, deverá verificar no *site* se o seu trabalho está listado como aprovado.

4.6 Somente serão publicados os resumos na revista portuguesa **Biomedical and Biopharmaceutical Research / Revista de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica** os trabalhos que cumprirem o prazo estabelecido no Artigo 1, que estiverem de acordo com as instruções e normas estabelecidas nos Artigos 3 e que tiverem realizado o pagamento da taxa que menciona o Artigo 6. Os autores deverão autorizar a publicação por meio do Formulário de Submissão de Trabalho.

Artigo 5 – Áreas temáticas do Congresso Brasileiro de Cosmetologia de 2022

Tema Central:

Caminhos Expandidos por meio de uma Cosmetologia Translacional.

Definição do tema:

O translacional é relativo à aplicação prática de investigação científica, o qual visa agilizar a transferência de resultados de pesquisa básica para pesquisas clínicas, a fim de produzir benefícios para a comunidade como um todo. Ou seja, passar da teoria para a prática.

Como na cosmetologia, o translacional vem se ampliando para além das fronteiras técnicas ousando incorporar aspectos econômicos, sociológicos, jurídicos e éticos.

Artigo 6 – Apresentação E-poster

6.1 Formato

Os trabalhos selecionados para exposição deverão ser enviados em formato Power Point editável pelo formulário de submissão de trabalhos até o dia **20 de maio de 2022**.

A Comissão Organizadora enviará para o e-mail do apresentador do trabalho selecionado o horário de apresentação até o dia **01 de junho de 2022**



A ABC disponibilizará em **05 de maio de 2022** um *template* para apresentação do E-poster, visando facilitar a sua confecção e prevenir problemas diversos. No dia da sua apresentação também será disponibilizado um *help desk* para conferir as apresentações antes do congresso e orientar quanto a eventuais correções.

6.2 Apresentação

Cada trabalho selecionado para a modalidade de e-poster, terá o tempo de 3 minutos para a apresentação. O trabalho poderá ser desclassificado pelo não cumprimento do tempo de apresentação. Após o término da apresentação, a banca examinadora poderá arguir o autor/apresentador, visando sanar eventuais dúvidas para melhor avaliar o trabalho. A qualidade das respostas se constituirá de critério adicional para composição da nota final.

A apresentação deverá ser realizada em português.

Data e horário da apresentação dos trabalhos serão estabelecidos pela Comissão Científica, entretanto, poderão ser alterados para atender eventuais conveniências da programação. Ambos os casos serão comunicados ao autor responsável com a devida antecedência.

A não apresentação do trabalho ocasionará a sua desclassificação pela Comissão Científica.

Artigo 7 – Pagamentos e taxas

Todo trabalho selecionado deverá pagar uma taxa de apresentação no valor de:

- Para apresentação E-poster: **R\$ 290,00**.

8.1 Esta taxa deverá ser paga pelo autor principal ou apresentador e lhe concede a inscrição para o Congresso na qualidade de Congressista participante. A taxa permite a apresentação de até 1 (um) trabalho no formato escolhido por apresentador. Caso o mesmo autor/apresentador tenha mais de 1 (um) trabalho aprovado deverá ser paga uma nova taxa de apresentação.

8.2 Os trabalhos selecionados que não pagarem a taxa de apresentação serão desclassificados.

8.3 O Certificado contendo o nome do trabalho, do autor e coautores, será fornecido somente para os trabalhos em situação regular.

8.4 Até **10 de maio de 2022** o autor principal deverá se inscrever no congresso e :

- Caso o autor principal não possa participar do evento, poderá indicar previamente e formalmente um dos coautores como seu representante para ser considerado congressista participante em seu lugar.
- Formalizar o pedido de quaisquer alterações necessárias;
- Providenciar o pagamento da taxa de apresentação do trabalho selecionado pelos meios disponibilizados pela Associação Brasileira de Cosmetologia.

DATAS IMPORTANTES

21 de fevereiro de 2022	<u>Disponibilização do Formulário de Submissão de Trabalho</u> no site do congresso (www.congressodecosmetologia.com.br)
20 de abril de 2022	Prazo final para submissão do Resumo



34° Congresso Brasileiro
de Cosmetologia

Caminhos Expandidos por Meio de uma
Cosmetologia Translacional

	Preenchimento e envio do Formulário de Submissão de Trabalho
02 de maio de 2022	Comunicado aos Autores da aprovação do resumo do Trabalho
13 de maio de 2022	Prazo final para submissão do Trabalho Completo Preenchimento e envio do Formulário de Submissão de Trabalho
10 de maio de 2022	Prazo para Inscrição do Autor ou Apresentador Prazo para pagamento da taxa de apresentação
05 de maio de 2022	Disponibilização do <i>template</i> para apresentação de e-poster
20 de maio de 2022	Prazo final para envio da apresentação em formato .PPT para modalidade e-poster
01 de junho 2022	Divulgação de datas e horários da apresentação oral e e-poster
07-09/ junho 2022	Data do Congresso Brasileiro de Cosmetologia

PRÊMIOS OUTORGADOS PELA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA*

Primeiro Lugar Poster

R\$ 3.000,00 + 3 cursos ABC a escolha do ganhador**

Segundo Lugar Poster

R\$ 2.000,00 + 2 cursos ABC a escolha do ganhador**

Terceiro Lugar Poster

R\$ 1.000,00 + 1 curso ABC

Quarto Lugar Poster

menção honrosa + 1 curso ABC

Quinto Lugar

menção honrosa + 1 curso ABC

*Eventualmente os prêmios poderão ser patrocinados por outras empresas.

** Fica o ganhador ciente de que a inscrição é individual, pessoal e intransferível e terá validade somente para os Cursos ABC oferecidos durante o ano de 2022 exceto cursos organizados em parceria com outras instituições. A ABC não reservará vagas



34° Congresso Brasileiro de Cosmetologia

Caminhos Expandidos por Meio de uma
Cosmetologia Translacional

e a inscrição para cada curso do interesse do ganhador deverá ser realizada através do site da ABC- Associação Brasileira de Cosmetologia seguindo as normas e disponibilidade de vagas para cada curso. A ABC se reserva o direito de alterar o local, a data e o horário das aulas, assim como de cancelar o curso, caso o quórum mínimo de alunos não seja atingido. As desistências deverão ser formalizadas por escrito para a ABC em até 48h (quarenta e oito horas) antes do início do curso. A inscrição concedida cessará qualquer obrigação de pagamento pelo ganhador, salvo materiais extras que sejam solicitados pelo curso escolhido. Para ser aprovado no curso e ter direito ao certificado o aluno deverá frequentar no mínimo 75% da carga horária do curso. Não haverá reposição de aula caso o aluno falte.



34° Congresso Brasileiro
de Cosmetologia
Caminhos Expandidos por Meio de uma
Cosmetologia Translacional

ANEXO 1

Modelo

MODELO



OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INGREDIENTE COSMÉTICO A PARTIR DE *Prosopis juliflora* E APLICAÇÃO EM FORMA COSMÉTICA INOVADORA

Damasceno, Gabriel A. B.¹, Barreto, Stella M. A. G.¹, Souto, Augusto L.¹, Silva-Filho, Jean A. A.¹, Moura, Rafael A. O.¹;
Silveira, Walteça L. L.^{1,2}; Medeiros, Andreza A.^{1,2}; Veríssimo, Lourena M.^{1,2}; Ostrosky, Elissa A.¹, Sasaki, Guilherme L.³,
Rocha, Hugo A. O.¹, Lopes, Patrícia S.⁴, Sales, Valéria S. F.¹, Giordani, Raquel B.¹, Ferrari, Márcio^{1*}.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, Brasil.

²Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos – NUPLAM, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, Brasil.

³Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Brasil.

⁴Universidade Federal de São Paulo - UNIFEP, São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência: ferrarimarcio@uol.com.br. Av. General Gustavo de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-370, Natal/RN, Brasil.

RESUMO

Prosopis juliflora (PJ), conhecida popularmente como Algaroba, é uma planta invasora com distribuição na Caatinga e apresenta em sua composição metabólitos com características interesse em produtos cosméticos. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar um novo ingrediente cosmético a partir de PJ e sua aplicação em uma formulação sob a forma de núcleo sólido que ao entrar em contato com a água forma um gel instantaneamente para uso tópico. As amostras foram obtidas por um processo previamente otimizado a partir dos frutos e sementes da PJ, purificadas por ultrafiltração e cromatografia de gel-filtração e caracterizadas quanto a composição monossacarídica por ressonância magnética nuclear (RMN). A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada por meio de diferentes metodologias. Para citotoxicidade e fototoxicidade, o método colorimétrico do vermelho neutro e MTT foram utilizados para analisar a segurança *in vitro*, enquanto que, a segurança *in vivo* foi avaliada pelo teste de irritabilidade primária. A estabilidade foi realizada por 30 dias, sendo as amostras armazenadas em 4°C, 25°C e 45°C. A fração de PJ foi incorporada em um núcleo sólido, formado por agentes diluentes, desintegrantes, gelificantes e emolientes, obtidos por granulação via úmida seguido de compressão. Após o processo de purificação, as análises de RMN demonstraram que a fração analisada era composta por uma α -glucana. As avaliações *in vitro* da atividade antioxidante demonstraram o potencial da PJ em diferentes etapas da cascata oxidativa. As amostras foram consideradas não-citotóxicas e não-fototóxicas, bem como não foram observadas alterações e irritação cutânea nos voluntários, demonstrando indícios de segurança deste novo ingrediente cosmético. A granulação e compressão das formulações aditivadas com extrato de PJ deu origem a um núcleo sólido, estável que em contato com a água forma um gel para aplicação tópica.

Palavras-chave: Algaroba; *Prosopis juliflora*; antioxidante; avaliação da segurança.

INTRODUÇÃO

Prosopis juliflora (*P. juliflora*), conhecida popularmente como algaroba, é originária do Peru e bem adaptada ao Bioma da Caatinga. A falta de manejo adequado, a adaptação regional da espécie e a facilidade da dispersão tornaram a algaroba uma planta considerada invasora. A espécie exerce alelopatia frente a outras espécies e, em função da difícil erradicação da algaroba e do prejuízo às demais espécies da Caatinga, uma exploração racional da espécie como fonte de recursos sustentáveis, pode ser apontada como forma útil de manejo dessa espécie invasora (Sathiyha & Muthuchelian, 2011).

De acordo com a revisão apresentada por Damasceno, Ferrari, & Giordani (2017), a algaroba é utilizada como fonte de madeira, alimento humano e animal, no tratamento da asma, problemas gastrointestinais e dermatológicos. Nesse contexto, os autores descreveram estudos acerca das atividades antimicrobiana, anti-tumoral, inibição da enzima acetilcolinesterase, dentre outras, porém, até o presente momento, nenhuma pesquisa relacionada à atividade cosmética foi relatada.

A análise da constituição química reportada para a espécie indica predominância de polissacarídeos e derivados fenólicos como polissacarídes, flavonoides, alcaloides, saponinas, compostos fenólicos, taninos, terpenoides e cumarinas, alguns dos quais despertam o interesse para potencial de uso como ativos e excipientes em cosméticos (Ibrahim, Nadir, Ali, Ahmad, & Rasheed, 2013; Rincón, Muñoz, Ramírez, Galán, & Alfaro, 2014).

O uso de polissacarídeos semelhantes aos descritos para *P. juliflora* com atividade hidratante e antioxidante foi relatado na literatura e motivou o desenvolvimento deste trabalho (Barreto et al., 2017).

Há ainda a percepção do consumidor de que o uso de matérias-primas de origem vegetal está associado a produtos mais seguros e ecológicos (Antignac, Nohynek, Re, Clouzeau, & Toutain, 2011). No entanto, a interação entre os ativos



utilizados em cosmético e a pele é complexa e não há garantias que de reações indesejáveis estejam ausentes, sendo necessária a avaliação da segurança dos ingredientes utilizados como base da segurança dos produtos cosméticos (Antignac et al., 2011; Gao, Zhang, Wei, & Chen, 2008; Nohynek, Antignac, Re, & Toutain, 2010).

Ao analisar produtos comerciais para hidratação e prevenção do envelhecimento, verifica-se que a maioria apresenta-se nas formas de emulsão e gel. O mercado consumidor de cosméticos espera por inovações, seja no tocante a ativos, embalagens, formas de aplicação ou ainda forma de apresentação, motivando o desenvolvimento de formas inovadoras.

Além disso, o uso racional da algaroba pode contribuir com a melhoria de qualidade de vida de diferentes comunidades especialmente a agricultura familiar, propiciando emprego e renda fundamentais na estratégia de desenvolvimento sustentado e no manejo sustentável da biodiversidade.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram a obtenção, caracterização, o estudo *in vitro* do potencial antioxidante e a avaliação *in vitro* e *in vivo* da segurança de um novo ingrediente cosmético a partir de *Prosopis juliflora* e sua aplicação em uma formulação sob a forma de núcleo sólido, que ao entrar em contato com a água forma um gel instantaneamente para uso tópico imediato.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA, IDENTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS ESPÉCIMES VEGETAIS

Frutos (vagens com sementes) de *P. juliflora* foram coletados em Currais Novos-RN (6°15.469'S 36°30.529'O), identificadas e registradas no Herbário da UFRN sob o registro: "*Prosopis juliflora* -- UFRN 20371". A autorização de coleta do material foi concedida pelo SISBIO (32749-2) e Certidão de regularização junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o n. A0E663C.

O extrato utilizado neste trabalho foi obtido após um estudo de delineamento experimental estatístico do tipo 2² + 2 axiais, com triplicata no ponto central, realizado pelos próprios autores a fim de se avaliar a influência da temperatura e tempo de extração no rendimento, percentual de açúcares totais e atividade antioxidante total (Damasceno et al., 2017).

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DE *Prosopis juliflora*

Purificação por ultrafiltração em centrifuga

O extrato de *P. juliflora*, (PJ2) foi submetido a centrifuga utilizando uma membrana de ultrafiltração de com ponto de corte de 3kDa (GE Healthcare, UK). Posteriormente, congelada a -20°C e liofilizada por 48h (Christ Alpha 1-2 LD, Osterode am Harz, Alemanha) (Galinari et al., 2017).

Purificação em coluna de gel filtração

A fração superior a 3KDa de PJ2 (F2M) foi solubilizada em água e submetida a uma coluna de gel-permeação com gel de dextrano reticulado (Sigma-Aldrich, Alemanha), utilizando sistema tampão composto por ácido acético 0,2M e NaCl 0,25M. O eluído foi monitorado em função da concentração de açúcares totais (Galinari et al., 2017). Em seguida, as amostras foram dialisadas em centrífuga utilizando membrana de ultrafiltração de 3kDa (GE Healthcare, UK) para a remoção do tampão.

Análise da composição química por Ressonância Magnética Nuclear

Previamente, F2M foi submetida a troca de H por D, por sucessivas solubilizações e evaporações em solventes deuterados. Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C foram referenciados em relação ao sinal do TMS (sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeutério-propiónico) em 0,00 ppm. As amostras foram solubilizadas em 500 µL de água deuterada (D₂O) em tubos de 5 mm e temperatura de análise de 303 K. Espectros de RMN 1D e 2D de ¹H e ¹³C foram adquiridos em um espectrômetro de RMN (Bruker AVANCE III 400, EUA) operando a 9,4 Tesla (400.13 MHz para ¹H), equipado com uma sonda de observação inversa (BBI) de 5 mm e gradiente de campo no eixo z (Paredes et al., 2018).

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA AMOSTRA PURIFICADA DE *Prosopis juliflora*

Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada segundo o método adaptado de Prieto, Pineda, & Aguilar (1999). A CAT será expressa em equivalentes de ácido ascórbico por massa da amostra aplicada no ensaio.

Poder redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com o método descrito por Wang, Zhang, Zhang, & Li (2008). O resultado foi expresso como porcentagem de atividade correspondente a massa de ácido ascórbico.



Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

As amostras foram avaliadas de acordo com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995). A porcentagem de sequestro de radicais foi utilizada para expressar os resultados.

Quelação de íons de Cobre (Cu²⁺)

Foi avaliada a capacidade da amostra em quelar o íon cobre por meio do método descrito por Anton (1960). Os resultados foram expressos como porcentagem de quelação de cobre.

Quelação de íons de Ferro (Fe²⁺)

A capacidade das amostras em quelar o íon ferro foi avaliado por meio do método adaptado de Decker & Welch (1990). Os resultados foram expressos como porcentagem de quelação de ferro.

Sequestro de Radicais Hidroxila (OH·)

O potencial de sequestro da radical hidroxila foi avaliado por meio do método adaptado de Smirnoff & Cumbes (1989), fundamentado na reação de Fenton. Os resultados foram expressos em percentual de sequestro de radical hidroxila.

Sequestro de radicais Superóxidos (O²⁻)

Esse método é fundamentado na capacidade da amostra em inibir a redução fotoquímica do NBT em um sistema riboflavina-luz-NBT (Dasgupta & De, 2004). O percentual de sequestro de O²⁻ foi utilizado para expressar os resultados.

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS EXTRATOS DE *Prosopis juliflora*

Avaliação *in vitro* da segurança dos extratos de *Prosopis juliflora*

Os testes *in vitro* foram realizados em cultura de células BALB/c 3T3 (ATCC CCL-163) e corante vital vermelho neutro (NR) de acordo com as metodologias *in vitro* de citotoxicidade e fototoxicidade 3T3 NRU (ISO, 2009; OECD, 2004, 2010). Adicionalmente, foi utilizada cultura de células HaCat e corante vital MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

Avaliação *in vivo* da segurança dos extratos de *Prosopis juliflora*

Foram selecionados 19 indivíduos voluntários (Comitê de Ética e Pesquisa/HUOL UFRN, CAAE 63683116.7.0000.5292), ambos os sexos, com fototipo de pele de I a IV (Pathak, Fitzpatrick, Greiter, & Kraus, 1993) e idade entre 20 e 67 anos, após lerem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para a avaliação da compatibilidade cutânea, foram fixados quatro apósitos para testes de contato (*patch test*) no dorso dos voluntários contendo 20 µL de PJ2 (0,5% e 3,0%) e controles negativos (água destilada e solução fisiológica), mantidos por 48h e avaliadas após 30min, 24h e 48h, após a remoção. Os resultados foram interpretados de acordo com o *International Contact Dermatitis Research Group Guidelines* (IRCDG) (Wilkinson et al., 1970).

DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Obtenção das formulações

A obtenção dos núcleos sólidos foi realizada por granulação via úmida seguida de compressão, utilizando um jogo de matrizes e punções para núcleos planos circulares com 10mm de diâmetro (LAWES 2000 W216).

No processo de granulação via úmida, as formulações (Tabela 1) foram submetidas a malaxagem com uma solução molhante, em seguida, granuladas em granulador rotativo (Mod. Soc. Fabbe., Brasil), secos em estufa até umidade inferior a 4% (Fanem, 515, Brasil) e calibrados em granulador rotativo tendo sido a umidade verificada balança determinadora de umidade (BEL, Mod. Mark I-Thermo, Brasil). Após essa etapa, os granulados foram comprimidos.

Tabela 1 - Composição da formulação dos núcleos sólidos de *Prosopis juliflora*.

Componentes	Formulação	Veículo
FASE A		
Manitol	89,5%	92,5%
FASE B		
Croscarmelose Sódica	2,5%	2,5%
FASE C		
Sodium Polyacrylate	5,0%	5,0%
FASE D		



34° Congresso Brasileiro de Cosmetologia

Caminhos Expandidos por Meio de uma Cosmetologia Translacional

Extrato de <i>Prosopis juliflora</i> PJ2	3,0%	
FASE MOLHANTE	1:1 (p/v)	1:1 (p/v)
Solução PVP-K30 a 2,5%	90%	90%
Solução Emolientes		
<i>Isostearyl Neopentanoate: Isopropyl Isostearate: Isostearyl Isostearate</i> (1:1:1 p/p/p)	10%	10%

Estudo de Estabilidade da Formulações

Após o processo de compressão, os núcleos sólidos foram acondicionados em envelopes metálicos e submetidos ao estudo de estabilidade em três condições diferentes: 4°C, 25°C e 45°C, durante 30 dias. Foram produzidos três lotes da formulação contendo o extrato PJ2 de *P. juliflora* e um lote do veículo.

Como parâmetros de análise, foram realizados: o peso médio e os testes de dureza, friabilidade e desintegração dos núcleos sólidos, seguindo metodologia da Farmacopéia Brasileira (Anvisa, 2010) e, adicionalmente, foi determinado o pH (Davis, 1977) do gel formado após a reconstituição com água e a umidade dos núcleos sólidos.

A análise estatística foi realizada no *Software GraphPad Prim 8*, por meio dos testes de Análise de Variância, ANOVA e pós-teste de *Tukey*.

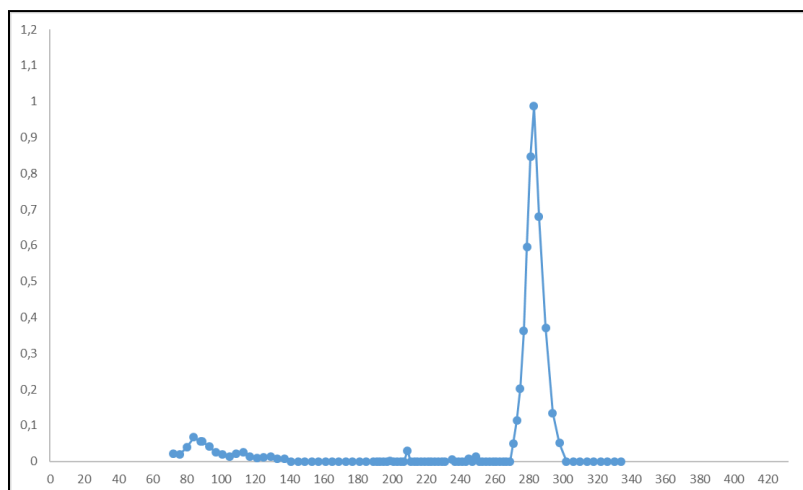
RESULTADOS E DISCUSSÃO

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DE *Prosopis juliflora*

A amostra PJ2 após purificada originou uma fração com peso molecular maior que 3kDa (F2M), caracterizada como um pó higroscópico de coloração branca e rendimento de 29,8%. Essa amostra foi então submetida a purificação em coluna de gel filtração.

É possível observar na Figura 1 a presença de um pico majoritário na amostra, indicando indícios da presença de um único polissacarídeo purificado.

Figura 1 - Perfil de peso molecular do pico observado para F2M após protocolo de permeação em coluna de gel-filtração.



O espectro de RMN 1H revelou 6 sinais na região entre 3,2 e 4,0 ppm, característicos de prótons de carboidratos (Vliegthart, 2006) cujos deslocamentos foram: 3,57, 3,70, 3,50, 3,88 e 3,97 ppm. Além desses sinais, foi observado um sinal em δ H 4,96 ppm típico de α -anômeros (Bubb, 2003).

No espectro de correlação heteronuclear 1H x 13C (400 e 100 MHz, D2O) do tipo HSQC, foi possível observar a correlação do H-1 em δ H 4,96 ppm com o C-1 em δ c 98,24 ppm, cujo deslocamento químico é típico de carbono anomérico alfa (Bubb, 2003), o que corrobora com as absorções encontradas no espectro de RMN unidimensional de hidrogênio. Adicionalmente, foi possível observar deslocamentos químicos dos carbonos não anoméricos em 72,4 (C2), 73,8 (C3), 70,2 (C4), 70,6 (C5) e 66,4 (C6) cujas correlações diretas com seus respectivos hidrogênios podem ser observadas na Tabela 2. Desta maneira, após analisar todos os dados obtidos, com os da literatura (Petersen, Motawie, Møller, Hindsgaul, & Meier,



2015) pôde-se verificar que a amostra analisada se tratava de uma α -glucana, um polissacarídeo de glicoses com ligações interglicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 6).

Tabela 2 – Deslocamentos químicos observados para amostras de *P. juliflora*.

C	<i>P. juliflora</i> F2M ^a		α -glucana ^b	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	4,96	98,2	4,96	98,5
2	3,57	72,4	3,57	72,0
3	3,70	73,8	3,71	73,8
4	3,50	70,2	3,51	70,2
5	3,88	70,6	3,90	70,9
6	3,97	66,4	3,96 (6a) 3,75 (6b)	66,3

^aF2M = Fração de *P. juliflora* com peso molecular maior que 3kDa, autoria própria;

^b Adaptado de Petersen et al. (2015)

Os resultados obtidos foram diferentes daqueles relatados na literatura que apontavam a presença de galactomananas para esta espécie, no entanto, as diferenças observadas podem ser em função da origem da planta, da parte da planta utilizada, do estágio de crescimento e diferenciação tecidual, bem como do processo extrativo, especialmente porque não foram realizadas etapas de separação das partes da semente (Rincón et al., 2014; Tharanathan, Muralikrishna, Salimath, & Rao, 1987).

AValiação *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA AMOSTRA PURIFICADA DE *Prosopis juliflora*

A fração F2M foi avaliada quanto ao seu potencial antioxidante *in vitro* por diferentes metodologias com o objetivo de estudar os prováveis mecanismos de ação e em quais etapas do processo oxidativo essa matéria-prima pode atuar. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para os testes de atividade antioxidante *in vitro*.

O bloco de experimentos formados pela CAT, poder redutor e sequestro de radicais DPPH, demonstra a capacidade da amostra inibir os radicais livres e dessa forma atuar no estágio de iniciação de oxidação de compostos celulares (Melo-Silveira et al., 2014). A análise dos resultados aponta que PJ2 tem potencial uso em produtos voltados à prevenção dos sinais do envelhecimento, evitando a propagação da cascata oxidativa.

Já a formação de radicais hidroxila está relacionado à metais de transição, especialmente cobre e ferro. Na ausência desses íons o peróxido de hidrogênio está razoavelmente estável. A formação do radical hidroxila se dá quando há uma perturbação na homeostasia desses metais, por meio de uma reação de Fenton. O radical hidroxila é considerado o mais reativo em comparação aos demais radicais de oxigênio, sendo capaz de interagir com praticamente qualquer molécula biológica tais como proteínas e DNA, causando a formação de compostos tóxicos e levando ao dano celular (Aruoma, 1998).

Assim, é possível observar uma correlação entre a atividade de quelação de metais, especialmente o cobre, e a atividade de sequestro de hidroxilas de F2M nas mesmas concentrações. Uma vez que a atividade de sequestro de radicais hidroxila foi bem maior numericamente que a atividade de quelação de metais, podemos sugerir que a F2M estaria atuando pela remoção de íons Cu^{2+} e Fe^{2+} bem como por outros mecanismos. Vale salientar que para efeito de comparação, nas concentrações de 1 e 2mg/mL, o controle EDTA apresentou quelação de Fe^{2+} de 51,95% e 77,50%, enquanto que para o sequestro de $OH\cdot$, o controle ácido gálico apresentou atividade de 62,69% e 129,85% respectivamente.



Tabela 3. Resultados dos testes de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de *P. juliflora*.

Concentração Avaliada (mg/mL)	CAT (mg/g de ácido ascórbico)	Poder Redutor (%)	Sequestro do radical DPPH (%)	Quelação Cu ²⁺ (%)	Quelação Fe ²⁺ (%)	Sequestro OH ⁻ (%)	Sequestro O ₂ ⁻ (%)
0,00	-	-	0,0	-	-	-	-
0,10	-	-	1,8	-	-	-	-
0,15	-	-	20,8	-	-	-	-
0,25	-	13,82	58,5	40,61	13,28	54,01	n.a.
0,50	-	16,13	59,0	53,73	18,55	100,93	n.a.
1,00	-	35,71	63,2	62,64	29,29	113,15	n.a.
2,00	-	20,52	65,6	59,71	42,62	113,43	26,47
5,00	11,21	-	-	-	-	-	-

Onde: n.a. = Não apresentou atividade na concentração testada; - = concentração não avaliado para este teste específico.

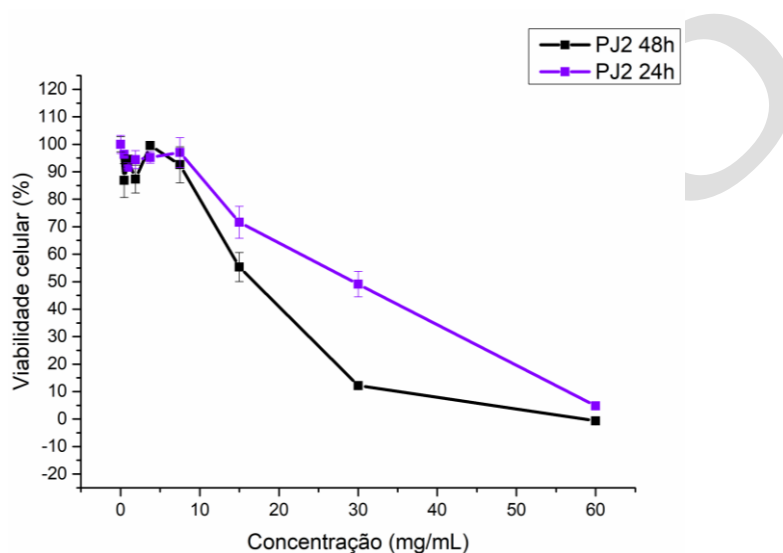


AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS EXTRATOS DE *Prosopis juliflora*

A amostra PJ2 apresentou viabilidade celular superior a 90%, IC10 de 29,66 (Balb 3T3 e corante NR) e IC50 de 40,27mg/mL. Dessa forma, quando utilizadas em concentração de até 30mg/mL ou 3%, concentrações essas comumente utilizadas em produtos cosméticos, as amostras podem ser consideradas não-citotóxicas.

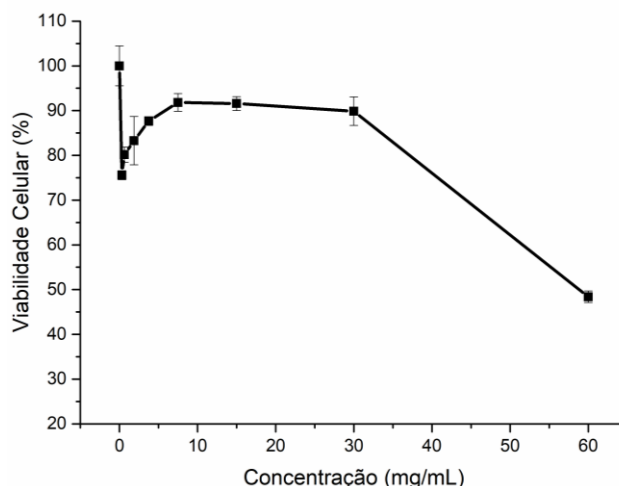
As células foram submetidas a análise de citotoxicidade, em células Balb 3T3, utilizando o MTT como corante vital, em dois tempos diferentes de contato, 24 e 48h, para avaliar se havia ativação de mitocôndrias. As amostras apresentaram comportamento diferente, apresentando-se mais citotóxicas, quando comparadas com o NR. No entanto, para a amostra PJ2 a viabilidade celular quando submetida a 3% do ativo é de 49%, não diferente estatisticamente dos 55% de viabilidade encontrado com o NR. Cabe ressaltar que ao expormos as células por 48h essa citotoxicidade aumenta, levando a uma queda da viabilidade celular (12 %).

Figura 2 - Avaliação da citotoxicidade da amostra PJ2 de *Prosopis juliflora* em cultura de células Balb 3T3 e corante vital MTT.



Por fim, as amostras foram testadas utilizando células HaCat e o corante vital NR. É possível observar que para as células HaCat as amostras apresentam menor toxicidade, Figura 2.

Figura 3 - Avaliação da citotoxicidade da amostra PJ2 de *Prosopis juliflora* em cultura de células HaCat e corante vital NR.



Um grande número de moléculas podem apresentar efeito fototóxico devido a presença de anéis de benzeno e anéis heterocíclicos como grupamentos cromóforos em suas estruturas químicas (Gonçalo, 2011). Substâncias fotoativadas podem interagir direta ou indiretamente com moléculas endógenas e desencadear efeitos indesejáveis, dentre eles a fototoxicidade, os quais podem coincidir com os sintomas de irritação da pele ou exposição exagerada ao sol, tais como prurido, eritema e edema (Kim, Park, & Lim, 2015).

A amostra PJ2 apresentou valor de PIF igual a 1,0 e valor de MPE de 0,101. Portanto, de acordo com a OCDE TG 432 (2004), os valores de MPE e PIF obtidos, PJ2 não apresentam fototoxicidade nas concentrações utilizadas.

Diante do exposto, a análise conjunta dos testes de citotoxicidade e fototoxicidade são indícios que contribuem para a confirmação da segurança dos extratos de *P. juliflora* na faixa de concentração até 3,0%, sendo esta faixa avaliada através de metodologias *in vivo*.

Nas condições padronizadas neste experimento, nenhum dos voluntários apresentou quaisquer sinais de eritema, edema, pápulas e ou vesículas, de acordo com a escala preconizada pelo *International Contact Dermatitis Research Group Guidelines* (IRCDG) (Wilkinson et al., 1970), portanto, a amostra PJ2 foi considerada segura para uso em formulações cosméticas nas concentrações entre 0,5 e 3,0%.

DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Considerando os resultados dos testes de segurança, a fração PJ2 foi adicionada à formulação na concentração de 3% e, após a obtenção, os núcleos sólidos apresentaram um peso médio de $427,19 \pm 6,16$ mg, foram reconstituídos em 1mL de água destilada e o gel formado apresentou valor de pH de $6,75 \pm 0,11$ compatível com o pH cutâneo.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos após 30 dias de estabilidade dos núcleos sólidos. Após trinta dias de experimento, não houveram alterações das características macroscópicas de cor, odor e aparência.

Variações estatisticamente significativas foram observadas apenas nos valores de umidade para a formulação veículo armazenada em temperatura ambiente. No entanto, ocorreu uma diminuição da umidade do núcleo sólido, estando todos os valores em níveis baixos de umidade. Além disso, os valores para dureza do veículo armazenada a 45°C apresentaram-se significativamente superior aos valores do T0 e a formulação armazenada a 4°C.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (Anvisa, 2010), o valor de friabilidade não pode ser superior a 1,5%, estando assim, as amostras F_T0, F_T30_4 e F_T30_45 em desacordo com este parâmetro. O objetivo dos núcleos sólidos é a formação de um gel após adição de água, logo, é necessário que o núcleo apresente baixa resistência mecânica à fricção para viabilizar a obtenção do gel. Além disso, essas variações não foram observadas para a formulação aditivada com PJ2.

Nenhuma das amostras apresentou total desintegração em até 30min de teste. No entanto, é possível observar a formação do gel ao redor do núcleo sólido, o que reduz o contato com a água e, provavelmente está relacionado ao resultado observado.

Vale destacar que a Farmacopeia Brasileira (Anvisa, 2010) da segurança dos produtos cosméticos é um compêndio oficial voltado à medicamentos e está sendo utilizada como parâmetro neste trabalho devido a inovação da forma cosmética apresentada e falta de outros parâmetros. Diante disso, a análise dos dados de estabilidade correlacionada aos objetivos do estudo, podem sugerir que as amostras foram estáveis no período do teste.



Tabela 4. Resultados do estudo de estabilidade dos núcleos sólidos de *P. juliflora* e seu veículo.

	V_T0	V_T30_4	V_T30_25	V_T30_45	F_T0	F_T30_4	F_T30_25	F_T30_45
Características Macroscópicas	N	N	N	N	N	N	N	N
Peso Médio (mg)	427,19 ± 6,16	424,33 ± 6,91	420,50 ± 11,29	425,11 ± 4,72	406,26 ± 3,99	409,44 ± 4,57	407,20 ± 6,36	409,54 ± 3,84
Umidade (%)	2,46 ± 0,28	2,09 ± 0,16	1,94 ± 0,06 ¹	2,02 ± 0,11	2,17 ± 0,34	2,12 ± 0,22	2,18 ± 0,28	2,10 ± 0,16
Friabilidade (%)	0,37	0,47	0,26	0,25	2,90	3,51	0,91	3,85
Dureza (N)	22,25 ± 3,11	22,07 ± 5,84	25,19 ± 4,53	30,29 ± 7,36 ^{1,2}	19,85 ± 1,62	19,99 ± 3,27	17,84 ± 2,56	20,58 ± 4,09
Desintegração	DI	DI	DI	DI	DI	DI	DI	DI

Onde:

V = Veículo; F = Formulação; N = Normal; DI = Desintegração incompleta; ¹p-valor < 0,05 quando comparado ao valores V_T0; ²p-valor < 0,05 quando comparado ao valores V_T30_4



CONCLUSÕES

A amostra foi elucidada estruturalmente por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e foi observado que a fração estudada era composta por uma α -glucana.

Após o estudo de avaliação da segurança, foi possível observar que essa nova potencial matéria-prima cosmética foi considerada não-citotóxica e não-fototóxica, confirmando a segurança do extrato de *P. juliflora* nos aspectos estudados.

Assim, a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante demonstrou que a amostra estudada apresenta atividade através de mecanismos distintos, indicando um potencial antioxidante da *P. juliflora* em etapas diferentes da cascata oxidativa. Esses resultados predizem o seu potencial uso como matéria-prima cosmética no combate aos sinais do envelhecimento cutâneo.

A compressão após granulação via úmida se mostrou uma técnica adequada à obtenção dos núcleos sólidos, os quais apresentaram-se com peso médio de 427,19mg e pH do gel formado de $6,75 \pm 0,11$. Após os testes de estabilidade, apenas a formulação veículo apresentou variações significativas nos valores de dureza e umidade e após a análise conjunta dos dados, as amostras foram consideradas estáveis.

Este trabalho resultou no depósito de um pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (BR 10 2017 006458 1) tratando de composições cosméticas contendo extratos de *Prosopis juliflora* e o uso como ativo e/ou excipiente cosmético para aplicação tópica, especialmente, um núcleo sólido em dose única que, quando disperso em água, origina um gel de aplicação imediata.

Agradecimentos

Os autores agradecem o CNPq e a Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRN pelo apoio e suporte financeiro na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Antignac, E., Nohynek, G. J., Re, T., Clouzeau, J., & Toutain, H. (2011). Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 324-341.
- Anton, A. (1960). Colorimetric Estimation of Aluminum with Pyrocatechol Violet. *Analytical Chemistry*, 32(6), 725-726.
- Anvisa. (2010). *Farmacopeia Brasileira* (5ª Ed. ed. Vol. 1). Brasília.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199-212.
- Barreto, S. M. A. G., Maia, M. S., Benicá, A. M., de Assis, H. R. B. S., Leite-Silva, V. R., da Rocha-Filho, P. A., . . . Ferrari, M. (2017). Evaluation of *in vitro* and *in vivo* safety of the by-product of Agave sisalana as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. *Industrial Crops and Products*, 108(Supplement C), 470-479.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bubb, W. A. (2003). NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 19A(1), 1-19.
- Damasceno, G. A. d. B., Dantas, L. d. A., Souza, D. C. d., Benicá, Á. M., Barreto, S. M. A. G., Ostrosky, E. A., . . . Ferrari, M. (2017). *DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA Prosopis juliflora PARA USO EM PRODUTOS COSMÉTICOS, ATRAVÉS DE DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO*. Paper presented at the 30º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, São Paulo.
- Damasceno, G. A. d. B., Ferrari, M., & Giordani, R. B. (2017). *Prosopis juliflora* (SW) D.C., an invasive specie at the Brazilian Caatinga: phytochemical, pharmacological, toxicological and technological overview. *Phytochemistry Reviews*, 16(2), 309-331.
- Dasgupta, N., & De, B. (2004). Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract *in vitro*. *Food Chemistry*, 88(2), 219-224.
- Davis, H. M. (1977). *Analysis of creams and lotions* (Vol. cap.4). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(3), 674-677.
- Galinari, É., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., Macedo, G. R., Passos, F. M. L., Mantovani, H. C., & Rocha, H. A. O. (2017). Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -d-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1298-1305.
- Gao, X.-H., Zhang, L., Wei, H., & Chen, H.-D. (2008). Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*, 26(4), 367-374.
- Gonçalo, M. (2011). *Phototoxic and Photoallergic Reactions*. Berlin: Springer.
- Ibrahim, M., Nadir, M., Ali, A., Ahmad, V. U., & Rasheed, M. (2013). Phytochemical analyses of *Prosopis juliflora* Swartz DC. *Pakistan Journal of Botany*, 45(6), 2101-2104.
- ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, (2009).
- Kim, K., Park, H., & Lim, K.-M. (2015). Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicological research*, 31(2), 97-104.
- Melo-Silveira, R., Fidelis, G., Viana, R., Soeiro, V., Silva, R., Machado, D., . . . Oliveira Rocha, H. (2014). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Extract from a Neglected Agricultural Product: Corn Cobs. *Molecules*, 19(4), 5360.



- Nohynek, G. J., Antignac, E., Re, T., & Toutain, H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), 239-259.
- OECD. (2004). *Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test* (Vol. Section 4). Paris: OECD Publishing.
- OECD. (2010). *Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*. Paris: OECD Publishing
- Paredes, L. L. R., Smiderle, F. R., Santana-Filho, A. P., Kimura, A., Iacomini, M., & Sasaki, G. L. (2018). Yacon fructans (*Smallanthus sonchifolius*) extraction, characterization and activation of macrophages to phagocyte yeast cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1074-1081.
- Pathak, M. A., Fitzpatrick, T. B., Greiter, F., & Kraus, E. W. (1993). Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun-protective agents. *Dermatology in general medicine*, 4, 1689-1717.
- Petersen, B. O., Motawie, M. S., Møller, B. L., Hindsgaul, O., & Meier, S. (2015). NMR characterization of chemically synthesized branched α -dextrin model compounds. *Carbohydrate Research*, 403, 149-156.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Rincón, F., Muñoz, J., Ramírez, P., Galán, H., & Alfaro, M. C. (2014). Physicochemical and rheological characterization of *Prosopis juliflora* seed gum aqueous dispersions. *Food Hydrocolloids*, 35(0), 348-357.
- Sathya, M., & Muthuchelian, K. (2011). Anti-tumor potential of total alkaloid extract of *Prosopis juliflora* DC. leaves against Molt-4 cells in vitro. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8881-8888.
- Smirnov, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Tharanathan, R. N., Muralikrishna, G., Salimath, P. V., & Rao, M. R. R. (1987). Plant carbohydrates-An overview. *Proceedings: Plant Sciences*, 97(2), 81-155.
- Vliegthart, J. F. G. (2006). Introduction to NMR Spectroscopy of Carbohydrates *NMR Spectroscopy and Computer Modeling of Carbohydrates* (Vol. 930, pp. 1-19): American Chemical Society.
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., & Li, Z. (2008). Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 127-132.
- Wilkinson, D. S., Fregert, S., Magnusson, B., Bandmann, H. J., Calnan, C. D., Cronin, E., . . . Piriä, V. (1970). Terminology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol.*, 50(4), 287-292.