

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Juliana Branco Fila

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COSMÉTICO DE EXTRATO DE FOLHA DE  
AMORA**

Araraquara - SP

2017

Juliana Branco Fila

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COSMÉTICO DE EXTRATO DE FOLHA DE  
AMORA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Graduação em Farmácia-  
Bioquímica, da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas, da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para  
obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra Vera Lucia Borges Isaac  
**Co-orientadora:** Maria Gabriela José de Almeida Cincotto

Araraquara - SP

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade de vivenciar esses anos ricos de experiência e aprendizados.

Aos meus pais e familiares, que sempre incentivaram minha carreira e por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos e colegas de turma, que tornaram os meus dias mais alegres, com os quais eu pude trocar experiências e aprender com cada um.

Agradeço toda a equipe do Laboratório de Cosmetologia (LaCos), pela prontidão em ajudar a realização do meu trabalho, pela troca de conhecimento e experiência e por toda a amizade.

À minha orientadora e professora Dra. Vera Lucia Borges Isaac que confiou no meu potencial ao me aceitar como sua aluna e por todo conhecimento e colaboração transmitidos.

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup> Maria Gabriela José de Almeida Cincotto, por toda orientação, ensinamento e pela paciência ao guiar meu caminho na realização desse trabalho.

A todos que estiveram e estão sempre ao meu lado e contribuem de alguma forma para o meu crescimento.

## RESUMO

A amora preta, *Morus nigra* L., é uma espécie de planta que pode ser facilmente encontrada no Brasil. As plantas pertencentes ao gênero *Morus* são ricas em compostos fenólicos como os flavonoides e também as antocianinas, que conferem diferentes propriedades farmacológicas, dentre elas, a propriedade antioxidante encontrada nos extratos de folhas e frutos. Esta propriedade está relacionada com a capacidade de combater os radicais livres provenientes do metabolismo celular no organismo ou da exposição excessiva aos raios solares, que aceleram o processo de envelhecimento cutâneo. Devido a essas evidências de potencial antioxidante nos extratos de folhas de *Morus nigra*, é estimado um potencial para uso como ativo natural para desenvolvimento de produtos cosméticos antienvelhecimento. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi obter extrato de folhas de *Morus nigra* L. por meio da extração com quatro solventes diferentes, para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais, de flavonóides totais e o potencial antioxidante e para isso, foram utilizados métodos espectrofotométricos. Os resultados mostraram que o extrato hidroetanólico 70% apresentou atividade antioxidante considerável em relação aos outros extratos estudados, indicando a capacidade de inibir os radicais livres; porém, estudos complementares são necessários para garantir a eficácia e segurança da formulação cosmética.

**Palavras-chave:** *Morus nigra* L.. Antioxidante. Cosméticos. Antienvelhecimento

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- <i>Morus nigra</i> L. ....                                                                                                                                                   | 17 |
| Figura 2- Curva analítica do ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais.                                                                                            | 33 |
| Figura 3- Curva analítica da quercetina para determinação dos compostos flavonoides .....                                                                                              | 36 |
| Figura 4- Comparação de compostos fenólicos e flavonoides entre os quatro extratos de folhas de <i>Morus nigra</i> .....                                                               | 39 |
| Figura 5- Porcentagem de captura do ácido ascórbico pelo método do radical DPPH <sup>•</sup> .....                                                                                     | 41 |
| Figura 6- Curva analítica do extrato hidroetanólico 50 pelo método do radical DPPH <sup>•</sup> .....                                                                                  | 42 |
| Figura 7- Curva analítica do extrato hidroetanólico 70 pelo método do radical DPPH <sup>•</sup> .....                                                                                  | 42 |
| Figura 8- Curva analítica do extrato hidroetanólico 90 pelo método do radical DPPH <sup>•</sup> .....                                                                                  | 43 |
| Figura 9- Curva analítica do extrato aquoso pelo método do radical DPPH <sup>•</sup> .....                                                                                             | 43 |
| Figura 10- Curva analítica do ácido ascórbico pelo método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                          | 46 |
| Figura 11- Curva analítica do extrato hidroetanólico 50 pelo método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                | 47 |
| Figura 12- Curva analítica do extrato hidroetanólico 70 pelo método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                | 47 |
| Figura 13- Curva analítica do extrato hidroetanólico 90 pelo método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                | 48 |
| Figura 14- Curva analítica do extrato aquoso pelo método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                           | 48 |
| Figura 15- Estrutura químicas dos radicais ABTS <sup>•+</sup> e DPPH <sup>•</sup> .....                                                                                                | 40 |
| Figura 16- Média das porcentagens de captura do radical ABTS <sup>•+</sup> pelo extrato extrato hidroetanólico 70% de <i>Morus nigra</i> para avaliação da linearidade do método ..... | 51 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1- Quantidade de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de folha de <i>Morus nigra</i> em mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100 mg de extrato .... | 34 |
| Tabela 2- Quantidade de flavonoides totais presentes nos extratos de folha de <i>Morus nigra</i> .                                                                                            | 37 |
| Tabela 3- Valores de CE <sub>50</sub> para os quatro extratos de <i>Morus nigra</i> pelo método do radical DPPH* .....                                                                        | 44 |
| Tabela 4 - Valores de CE <sub>50</sub> para os extratos pelo método do radical ABTS* <sup>+</sup> .....                                                                                       | 49 |
| Tabela 5- Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i> .....                                           | 53 |
| Tabela 6- Avaliação da repetitividade do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i> .....                                                                            | 54 |
| Tabela 7- Avaliação da precisão intermediária do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i> .....                                                                    | 54 |
| Tabela 8- Avaliação da robustez do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i> .....                                                                                  | 55 |
| Tabela 9- Avaliação da exatidão do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i> .....                                                                                  | 56 |
| Tabela 10- Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i> .....                                                            | 56 |
| Tabela 11- Composição percentual das formulações .....                                                                                                                                        | 58 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABTS:** ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CE<sub>50</sub>:** concentração efetiva 50, necessária para capturar 50% de espécies reativas ou para causar 50% de morte celular

**DPPH:** 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

**E<sub>50</sub>:** extrato hidroetanólico 50% de folhas de *Morus nigra* L.

**E<sub>70</sub>:** extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* L.

**E<sub>90</sub>:** extrato hidroetanólico 90% de folhas de *Morus nigra* L.

**E<sub>Aq</sub>:** extrato aquoso de folhas de *Morus nigra* L.

**O/A:** óleo em água

**O<sup>•</sup>:** radical superóxido

**OH<sup>•</sup>:** radical hidroxila

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**SOD:** superóxido dismutase

**CAT:** catalase

**GPx:** glutathione peroxidase

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** carbonato de sódio

**AlCl<sub>3</sub>:** cloreto de alumínio

**CH<sub>3</sub>COONa:** acetato de sódio

**q.s.p.:** quantidade suficiente para

**UV:** radiação ultravioleta

**UV/Vis:** Espectroscopia no ultravioleta visível

## SUMÁRIO

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO .....                                                                               | 10 |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                      | 11 |
| Lista de Tabelas .....                                                                     | 12 |
| 1 Introdução .....                                                                         | 9  |
| 1.1 Pele .....                                                                             | 10 |
| 1.1.1 Epiderme .....                                                                       | 10 |
| 1.1.2 Derme .....                                                                          | 11 |
| 1.1.3 Hipoderme.....                                                                       | 12 |
| 1.2 Envelhecimento da pele .....                                                           | 12 |
| 1.3 Radicais Livres .....                                                                  | 12 |
| 1.4 Antioxidantes .....                                                                    | 14 |
| 1.5 Compostos fenólicos e flavonoides.....                                                 | 15 |
| 1.6 <i>Morus nigra</i> L. ....                                                             | 16 |
| 2 Objetivos .....                                                                          | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                                   | 21 |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                                                             | 21 |
| 3 Material e Métodos.....                                                                  | 22 |
| 3.1 Material e Equipamentos .....                                                          | 22 |
| 3.1.1 Material .....                                                                       | 22 |
| 3.1.2 Equipamentos .....                                                                   | 22 |
| 3.2 Métodos .....                                                                          | 22 |
| 3.2.1 Preparo do material vegetal.....                                                     | 22 |
| 3.2.2 Preparação de extratos de folhas de <i>Morus nigra</i> .....                         | 23 |
| 3.2.3 Caracterização do extrato <i>Morus nigra</i> .....                                   | 23 |
| 3.2.4 Determinação do potencial antioxidante .....                                         | 25 |
| 3.2.5 Validação da metodologia.....                                                        | 26 |
| 3.2.6 Desenvolvimento da formulação. ....                                                  | 30 |
| 3.2.7 Incorporação do extrato de folhas de <i>Morus nigra</i> em formulação cosmética..... | 30 |
| 4. Resultados e Discussão .....                                                            | 31 |
| 4.1 Preparo do material vegetal.....                                                       | 31 |
| 4.2 Preparo de extrato de folhas de <i>Morus nigra</i> .....                               | 31 |
| 4.3 Caracterização do extrato <i>Morus nigra</i> .....                                     | 32 |
| 4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....                              | 32 |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.2-Determinação do teor de flavonoides totais .....                                                       | 36 |
| Considerando os resultados apresentados é relevante avaliar a atividade dos extratos como antioxidantes..... | 39 |
| 4.3.3 Determinação do potencial antioxidante .....                                                           | 39 |
| 4.4 Validação da metodologia pelo método do radical ABTS*+ .....                                             | 51 |
| 4.4.1 Linearidade.....                                                                                       | 51 |
| 4.4.2 Limite de detecção e quantificação .....                                                               | 52 |
| 4.4.3 Precisão .....                                                                                         | 53 |
| 4.4.4 Robustez.....                                                                                          | 55 |
| 4.4.5 Exatidão.....                                                                                          | 55 |
| 4.4.6 Especificidade e seletividade.....                                                                     | 56 |
| 4.5- Desenvolvimento da formulação creme base. ....                                                          | 57 |
| 4.6- Incorporação do extrato .....                                                                           | 58 |
| 5 Conclusão .....                                                                                            | 59 |
| 6 Referências Bibliográficas .....                                                                           | 60 |

## 1 Introdução

O processo de envelhecimento pode influenciar no bem-estar e na autoestima da população. Este fato pode estar relacionado com a ascensão do mercado cosmético e com o aumento no consumo de produtos cosméticos, na tentativa de prevenir e reverter os danos do envelhecimento acelerado. Diversas pesquisas refletem uma tendência no uso de produtos naturais, provenientes da biodiversidade brasileira, pois relacionam as plantas como fontes de princípios ativos naturais para uso em produtos cosméticos. Existem evidências que combinações fitoquímicas podem trazer mais benefícios à saúde quando comparadas à utilização de ativos isolados. Os compostos fitoquímicos são os nutrientes bioativos naturais presentes em plantas, frutas, legumes, grãos e outros alimentos (DE KOK et al., 2008; LIU, 2003; ZUCCO et al., 2016).

Muitos estudos envolvendo material vegetal com possível atividade antioxidante permitem o desenvolvimento de formulações para aplicações na indústria alimentícia e cosmética. Assim, a pesquisa científica nessa área é importante para encontrar novas fontes naturais de antioxidantes e alimentos nutracêuticos (MILIAUSKAS et al., 2004).

Atualmente, os produtos cosméticos e cosmeto-dermatológicos estão ganhando destaque devido à aceitação e percepção do público por produtos cosméticos que contenham moléculas bioativas, que são capazes de estimular propriedades benéficas ou evitar algum dano à pele (BUONO et al., 2012).

Os antioxidantes são responsáveis por reduzir ou inibir as lesões causadas por radicais livres durante o metabolismo celular ou pela exposição excessiva a fatores extrínsecos como a exposição à radiação ultravioleta, que acelera o processo de envelhecimento. Diversas pesquisas sobre o gênero *Morus* demonstraram a presença de variados compostos que caracterizam a atividade biológica e farmacológica deste gênero.

## **1.1 Pele**

A pele é o maior órgão do corpo humano, recobre os órgãos internos em uma área de aproximadamente 2m<sup>2</sup> sendo a interface entre o ambiente externo e o corpo (HADGRAFT, 2001; HADGRAFT, 2004). A pele é responsável por proteger a penetração e permeação de agentes externos (por exemplo, agentes infecciosos, luz ultravioleta), perda de água e, também, é o local de ação e rota de entrega de substâncias com atividade terapêutica e cosmética (ASBILL & MICHNIAK, 2000; HADGRAFT, 2001; SPELLBERG, 2000).

A pele também exerce outras funções como: percepção sensorial, homeostase endógena (manutenção da temperatura corporal), metabolismo (síntese da vitamina D) e regeneração tecidual (SPELLBERG, 2000).

As principais células que constituem a pele são: queratinócitos, cuja a função é a produção de queratina e a formação do epitélio estratificado pavimentoso; os melanócitos, que contém os melanossomas onde ocorre a síntese de melanina, componente responsável pela pigmentação da pele; as células de Langerhans, que apresentam papel importante nas reações imunitárias cutâneas, ao capturar os antígenos e apresentá-los aos linfócitos T e, finalmente, as células de Merckel, relacionadas com as percepções sensoriais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SPELLBERG, 2000).

A pele é constituída por duas camadas a epiderme (camada externa) e a derme (camada interna). Abaixo dela encontra-se a hipoderme (tecido subcutâneo).

### **1.1.1 Epiderme**

A epiderme é a camada mais externa da pele (superfície) formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado com função de revestimento cutâneo. É dividida em várias subcamadas: camada basal (estrato germinativo) é a mais profunda e separa a epiderme da derme, além de apresentar alta capacidade proliferativa originando outras células que compõem a epiderme. Em seguida, está presente a camada espinhosa formada por células

mais achatadas morfológicamente (células de Malpighi). A camada granulosa é formada por lipídeos e proteínas com células de caráter achatado; a camada lúcida é constituída por células achatadas e com grânulos proteicos e a camada córnea, que é a mais superficial, é formada por células achatadas com citoplasma queratinoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; OLIVEIRA, 2011).

A principal função da epiderme é a produção do estrato córneo, que é a camada mais superficial da epiderme que age como barreira da pele devido a união dos corneócitos e desmossomos, além da presença dos lipídeos organizados em camadas lamelares, preenchendo os espaços entre os corneócitos, formado basicamente por uma mistura complexa de componentes como ceramidas, colesterol e ácido graxo, em uma proporção equimolar, o que evita a perda de água auxiliando na manutenção da hidratação cutânea (ASBILL; MICHNIAK, 2000; LONG et al., 1985; MADISON, 2003; MARJUKKA et al., 1999; MENON et al., 2012; ZIBOH; CHAPKIN, 1988).

### **1.1.2 Derme**

A derme é a camada mais interna e se apoia na epiderme unindo a pele à hipoderme. É uma região rica em nervos, glândulas sebáceas e capilares que irrigam e nutrem a epiderme. É formada por tecido conjuntivo, que confere elasticidade e sustentação. Nessa camada estão associadas proteínas como: elastina, fibrilina, vitronectina e o componente amiloide-P, fibras de colágeno que garantem a resistência mecânica da pele e envolvem células como os fibroblastos, células endoteliais e mastócitos. Em condições de inflamações, podem ser encontrados, também, macrófagos, linfócitos e leucócitos (ASBILL; MICHNIAK, 2000; CAMPOS, 2010).

A derme é dividida em duas camadas: a camada papilar (superficial) com presença de vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme constituída de fibras finas de colágenos e fibras elásticas frouxas; e a camada reticular localizada abaixo da camada

papilar, é mais espessa, e possui fibras colágenas e elásticas entrelaçadas conferindo sustentação da epiderme (CAMPOS, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; OLIVEIRA, 2011).

### **1.1.3 Hipoderme**

A hipoderme é encontrada abaixo da derme, unindo a derme aos órgãos subjacentes. É um tecido subcutâneo de natureza adiposa, cujas células são envoltas por tecido conjuntivo frouxo. A hipoderme apresenta função energética, proteção mecânica contra choques externos e atua como isolante térmico (CAMPOS, 2010; CUNHA et al., 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SPELLBERG, 2000).

## **1.2 Envelhecimento da pele**

O envelhecimento é o acúmulo progressivo e deletério de alterações nas células e tecidos com o avanço da idade. Podem estar relacionados com fatores genéticos e fatores ambientais, doenças e um processo inato de envelhecimento (HARMAN, 1981; HARMAN, 2003; HARMAN, 2006).

O envelhecimento da pele pode ser classificado em envelhecimento intrínseco (cronológico) que relaciona o processo genético associado a alterações moleculares, que acarretam o envelhecimento, e envelhecimento extrínseco, associado a fatores ambientais como, por exemplo, fotoenvelhecimento, causado por exposição à radiação ultravioleta proveniente do sol (BATISTELA, et al., 2007).

Estudos indicaram uma teoria de envelhecimento baseada no aumento da concentração de radicais livres, que causa estresse oxidativo, resultando na diminuição do metabolismo e, conseqüentemente, na morte celular (HARMAN, 1956).

## **1.3 Radicais Livres**

Os radicais livres incluem átomos ou moléculas com no mínimo um elétron desemparelhado na última camada (por exemplo, o átomo de hidrogênio, íons de metais de

transição e o oxigênio molecular) dessa forma agem recebendo ou doando elétrons alterando o meio ao seu redor e são, normalmente, produzidos como subprodutos do metabolismo celular (MARTELLI; NUNES, 2014; RIBEIRO et al., 2005).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) representam a classe mais importante das espécies reativas gerados e incluem espécies como o ânion radicalar superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MAIA, 2003; VALKO et al., 2007).

Essas espécies reativas instáveis podem reagir rapidamente com outras substâncias do organismo podendo danificar as funções de biomoléculas essenciais como, por exemplo, lipídeos, proteínas e DNA, ocasionando lesão e até morte da celular (BARREIROS et al., 2006; VALKO et al., 2007).

O corpo tem um mecanismo natural de defesa antioxidante contra essas espécies reativas para impedir a ocorrência de danos. Esses agentes são os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) que possuem ação inicial no organismo ao catalisar espécies reativas evitando a formação e o acúmulo do  $O_2^{\cdot-}$  e do  $H_2O_2$ . A defesa não enzimática é formada por uma variedade de substâncias que podem ter origem endógena ou exógena adquirida pela dieta por exemplo, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides, proteínas do plasma, selênio, glutathione e clorofilina (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SIES, 1993).

Quando ocorre desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes devido à geração excessiva de espécies reativas ou pela velocidade de remoção ou neutralização ocorre o estresse oxidativo na célula (BARBOSA et. al., 2010; SIES, 1993).

O estresse oxidativo está relacionado com a geração e propagação de doenças como câncer, diabetes, doenças do sistema imune, inflamações crônicas, doenças cardiovasculares,

envelhecimento e doenças pulmonares (BIANCHI; ANTUNES, 1999; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Para evitar o estresse oxidativo e o desenvolvimento de doenças relacionadas a ele e, também, prevenir o processo de envelhecimento cutâneo, uma importante medida a ser considerada é o consumo de antioxidantes externos que podem ser provenientes da dieta (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLIWELL et al., 1995).

#### **1.4 Antioxidantes**

Os compostos antioxidantes podem agir em diferentes formas no organismo como, por exemplo, atrasando ou inibindo a oxidação lipídica por meio da inibição da iniciação da propagação da cadeia oxidativa, complexando-se com íons metálicos e também eliminando as espécies reativas. Os antioxidantes podem ser endógenos (enzimas) ou exógenos, provenientes da dieta ou de produtos cosméticos e dermatológicos (OTHMAN et al., 2007).

Na área cosmética, o uso de antioxidantes, por via tópica ou oral, apresenta o mesmo objetivo que é evitar o estresse oxidativo das células ocasionado pela formação de espécies reativas pela exposição aos raios UV em excesso ou pelo próprio metabolismo celular (FONTES, 2013).

O ácido ascórbico, (vitamina C), é um importante composto encontrado em vegetais, que apresenta atividade antioxidante prevenindo a formação de radicais livres que são os principais responsáveis pelo efeito da radiação solar no processo de envelhecimento cutâneo. Dessa forma, poderia ser considerado um importante recurso como ingrediente em produtos cosméticos. Porém, a administração tópica deste composto apresenta atividade reduzida devido à instabilidade físico-química, sofrendo oxidação em condições aeróbicas e sob exposição à luz. Para solucionar esse problema, derivados do ácido ascórbico são utilizados nas formulações tópicas. Os extratos vegetais estão sendo propostos como substâncias ativas para utilização em produtos cosméticos com ação antienvelhecimento devido a presença de substâncias

antioxidantes inclusive do ácido ascórbico (AUSTRIA et al., 1997; DALCIN et al., 2003; SCOTTI et al., 2007).

A atividade antioxidante, relacionada aos compostos naturais, que protegem o sistema biológico contra as reações de oxidação, e envolve a formação de espécies reativas de oxigênio, pode ser medida por diversos métodos, dentre eles, os mais utilizados incluem os compostos cromógenos os quais apresenta coloração alterada na presença de antioxidantes, esses radicais são o ABTS<sup>•+</sup> e o DPPH<sup>•</sup> (ARNAO, 2000).

Atualmente, diversas pesquisas e descobertas em torno do uso de ativos antioxidantes possibilitou que as indústrias cosméticas comercializassem produtos com propriedade antienvhecimento, protegendo a pele da exposição excessiva das radiações solares UV um dos principais responsáveis pelo envelhecimento da pele e consequentemente, combatendo as espécies reativas e oxidação de células (FRIES; FRASSON, 2010).

Diferentes partes dos vegetais e extratos vegetais apresentam uma variedade de componentes funcionais, dentre eles compostos com capacidade antioxidante. Os extratos vegetais quando estudados em modelos animais ou celulares demonstram capacidade de neutralizar os radicais livres e, consequentemente, diminuir os danos causados às células. Assim, plantas e extratos vegetais com propriedades antioxidantes estão substituindo os antioxidantes sintéticos, devido às implicações na saúde e na funcionalidade (MOTA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2009).

### **1.5 Compostos fenólicos e flavonoides**

Os compostos fenólicos são formados por grupamentos benzênicos com hidroxilas substituintes e são divididos em flavonoides, que são formados por polifenóis, e não flavonóides, constituídos por fenóis simples ou ácidos (SILVA, 2007).

Compostos fenólicos são metabólicos secundários que atuam como antioxidantes através da remoção ou inativação de radicais livres formados durante as reações oxidativas

por meio da doação de átomos de hidrogênio para essas moléculas e, conseqüentemente, inibindo essa reação (PODSEDEK, 2007).

Os solventes mais utilizados para a extração de compostos fenólicos são água, etanol, acetona, metanol e as misturas aquosas com ou sem ácido. A maioria dos compostos fenólicos são classificados como antioxidantes hidrofílicos (BOEING et al., 2014).

Diversos estudos apontaram a utilização em formulações tópicas de extratos naturais que apresentam compostos fenólicos e flavonoides associados à propriedade antioxidante para prevenir e tratar os danos causados pelos radicais livres (FRIES; FRASSON, 2010).

### **1.6 *Morus nigra* L.**

A espécie *Morus nigra* L. (Figura 1), conhecida como amora preta é pertencente à família *Moraceae* e ao gênero *Morus* que possui cerca de 24 espécies com pelo menos 100 variedades. A amoreira é originária da Ásia, mas pode ser encontrada em diversas regiões tanto nos trópicos como nos hemisférios em regiões tropicais, temperada e subtropical apresentando uma variedade de cultivo por se adaptar em diversas variações climáticas, topográficas e de solos. As árvores possuem boa climatização no Brasil e podem atingir até 9 m de altura com folhas grossas, ovaladas e simples, flores monoicas ou dioicas e frutos de até 2,5 cm com característica de roxo a preto com sabor ligeiramente ácido e adstringente que é explicado pela elevada quantidade dos compostos fenólicos (ERCISLI; ORHAN, 2007; OZGEN et al., 2009; PADILHA et al., 2010; PIEKARSKI, 2013).

**Figura 1-** *Morus nigra* L.



Fonte: PIEKARSKI (2013, p.26)

As espécies mais comuns desse gênero são *Morus alba*, *Morus nigra* e *Morus rubra*. Os frutos, as raízes, as folhas e as cascas da amoreira são usados na medicina popular para tratar diversas doenças devido à presença de compostos como, por exemplo, isoprenoides, que apresentam atividade biológica e farmacológica, além da presença de compostos da classe dos fenólicos como os flavonoides e antocianinas, importantes antioxidantes que estão relacionados a alguns benefícios para a saúde, como redução do risco de doenças coronarianas, acidente vascular cerebral, alguns tipos de câncer e prevenção do envelhecimento. *Morus nigra* L. quando comparadas com as outras espécies do mesmo gênero é a que apresenta maiores teores desses compostos (NOMURA; HANO, 1994; OZGEN et al., 2009; PÉREZ- GREGORIO et al., 2011; PIEKARSKI, 2013).

Segundo dados da literatura, diversos flavonoides foram identificados nos frutos de *Morus nigra* como quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo e quercetina-3-glicosídeo, antocianinas como cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-O-rutinosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-O-rutinosídeo, também foram identificados miricetina, resveratrol e naringenina. Já nas folhas de *Morus nigra* foram encontrados

compostos da classe dos triterpenos e esteroides como ácido betulínico e  $\beta$ -sitostero (AYDIN et al., 2011; DUGO et al., 2001; HASSIMOTTO et al., 2007; PAWLOWSKA et al., 2008).

Chan et al. (2009) identificaram compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato aquoso de folhas de *Morus alba*, identificando os seguintes compostos: ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, epigallocatequina galato, ácido cafeico, epicatequina, rutina, quercetina e naringenina.

Dados da literatura apontaram o uso das raízes das plantas do gênero *Morus* para tratamento anti-hipertensivo, reumatismo, melhora da visão e efeito inibidor da enzima tirosinase envolvida na formação da melanina (PADILHA et al., 2010; PIEKARSKI, 2013)

O fruto da amora preta é usado pela medicina popular para tratar lesões na boca, em estudos utilizando os extratos das frutas foi observado um fator de proteção contra isquemia cerebral e também um resultado efetivo na prevenção do ganho de peso. Outros estudos consideraram as antocianinas presentes nos frutos da amora e demonstraram um efeito terapêutico potencial na prevenção do câncer, ou seja, apresentou efeito antitumoral, além de estudos confirmando o potencial antioxidante. Recentemente esta fruta ganhou uma importância na indústria alimentícia devido a presença das antocianinas. A fruta fresca apresenta estrutura frágil e pouca estabilidade durante o armazenamento, por isso sua comercialização, geralmente, é na forma de suco ou geleia (AYDIN et al., 2011; HUANG et al., 2008; KANG et al., 2006; OZGEN et al., 2009; PÉREZ- GREGORIO, 2011; PENG, et al., 2011).

Dados da literatura evidenciou uma satisfatória utilização de folhas da amora devido suas propriedades hipoglicemiante, hipotensiva, antiaterogênica, diurética e no tratamento de doenças crônicas como câncer e diabetes. Park et al. (2013) avaliaram a atividade anti-inflamatória e citotóxica em macrófagos de extratos das folhas de amoreira utilizando solvente orgânico e foi verificado a efetividade e segurança para esses extratos, podendo ser usados com o propósito terapêutico para doenças inflamatórias; o efeito anti-inflamatório do extrato de folhas de *Morus*

*nigra* foram relacionados principalmente com a presença de terpenóides e esteroides; também foi observado o potencial antioxidante do extrato uma vez que o extrato aquoso aumentou o nível sanguíneo da enzima superóxido dismutase (SOD).

A presença de compostos fenólicos nas folhas também foi relacionada aos resultados satisfatórios na redução de doenças coronarianas. Além disso, na medicina popular é muito comum o uso das folhas da amoreira preta pelas mulheres em menopausa (CHAN et al., 2009; PADILHA et al., 2010b; PARK et al., 2013; VOLPATO et al., 2011; YANG et al., 2011).

Diversos estudos na literatura são encontrados correlacionando a *Morus nigra* e suas propriedades antioxidantes.

Ercisli e Ohan (2008) avaliaram o extrato da fruta de 5 genótipos da espécie *Morus nigra* para entender a variabilidade da amoreira e sugerir a seleção dos genótipos superiores para cultivo comercial, para isso determinaram além do peso, cor e pH, os ácidos orgânicos, atividade antioxidante, diferentes compostos fenólicos e flavonoides, ácidos graxos e ácido ascórbico, dessa forma seria possível cultivar o genótipo de acordo com a característica desejada.

Pawlowska e colaboradores (2008) avaliaram o perfil dos componentes fenólicos do extrato do fruto de *Morus nigra* e compararam com o conteúdo de outras espécies de amoreira como a *Morus alba* evidenciando que os frutos da amoreira são potentes antioxidantes naturais e as diferenças nas composições de flavonoides das frutas não depende somente das espécies, mas também das condições de crescimento como o solo, condições ambientais e diferenças genéticas.

Iqbal et al. (2012) demonstraram resultados superiores para a *Morus nigra* em seu estudo com folhas de 3 variedades de amoreira (*Morus alba*, *Morus nigra*. e *Morus rubra*) quanto a quantidade de compostos fenólicos e potencial antioxidante segundo o método de DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>+</sup>, sugerindo uma significativa propriedade antioxidante.

No estudo feito por Kostić e colaboradores (2013) com os extratos acidificados de etanol, etanol-água (50/50, v/v) e aquoso de frutas congeladas de *Morus nigra* foram

encontrados alto teor de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante indicando o potencial nutritivo e fitomedicinal dos frutos da amora preta.

Sánchez- Salcedo et al. (2015) sugeriram em seu estudo com folhas de *Morus alba* e *Morus nigra* coletadas em Orihuela, na Espanha, que grande quantidade de ácidos cafeoilquínicos e flavonoides foram encontrados quando comparado com as respectivas frutas, assim eles concluíram que as folhas apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante sendo uma fonte promissora de compostos fitoquímicos.

A adequada climatização da amora preta no Brasil, a presença rica de compostos fenólicos e as evidências encontradas na literatura de diversas propriedades, principalmente, de atividade antioxidante dos extratos de folhas e frutos de espécies do gênero *Morus*, explicam a proposta de estudar o extrato das folhas de *Morus nigra* como um ativo antioxidante em formulação cosméticas.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos hidroetanólicos (50 %, 70 % e 90 %) e aquoso de folhas de *Morus nigra* L.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos hidroetanólicos 50%, 70% e 90% e aquoso de folhas de *Morus nigra*;
- determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonóides totais;
- avaliar a atividade antioxidante dos extratos por metodologias “in vitro”;
- selecionar o extrato com maior potencial antioxidante através da comparação dos teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais, além da atividade antioxidante dos extratos;
- desenvolver formulação cosmética contendo os extratos de *M. nigra* para uso facial;
- validar a metodologia analítica para a quantificação do extrato na formulação cosmética.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Material e Equipamentos**

##### **3.1.1 Material**

Folin-Ciocalteu (Imbralab), etanol (Synth; Tec-Lab), ácido gálico (Sigma), carbonato de sódio (Sigma), quercetina (Sigma), cloreto de alumínio (Sigma), acetato de sódio (Spectraum), 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH - Sigma), metanol (Synth), ácido ascórbico (Synth), 2,2'-azinobis- (3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS-Sigma), persulfato de potássio (Synth). Sodium polyacrylate, hydrogenated polydecene, trideceth-6, cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer (and) Dimethicone (and) Laureth-23 (and) Laureth-4, disodium EDTA, phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, dicaprylyl carbonate.

##### **3.1.2 Equipamentos**

Espectrofotômetro UV/Vis (Beckman DU<sup>®</sup> 530), rotaevaporador (IKA<sup>®</sup> RV10), estufa (Fanem modelo 320 SE), liofilizador (Liofilizador E-C Micro Modulyo<sup>®</sup>), balança Semi-analítica BL-3200H, balança Analítica, (Shimadzu modelo Ay 220), geladeira e freezer Consul, peneira (Tamis) granulométrica (menor que 0,59mm), pipetadores de volumes variáveis (Eppendorf), vidrarias e acessórios disponíveis no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus Araraquara.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Preparo do material vegetal**

As folhas de amoreira foram coletadas na cidade de São Lourenço do Turvo. Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de ar circulante a 40° C até que o peso se mantivesse estável. Em seguida, o material seco foi triturado em moinho de facas e passado por tamises para padronização de tamanho de partículas, sendo utilizadas partículas inferiores a 0,59 mm. Em

seguida o material foi acondicionado em recipiente de vidro completamente vedado. Os recipientes foram estocados a  $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ .

### **3.2.2 Preparação de extratos de folhas de *Morus nigra***

A partir das folhas secas de *M. nigra*, foram preparados quatro extratos utilizando diferentes solventes extratores: etanol 50 % ( $E_{50}$ ), etanol 70 % ( $E_{70}$ ), etanol 90 % ( $E_{90}$ ) e água deionizada ( $E_{aq}$ ).

A técnica utilizada para as extrações de soluções hidroetanólicas foi a maceração em proporção de droga vegetal/solvente 1:15 (g/mL) (RADOJKOVIĆ et al., 2012b), durante um período de 96 horas com troca de solvente a cada 24h. A extração com água deionizada foi feita na mesma proporção droga vegetal/solvente, porém, a técnica utilizada foi de infusão.

Os extratos hidroetanólicos obtidos foram submetidos à rotaevaporação para eliminação do etanol e consequentemente redução do volume. Em seguida, os quatro extratos foram liofilizados para obtenção do extrato seco. Os extratos secos foram armazenados em recipiente hermeticamente fechado à temperatura de  $-5^\circ\text{C}$ .

### **3.2.3 Caracterização do extrato *Morus nigra***

#### **3.2.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos totais presente nos extratos das folhas de *Morus nigra* foi determinado pela metodologia analítica fotométrica através do reagente Folin-Ciocalteu e da curva analítica de ácido gálico utilizado como padrão, conforme metodologia descrita por SINGLETON; ROSSI (1965) e KÄHKÖNEN et al. (1999).

Para obtenção da curva analítica padrão do ácido gálico foram adicionados 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v) em tubos de ensaio, seguido pela adição de 400  $\mu\text{L}$  de solução de ácido gálico (0,0 a 5,4  $\mu\text{g/mL}$ ). Em seguida, foram aguardados 8 min para adição de 1,6 mL de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 7,5% (m/v). Os tubos foram agitados e

mantidos em repouso durante 30 minutos. Na sequência, as absorbâncias das soluções foram obtidas em espectrofotômetro UV/Vis em 765 nm e, a equação da reta da curva analítica padrão do ácido gálico foi obtida por regressão linear.

Para os extratos E<sub>50</sub>, E<sub>70</sub>, E<sub>90</sub> e E<sub>Aq</sub> de *Morus nigra* a mesma metodologia foi realizada na concentração de 50 µg/mL. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram apresentados em mg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por 100 g do extrato seco.

### 3.2.3.2 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides dos extratos de folhas de *Morus nigra* foi determinado por metodologia fotométrica e pela curva analítica padrão da quercetina conforme metodologia descrita por Ho et al. (2012).

Para obtenção da curva analítica da quercetina, nos tubos de ensaio foram adicionados 500µL de solução etanólica de quercetina, em seguida, foram colocados 1,50 mL de etanol 95 %, 100 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (10 % m/v), 100µL de solução aquosa de acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) 1 mol/L e 2,80 mL de água destilada para completar o volume de 5,00 mL. Após 30 min foi feita a avaliação da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis em 415 nm e a equação da reta da curva analítica da quercetina foi obtida por regressão linear.

O mesmo procedimento foi feito para os quatro extratos de *Morus nigra* na concentração de 260 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em mg de flavonoides equivalente à quercetina por 100 mg de extrato seco.

### 3.2.4 Determinação do potencial antioxidante

#### 3.2.4.1 Método do radical DPPH<sup>•</sup>

A determinação do potencial antioxidante dos extratos de folhas de *Morus nigra* foi executada pelo método de captura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Chiari et al. (2012).

De acordo com o método, foram adicionados nos tubos de ensaio 1,0 mL de diferentes concentrações de solução aquosa dos extratos, a faixa de linearidade compreendida para o E<sub>50</sub>, E<sub>70</sub>, E<sub>90</sub> e E<sub>Aq</sub> foi de 0 a 160 µg/mL, 0 a 86 µg/mL, 0 a 100 µg/mL e 0 a 150 µg/mL respectivamente. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,004% m/v). As soluções foram armazenados ao abrigo da luz por 30 minutos, e na sequência as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV/Vis a 515 nm. Para o branco da reação foi utilizado 1,0 mL de água destilada em substituição a solução do extrato. O experimento foi feito em triplicata para cada concentração dos quatro extratos. Como padrão de substância antioxidante foi utilizado o ácido ascórbico.

As porcentagens de captura do radical DPPH<sup>•</sup> foram calculadas seguindo a Equação 1 proposta por Molyneux (2004) expressa pela média das absorbâncias das amostras. A partir desses valores, foi possível obter um gráfico de porcentagem de captura do radical DPPH<sup>•</sup> *versus* concentração do extrato de *Morus nigra* e calcular o valor de EC<sub>50</sub> de cada amostra, que representa a concentração necessária do extrato para capturar 50 % dos radicais DPPH presentes na solução.

$$\% \text{ Captura} = \frac{A_{\text{máx}}(\text{branco}) - A(\text{amostra})}{A_{\text{máx}}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

% Captura = porcentagem de captura do radical DPPH<sup>•</sup>;

$A_{\text{máx (branco)}}$  = absorbância do radical DPPH na ausência de amostra em 515 nm;

$A_{\text{(amostra)}}$  = absorbância do radical DPPH na presença de amostra em 515 nm.

#### 3.2.4.2 Método do radical ABTS<sup>•+</sup>

Para determinação do potencial antioxidante dos diferentes extratos de *Morus nigra* pelo método de captura do radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi utilizado o método proposto por Almeida et al. (2013).

Inicialmente foi preparada a solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, solubilizando o sal de ABTS (7 mM) em água, em seguida foi adicionado para cada 5,0 mL dessa solução 88,0 µL de uma solução de persulfato de potássio (140mM). A solução foi mantida ao abrigo da luz por 16 h para a formação do radical.

A solução de radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol até absorbância de  $1,00 \pm 0,05$  em espectrofotômetro UV/Vis a 734 nm. Nos tubos de ensaio foram adicionados 1030 µL da amostra em diferentes concentrações (faixa de linearidade utilizada para os extratos foi de 0 a 51 µg/mL para o E<sub>50</sub>, 0 a 45 µg/mL para o E<sub>70</sub>, 0 a 62 µg/mL para o E<sub>90</sub> e 0 a 60 µg/mL para o E<sub>Aq</sub>) foram adicionados 2000 µL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup> diluído em etanol. Foram aguardados 6 minutos para em seguida medir a absorbância da amostra em espectrofotômetro UV/Vis a 734 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem do radical ABTS<sup>•+</sup> capturado conforme Equação 1, e a partir desses valores foi possível obter um gráfico de % de captura *versus* concentração de cada extrato e calcular o valor de CE<sub>50</sub>, que representa a concentração de extrato necessária para capturar 50 % dos radicais ABTS<sup>•+</sup> presentes na solução. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração dos extratos. O mesmo procedimento foi realizado para o ácido ascórbico usado como padrão antioxidante.

#### 3.2.5 Validação da metodologia

A validação da metodologia foi feita através da quantificação pelo método fotométrico de captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>.

A validação de metodologia é recomendada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para garantir que o método cumpra as exigências e apresente resultados confiáveis. Para avaliar esse método os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, robustez, exatidão e especificidade e seletividade (BRASIL, 2003).

### 3.2.5.1 Linearidade

Para analisar a linearidade do método, três curvas experimentais foram traçadas utilizando o extrato hidroetanólico E<sub>70</sub> de folhas da *Morus nigra*, em uma faixa de concentração que variou de 0 a 44,65 µg/mL. Em cada uma das curvas as concentrações foram preparadas em triplicata. Nos tubos de ensaio foram adicionados água deionizada, a solução do extrato e o radical ABTS<sup>•+</sup> até completar o volume final de 3,030 mL em cada tubo conforme metodologia descrita por Almeida et al. (2013). A reação foi completada no escuro e após 6 min as soluções foram analisadas em espectrofotômetro UV/Vis a 734 nm.

Através da curva analítica que relaciona a porcentagem de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> com concentração do extrato de *Morus nigra* foi possível obter a equação da reta no qual o coeficiente linear deve ser igual ou superior a 0,99 para o método ser linear (BRASIL, 2003).

### 3.2.5.2- Limite de detecção e quantificação

Para estimar o limite de detecção na amostra foi feita a relação de três vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003) através da Equação 2:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de pelo menos 3 curvas analíticas com concentrações próximas ao suposto limite de quantificação

IC = é a inclinação da curva analítica de calibração.

Para determinação do limite de quantificação o cálculo é feito com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003) como demonstrado pela Equação 3:

$$LD = \frac{DPA \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

DPA = desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas analíticas com concentrações próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = inclinação da curva de calibração.

### 3.2.5.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-ocorrida). A porcentagem de desvio padrão foi calculada pela Equação 4:

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

DPR= desvio padrão relativo

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003).

Para obter os resultados da precisão foram utilizadas três concentrações do extrato de *Morus nigra* em triplicata sendo os valores pertencentes ao intervalo linear, nas concentrações média, baixa e alta.

Para a repetibilidade (precisão intra-corrida ou intra-dia) as análises aconteceram no mesmo dia, mas em períodos distintos (manhã e tarde), o equipamento e o analista mantiveram os mesmos.

A precisão intermediária (precisão inter-dia) foi feita em dias diferentes, mas com o mesmo equipamento e analista.

A precisão consiste o método em que o DPR não ultrapassa 5% (BRASIL, 2003).

#### 3.2.5.4 Robustez

Para avaliar a robustez do método e garantir a confiabilidade mesmo em pequenas variações, foi variado o fabricante do etanol durante a diluição do radical ABTS<sup>++</sup>. Foram utilizadas três diferentes concentrações (baixa, média e alta) do extrato hidroetanólico E<sub>70</sub> cada uma com réplica de três e que estivessem de acordo com a faixa de linearidade do método.

O método é robusto quando o valor de DPR é até 5% (BRASIL, 2003).

#### 3.2.5.5 Exatidão

Para avaliar a exatidão foram consideradas três concentrações (12,6; 29,03; 39,99 µg/mL) do extrato de *Morus nigra* pertencente ao intervalo de linearidade do método para relacionar a concentração experimental observada e a concentração teórica. O método é exato quando os valores apresentarem faixa entre 95 e 105% (BRASIL, 2003).

A exatidão é calculada pela Equação 5:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

#### 3.2.2.6 Especificidade e seletividade

Soluções de concentrações baixa, média e alta (2,64; 27,99 e 43,83 µg/mL) do extrato de *Morus nigra* pertencente ao intervalo linear do método foram avaliadas em triplicata quanto a especificidade e seletividade do método, essas soluções foram contaminadas com uma formulação cosmética emulsionada e os resultados obtidos foram relacionados com o da curva de linearidade para analisar se houve interferência dos componentes da formulação na absorbância final do extrato.

A especificidade e seletividade foram expressas como DPR e os valores de DPR igual ou menor que 5% indicam que o método é específico e seletivo (BRASIL, 2003).

### **3.2.6 Desenvolvimento da formulação.**

A formulação obtida foi uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) a frio. O interesse da formulação seria uma emulsão de sensorial de baixa oleosidade uma vez que o destino final era para uso facial. Primeiramente, foi desenvolvida a formulação base que não tem adição de extrato.

### **3.2.7 Incorporação do extrato de folhas de *Morus nigra* em formulação cosmética**

O extrato de folhas de *M. nigra* que apresentou maior atividade antioxidante foi escolhido para incorporar na formulação cosmética para obtenção do produto cosmetodermatológico. A quantidade de 0,5% do extrato de folhas de *M. nigra* foi adicionada na parte aquosa da formulação e incorporada na emulsão pronta. Para determinação da quantidade de extrato que seria utilizada foi considerado o potencial antioxidante.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Preparo do material vegetal

Foram coletados 1.437,09 g de material vegetal fresco, sendo que após o processo de secagem a massa foi de 432,14g, portanto é possível dizer que ocorreu uma perda de aproximadamente 70% de água em relação ao material fresco por secagem e o rendimento foi de aproximadamente 30% (Equação 6). O material seco foi triturado e tamisado obtendo um material com granulometria média de 0,59 mm. O material seco e moído permitiu uma melhor extração devido a maior superfície de contato do material com o solvente extrator. Em seguida o material vegetal foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado à temperatura de  $-5\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

A massa obtida após o processo de secagem das folhas de *Morus nigra* foi de 432,14g, portanto:

$$\begin{array}{l} 1.437,09\text{g (massa inicial)} \text{ -----} 100\% \\ 432,14\text{g (massa após secagem)} \text{ ---- } x \end{array} \quad \text{(Equação 6)}$$

$$X = 30,07\%$$

### 4.2 Preparo de extrato de folhas de *Morus nigra*

Diversos métodos podem ser empregados para preparação do extrato vegetal, sendo que normalmente são utilizados métodos de extração com solventes orgânicos como, por exemplo, o etanol. Quimicamente, é difícil estabelecer o melhor método pois existem diversos fatores que podem influenciar no sucesso da extração. Geralmente, os solventes mais utilizados são etanol e água devido à segurança do uso, disponibilidade, acessibilidade no laboratório e baixo valor agregado (ANDREO & JORGE, 2006; WANG & WELLER, 2006).

Andreo & Jorge (2006) sugeriu a utilização de diferentes polaridades de solventes para facilitar a extração em fontes naturais, pois o potencial antioxidante dos extratos vai

depende do tipo de solvente utilizado devido à polaridade dos compostos presentes no material vegetal.

Dessa forma, os extratos foram preparados conforme metodologia descrita anteriormente utilizando quatro solventes (etanol 50%, etanol 70%, etanol 90% e água deionizada).

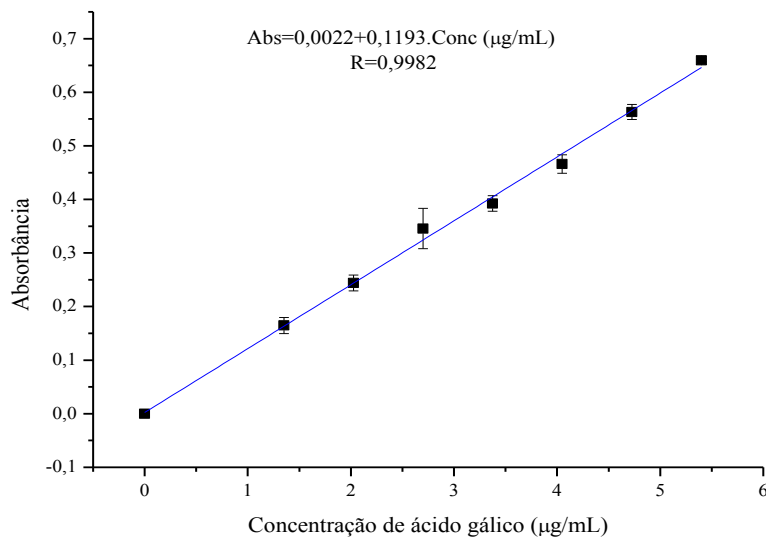
A modificação do método de extração do extrato aquoso (infusão) em relação ao método de obtenção do extrato hidroetanólico (maceração) foi necessária pois na amostra obtida pela técnica de maceração em água foi observado o crescimento de microorganismos no período de 24 a 48 horas. Devido a esse fato a técnica de infusão foi escolhida como método para obtenção do extrato aquoso, pois, o solvente extrator não ficaria em contato com as folhas por tempo suficiente a ponto de iniciar o crescimento dos microorganismos, além disso, o aquecimento inibe esse processo.

### **4.3 Caracterização do extrato *Morus nigra***

#### **4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

A curva analítica do ácido gálico (Figura 2) foi utilizada como padrão para quantificação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de *Morus nigra* avaliado.

**Figura 2-** Curva analítica do ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais.



Os extratos (E<sub>50</sub>; E<sub>70</sub>; E<sub>90</sub>; E<sub>Aq</sub>) foram avaliados na concentração de 50 µg/mL. Os valores de absorbância dos extratos foram utilizados para determinação das concentrações equivalentes ao ácido gálico através da Equação 7. As análises foram realizadas em triplicata para cada extrato, afim de evitar erros.

$$\text{Conc} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{ABS} - 0,022}{0,1193} \text{ (Equação 7)}$$

Em que:

Conc = concentração equivalente ao ácido gálico em µg/mL

ABS = absorbância da amostra

Os valores foram expressos em mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100 g de extrato de *Morus nigra* (CFEAG) como indicado na Tabela 1.

**Tabela 1-** Quantidade de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de folha de *Morus nigra* em mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100 mg de extrato

| <b>Extrato de folha de <i>Morus nigra</i></b> | <b>mg CFEAG/100g de extrato seco (média±DP)</b> |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| E <sub>50</sub>                               | 5778±96 <sup>a</sup>                            |
| E <sub>70</sub>                               | 7175±76 <sup>b</sup>                            |
| E <sub>90</sub>                               | 6164±28 <sup>c</sup>                            |
| E <sub>Aq</sub>                               | 4880±38 <sup>d</sup>                            |

DP: desvio padrão; a,b,c,d: letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes

Pelos resultados apresentados da Tabela 1, é possível verificar que o extrato E<sub>70</sub> apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos totais extraídos, seguido pelo E<sub>90</sub>, que apresentou um valor de, aproximadamente, 1 g a menos de compostos fenólicos que o E<sub>70</sub>, com valores estatisticamente diferentes. O E<sub>Aq</sub> foi o que apresentou menor quantidade de compostos fenólicos extraídos. Os resultados correlacionam com o proposto por Liu et al. (2000), indicando que solventes de alta polaridade, como a água são extratores menos eficientes em extrair compostos fenólicos.

O E<sub>Aq</sub> e o E<sub>50</sub> por apresentarem polaridade mais elevada não se mostraram ser bons sistemas extratores de compostos fenólicos presentes nas folhas de *Morus nigra*.

É possível observar que a extração de composto fenólicos foi facilitada com a mistura de álcool e água. Por criar um meio moderadamente polar, a água pura como solvente pode extrair substâncias não pertencentes à classe de compostos fenólicos, resultando em extratos com impureza, o que dificulta a extração dos fenólicos (VIZZOTTO ET al., 2011). Não existe um método padrão de extração de compostos fenólicos e a literatura reporta diversas condições para isso.

Chaicouski et al. (2014) também demonstraram em seu estudo com erva mate que o extrato hidroalcóolico 70 % mostrou-se mais eficiente para compostos fenólicos quando comparado ao extrato aquoso.

Memon et al. (2010) utilizaram uma mistura de metanol e água para obtenção dos extratos de folhas de *Morus nigra* colhidas na região do Paquistão e encontraram em seus estudos um valor de 1380 mg de compostos fenólicos em 100 g do extrato.

Iqbal et al. (2012) estimaram a quantidade de fenólicos totais presentes no extrato metanólico de folhas de *Morus nigra* colhidas no Paquistão e encontraram um valor de 2437 mg equivalente ao ácido gálico por 100g de extrato.

Radojković et al. (2012) utilizaram amostras de raízes e folhas de 2 espécies de amora, dentre elas, a *M. nigra*. Para a preparação do extrato, foi utilizado etanol 70 % à temperatura de 30°C como solvente extrator e utilizou-se o método fotométrico com reagente de Folin-Ciocalteu para determinação dos compostos fenólicos totais.

Radojković et al. (2012b) examinaram a influência das concentrações do solvente hidroetanólico (40-80 %) na extração dos compostos fenólicos, flavonoides e antioxidantes das folhas de *M. nigra* colhidas na Servia. Os valores encontrados para o teor de compostos fenólicos foram de 1.863 a 5.243 mg de composto equivalente ao ácido clorogênico por 100 g de folhas secas, aumentando de acordo com o aumento da concentração do solvente, sendo que a concentração em torno de 75% foi o que apresentou os melhores resultados.

Sánchez-Macedo et al. (2015) também avaliaram a o teor de compostos fenólicos das folhas de *Morus nigra* colhidas na Espanha. O solvente extrator do pó do material vegetal foi o metanol 80 % acidificado com ácido fórmico, 8 clones de *Morus nigra* foram avaliados e encontraram uma faixa de 1348 a 1613mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100 gramas de extrato seco.

Uma explicação para os diferentes teores de compostos fenólicos presentes nas folhas da amora preta pode estar relacionado com os diferentes métodos e solventes de extração utilizados mas, também, é sugerido que as substâncias fenólicas em folhas podem variar de

acordo com alguns fatores como mudanças de temperatura, poluição, luz UV, ataques de patógenos, além de outros (SÁNCHEZ-MACEDO et al., 2015).

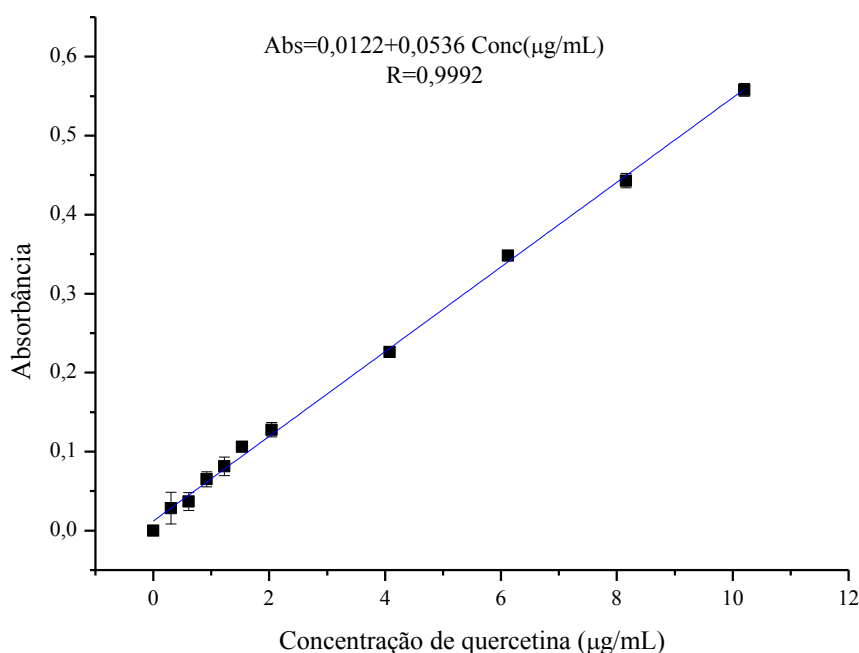
Através desses dados é possível inferir que o extrato que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos ( $E_{70}$ ) pode ser o de maior interesse para os estudos e, conseqüentemente, apresentar a maior atividade benéfica como fitocosmético de propriedade antioxidante. Assim, para complementar essa suposição outras análises foram realizadas.

#### 4.3.2-Determinação do teor de flavonoides totais

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidante, desta forma, surge o interesse em pesquisar nos extratos de *Morus nigra* o teor desses polifenóis para avaliar o potencial do extrato como produto cosmético antienvelhecimento.

Para a quantificação dos flavonoides foi utilizada a curva analítica da quercetina utilizada como padrão, Figura 3.

**Figura 3-** Curva analítica da quercetina para determinação dos compostos flavonoides



Através da curva foi obtida a equação da reta utilizada para calcular a quantidade em mg de flavonoides equivalentes a quercetina em 100 mg de extrato seco de *Morus nigra* (FEQ) representados na Tabela 2. Os extratos (E<sub>50</sub>; E<sub>70</sub>; E<sub>90</sub>; E<sub>Aq</sub>) foram avaliados na concentração de 260 µg/mL.

Para o cálculo foi utilizada a Equação 8:

$$\text{Conc } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{ABS} - 0,0122}{0,0536} \quad (\text{Equação 8})$$

Em que:

Conc = concentração equivalente a quercetina µg/mL

ABS = absorbância da amostra

Os valores de absorbância (A<sub>real</sub>) foram encontrados de acordo com a média entre absorbância do branco (A<sub>branco</sub>) e da amostra (A<sub>amostra</sub>) conforme a Equação 8:

$$A_{\text{real}} = A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} \quad (\text{Equação 8})$$

**Tabela 2-** Quantidade de compostos flavonoides totais presentes nos extratos de folha de *Morus nigra*

| Extrato de folha de <i>Morus nigra</i> | mg FEQ/100g de extrato seco (média± DP) |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| E <sub>50</sub>                        | 869±43 <sup>a</sup>                     |
| E <sub>70</sub>                        | 1998±191 <sup>b</sup>                   |
| E <sub>90</sub>                        | 1603±487 <sup>b</sup>                   |
| E <sub>Aq</sub>                        | 734±103 <sup>a</sup>                    |

DP: desvio padrão; a,b letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes e letras iguais significam valores estatisticamente iguais

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, é possível verificar que em relação aos valores absolutos, o extrato E<sub>70</sub> apresentou a maior quantidade de compostos flavonoides totais seguidos pelo E<sub>90</sub>. O E<sub>Aq</sub> apresentou menor quantidade de compostos flavonoides assim como foi identificado no ensaio de doseamento do teor dos compostos fenólicos. Entretanto, a

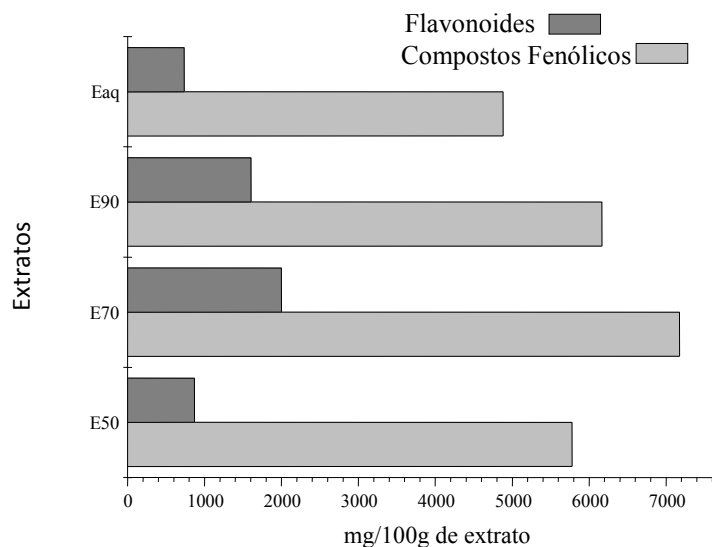
análise estatística demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os valores do E<sub>70</sub> e E<sub>90</sub> assim como não houve diferença estatística significativa para o E<sub>50</sub> e E<sub>Aq</sub>.

Esses resultados demonstraram uma concordância com o proposto por Shouqin et al. (2005) no qual a extração dos flavonoides aumentou com o aumento da concentração do álcool (75 %, v/v) e a medida que aumentou a concentração do etanol para volume acima de 75 % (v/v) a extração dos compostos vai decrescendo lentamente.

Radojković et al. (2012) utilizaram como solvente extrator das folhas de amora o etanol 70% a temperatura de 30°C, sendo que os valores encontrados no teor de flavonoides foram 6736.9 mg de flavonoides equivalentes a rutina por 100 g de extrato seco.

Considerando que o gênero *Morus* apresenta uma diversificada presença de compostos fenólicos que inclui o grupo dos flavonoides (NOMURA et al., 1988) ao comparar os resultados obtidos entre compostos fenólicos totais e flavonoides (Figura 4), pode ser observada coerência nos resultados, uma vez que existe uma concentração maior de compostos fenólicos que inclui a classe dos flavonoides mas, também, pode ser sugerido que o E<sub>70</sub> foi o melhor extrato com atividade benéfica para a pele, devido à presença de maior concentração de compostos extraídos.

**Figura 4-** Comparação de compostos fenólicos e flavonoides entre os quatro extratos de folhas de *Morus nigra*



Considerando os resultados apresentados é relevante avaliar a atividade dos extratos como antioxidantes.

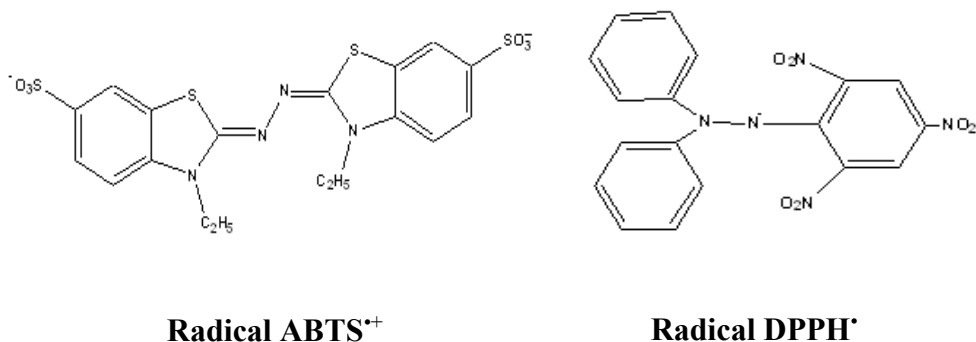
#### 4.3.3 Determinação do potencial antioxidante

Com a presença de compostos fenólicos e flavonoides em todos os extratos (E<sub>50</sub>; E<sub>70</sub>; E<sub>90</sub>; E<sub>Aq</sub>) e com o direcionamento do possível extrato a ser utilizado, foi avaliado o potencial antioxidante de cada extrato por dois métodos (método de captura do radical DPPH<sup>•</sup> e método de captura do radical ABTS<sup>•+</sup>) para complementar a escolha do extrato E<sub>70</sub>.

O princípio que envolve ambos os métodos são as reações de óxido-redução analisadas em espectrofotômetro. A diferença deles está na coloração do radical ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>, no tempo de reação do método de captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> que é menor além de poder ser usado em diferentes faixas de pH (SALABY; SHANAB 2013) e também no emparelhamento de elétrons, o qual está desemparelhado na extremidade da molécula do radical ABTS<sup>•+</sup>, facilitando a reação comparado ao radical DPPH<sup>•</sup>, que apresenta elétron livre na cavidade dentro da sua estrutura química (Figura 5). A estrutura química dos compostos antioxidantes presentes em extratos vegetais também pode influenciar no mecanismo de reação devido o fenômeno de impedimento estérico (ALMEIDA, 2012, 2013). Considerando

esses fatos é esperado que os valores de  $CE_{50}$  obtidos no método pelo DPPH $^{\bullet}$  sejam maiores que os obtidos pelo método de ABTS.

**Figura 5-** Estrutura químicas dos radicais ABTS $^{*\bullet}$  e DPPH $^{\bullet}$



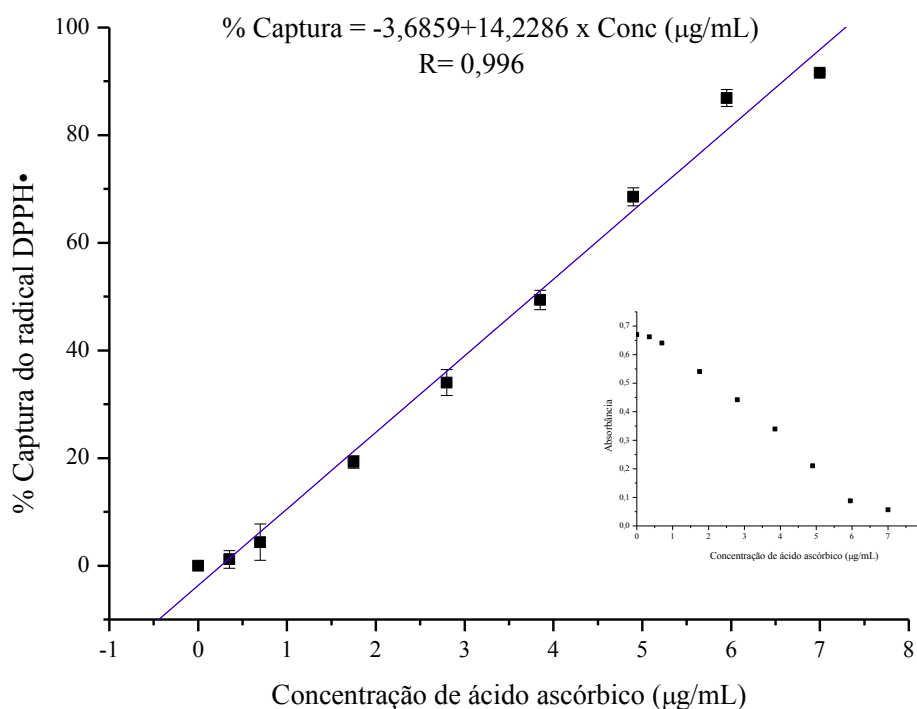
(Fonte: Almeida, 2013)

#### 4.3.3.1-Método do radical DPPH $^{\bullet}$

O radical DPPH $^{\bullet}$  na forma radicalar apresenta coloração violeta e é detectado em espectrofotômetro em 515 nm. Quando substâncias com potencial antioxidante estiveram presentes o radical reage é reduzido, mudando para coloração amarelada.

Primeiramente, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações (0 a 7  $\mu\text{g/mL}$ ) de ácido ascórbico, usado como substância padrão para atividade antioxidante. Através dos resultados encontrados foi traçada a curva analítica do ácido ascórbico Figura 6 que foi utilizada para comparar com o potencial antioxidante do extrato de *Morus nigra*.

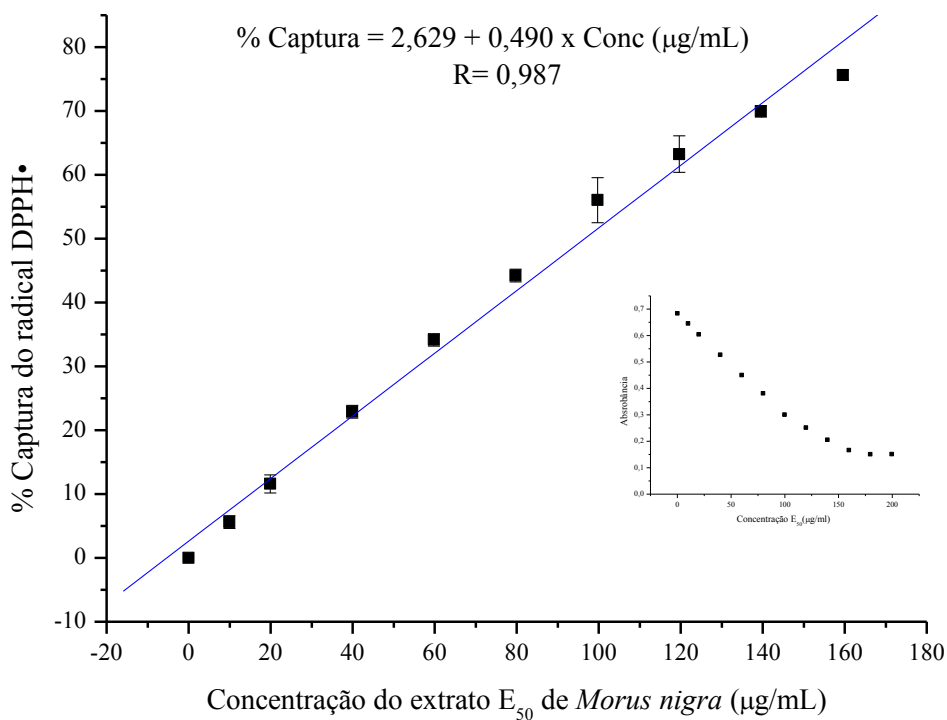
**Figura 6-**Porcentagem de captura do ácido ascórbico pelo método do radical DPPH•



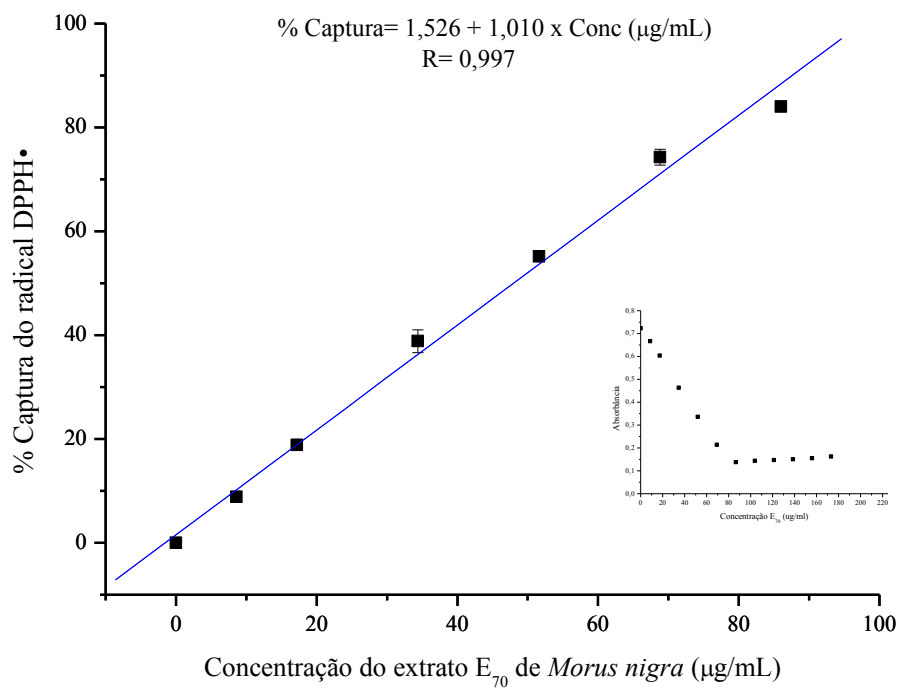
Por meio da curva analítica foi obtida a equação da reta (Figura 6) que permitiu calcular o valor de  $CE_{50}$ , correspondente à quantidade de ácido ascórbico que capturaria 50% dos radicais DPPH• presente na solução, esse valor foi de  $3,77 (\pm 0,09) \mu\text{g/mL}$ .

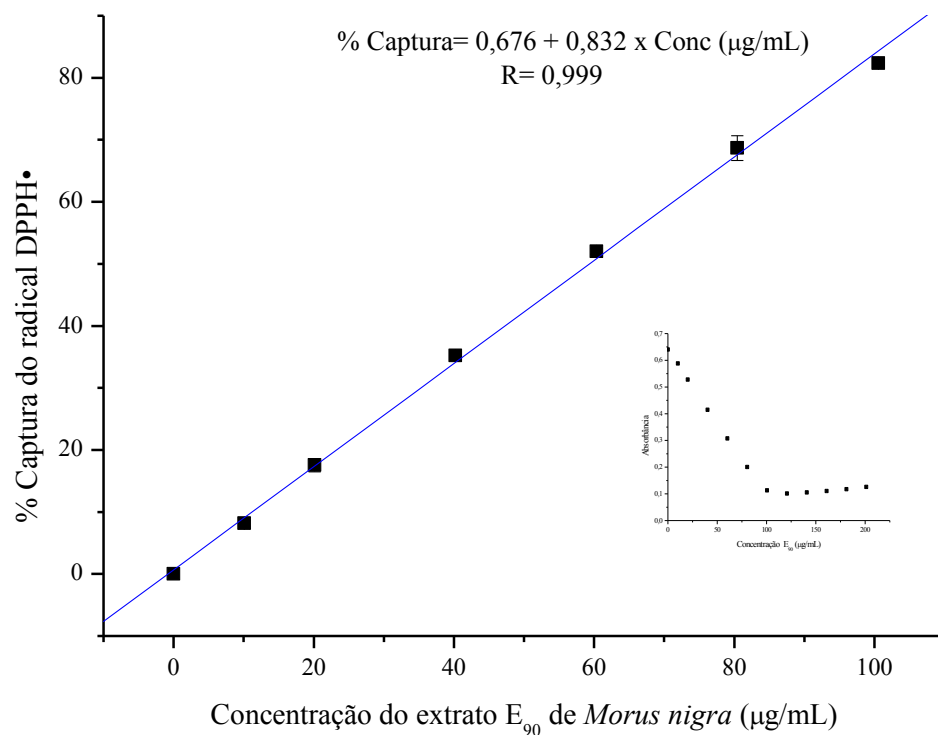
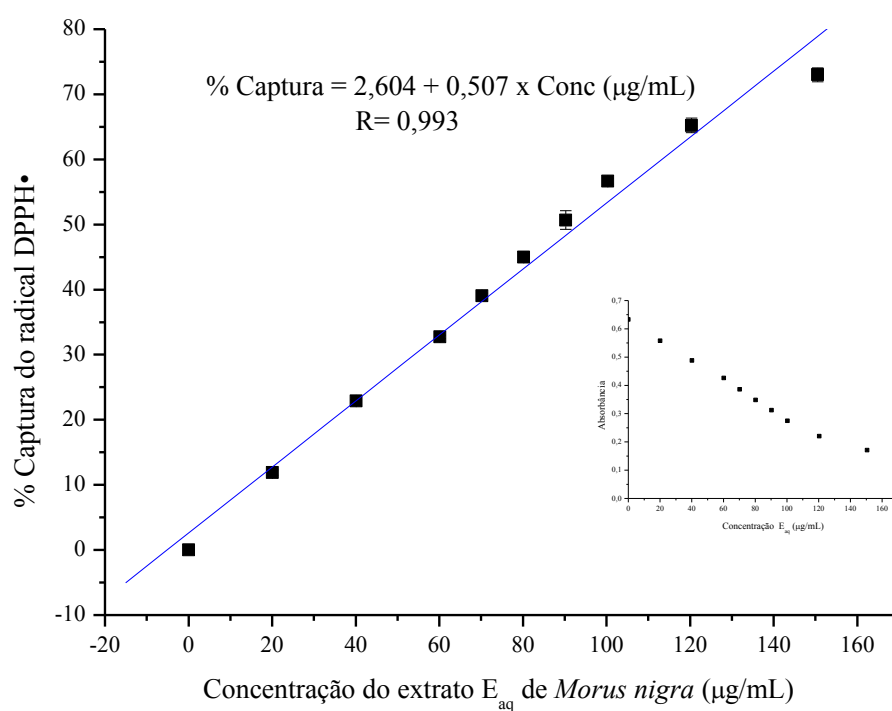
Posteriormente os extratos  $E_{50}$ ,  $E_{70}$ ,  $E_{90}$  e  $E_{Aq}$  foram avaliados em triplicata pelo método de captura do radical DPPH para determinar o potencial antioxidante. Através da curva analítica dos extratos  $E_{50}$  (Figura 7),  $E_{70}$  (Figura 8),  $E_{90}$  (Figura 9) e  $E_{Aq}$  (Figura 10) obtida pela porcentagem de captura do radical DPPH• *versus* concentração do extrato foram calculadas as equações da reta de cada um dos extratos para o cálculo do  $CE_{50}$ .

**Figura 7-** Curva analítica do extrato hidroetanólico 50 % pelo método do radical DPPH



**Figura 8-** Curva analítica do extrato hidroetanólico 70 % pelo método do radical DPPH\*



**Figura 9-** Curva analítica do extrato hidroetanólico 90 % pelo método do radical DPPH•**Figura 10-** Curva analítica do extrato aquoso pelo método do radical DPPH•

A Tabela 3 corresponde à quantidade de extrato necessária para capturar 50 % dos radicais livres presentes na solução de cada extrato estudado.

**Tabela 3-** Valores de CE<sub>50</sub> para os quatro extratos de *Morus nigra* pelo método do radical DPPH

| Extrato de folha de <i>Morus nigra</i> | CE <sub>50</sub> (µg/mL) (média ±DP) |
|----------------------------------------|--------------------------------------|
| E <sub>50</sub>                        | 96,58 ± 0,59 <sup>a</sup>            |
| E <sub>70</sub>                        | 47,98 ± 0,47 <sup>b</sup>            |
| E <sub>90</sub>                        | 59,32 ± 0,68 <sup>c</sup>            |
| E <sub>Aq</sub>                        | 93,53 ± 0,52 <sup>d</sup>            |

DP: desvio padrão; a,b,c,d: letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

A análise dos valores encontrados na Tabela 3 mostrou diferentes valores de CE<sub>50</sub> para cada extrato. O E<sub>70</sub> apresentou o melhor potencial antioxidante visto que possui o menor CE<sub>50</sub>, ou seja, uma menor quantidade do extrato E<sub>70</sub> necessária para capturar 50 % dos radicais presentes na solução. Este resultado já era supostamente esperado uma vez que esse extrato apresentou o maior teor de componentes fenólicos totais e flavonóides totais podendo existir uma correlação entre eles. Na literatura essas evidências foram observadas por: Silva (2007) que encontrou uma significativa correlação entre capacidade antioxidante e presença de fenólicos totais nos frutos estudados de amora preta e morango, da mesma forma Reyes Carmona et al. (2005) demonstraram a correlação da capacidade antioxidante com o teor de polifenóis nos extratos da fruta da amora preta *Rubus sp.*, e por fim Jiao & Wang (2000), também demonstraram que amora preta teve atividade antioxidante positivamente correlacionada com o conteúdo de fenólicos totais ou antocianinas.

O E<sub>50</sub> apresentou a menor atividade antioxidante, porém, esse extrato não foi o que apresentou o menor teor de compostos fenólicos e flavonoides, esse fato pode estar

relacionado com a estrutura química dos componentes extraídos pelo extrato E<sub>50</sub> que pode ter apresentado impedimento estérico ao reagir com o radical DPPH<sup>•</sup> ou a presença de algum fitoquímico que pode ter influenciado na atividade antioxidante (MOURE et al., 2001; VIZZOTTO et al., 2012).

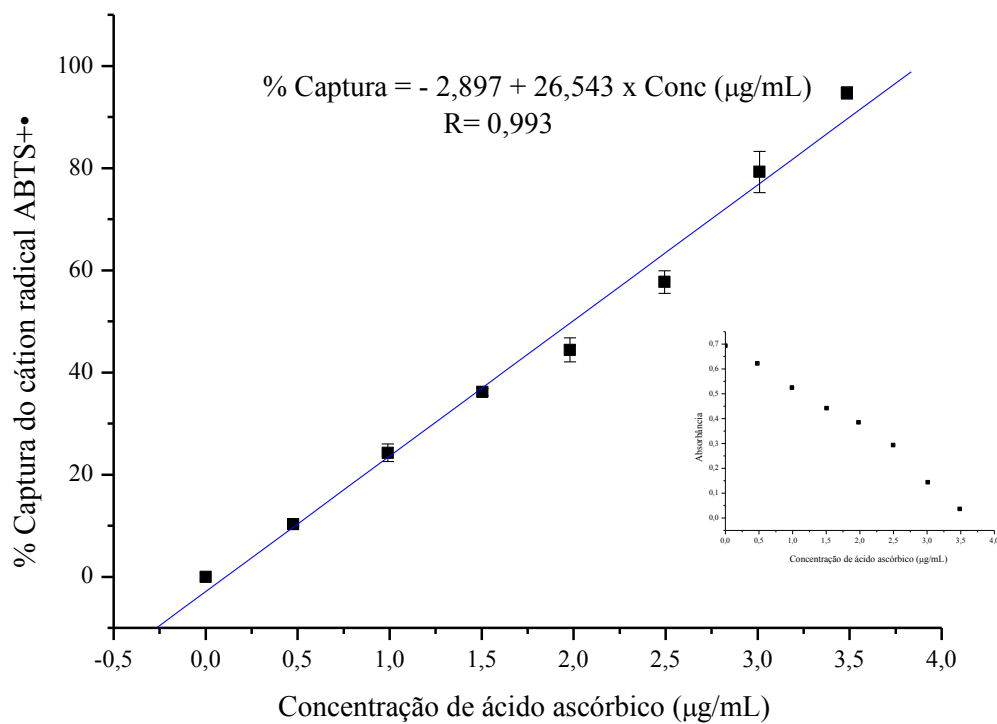
Apesar do valor de CE<sub>50</sub> do ácido ascórbico usado como antioxidante padrão ser quase 13 vezes inferior ao valor de CE<sub>50</sub> do E<sub>70</sub>, que apresentou o menor valor entre os extratos estudados, é sugerido que o extrato possui um potencial para ser utilizado como ativo antioxidante, pois o extrato deve conter várias substâncias fitoquímicas provenientes da composição das folhas de *Morus nigra* que podem atuar em conjunto, aumentando os efeitos benéficos para uso cosmético, além de, possivelmente ser mais estável que o ácido ascórbico.

#### **4.3.3.2 Método do radical ABTS<sup>•+</sup>**

A atividade antioxidante dos extratos, também foi determinada pelo método de captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> que quando oxidado apresenta coloração verde e ao entrar em contato com substâncias com potencial antioxidante, o radical é reduzido e se torna incolor.

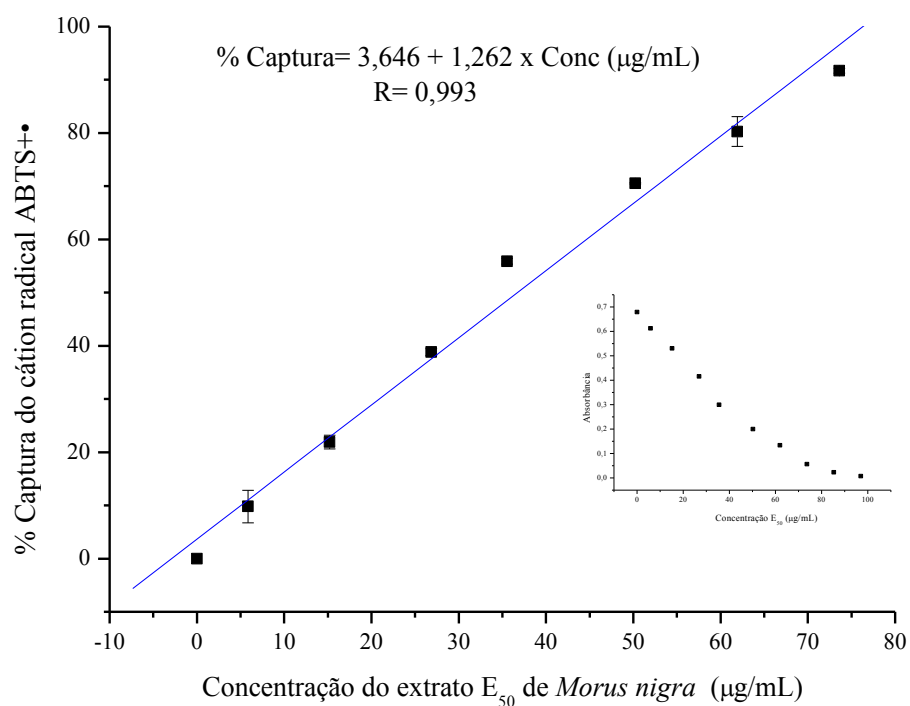
Assim como para o método do radical DPPH<sup>•</sup> a substância padrão antioxidante utilizada foi o ácido ascórbico. Na figura 11, é possível observar a curva analítica do ácido ascórbico (0 a 7,0 µg/mL) o qual foi usada para comparar com o potencial antioxidante do extrato de *Morus nigra*. Pela equação da reta foi calculado o valor de CE<sub>50</sub>, que corresponde à quantidade de ácido ascórbico necessária para capturar 50 % dos radicais ABTS<sup>•+</sup> em solução. O valor de CE<sub>50</sub> obtido para o ácido ascórbico foi 1,99 (±0,02) µg/ml.

**Figura 11-** Curva analítica do ácido ascórbico pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>

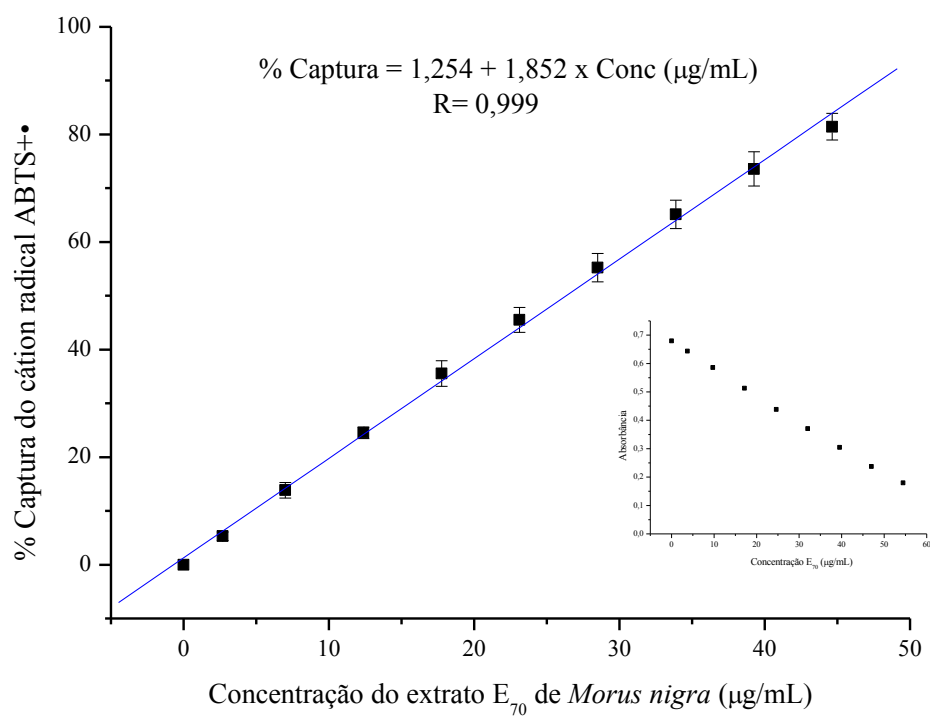


Em seguida os extratos E<sub>50</sub> (Figura 12), E<sub>70</sub> (Figura 13), E<sub>90</sub> (Figura 14) e E<sub>Aq</sub> (Figura 15) foram avaliados pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup> para determinar o seu potencial antioxidante seguindo o mesmo procedimento.

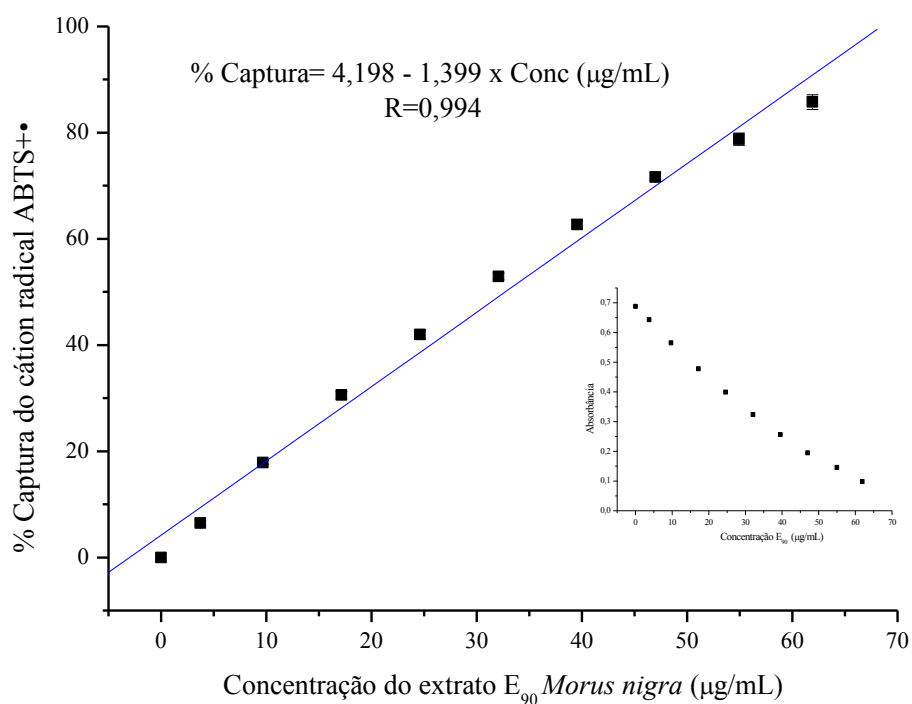
**Figura 12-** Curva analítica do extrato hidroetanólico 50 % pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>



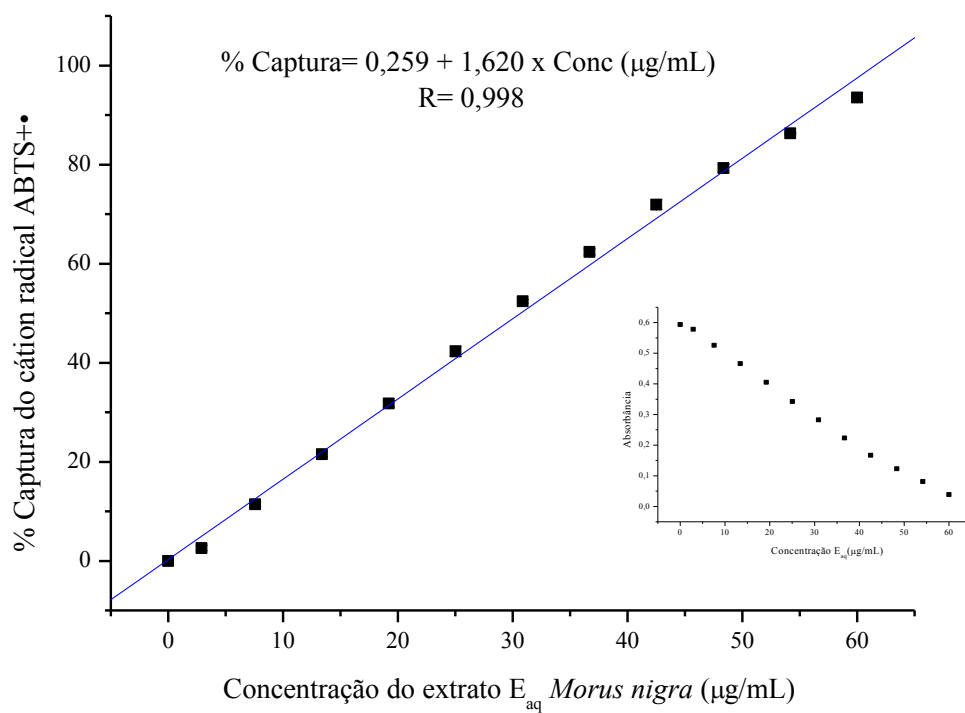
**Figura 13-** Curva analítica do extrato hidroetanólico 70 % pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>



**Figura 14-** Curva analítica do extrato hidroetanólico 90 % pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>



**Figura 15-** Curva analítica do extrato aquoso pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>



Através das curvas analíticas de cada extrato foram encontradas as equações da reta que permitiram calcular o  $CE_{50}$  para cada um dos extratos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Valores de  $CE_{50}$  para os extratos pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>

| Extrato de folhas de <i>Morus nigra</i> | $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) (média $\pm$ DP) |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|
| E <sub>50</sub>                         | 36,72 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>                   |
| E <sub>70</sub>                         | 26,35 $\pm$ 1,25 <sup>b</sup>                   |
| E <sub>90</sub>                         | 32,73 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>                   |
| E <sub>Aq</sub>                         | 30,7 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>                    |

DP: desvio padrão; a,b,c,d: letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes

Os valores de  $CE_{50}$  obtidos por esse método são inferiores aos obtidos pelo método de captura do radical DPPH, isso pode ser explicado pela interferência na reação causada pela diferença nas estruturas químicas dos radicais (Figura 5), os compostos de caráter antioxidante presentes nos extratos, por exemplo, compostos fenólicos, podem apresentar impedimento estérico, facilitando a reação com o radical ABTS<sup>•+</sup> pois a disposição do seu elétron livre não se encontra na cavidade estrutural como acontece no radical DPPH<sup>•</sup> (ALMEIDA, 2012, 2013; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2008).

Floege et al. (2011) demonstraram que o potencial antioxidante de algumas frutas, legumes e bebidas estudadas apresentaram um valor mais expressivo pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup> quando comparado com o DPPH<sup>•</sup>. Segundo a pesquisa, os antioxidantes hidrofílicos e com maior pigmentação foram melhor expressos por esse método.

Sánchez- Salcedo et al. (2015, 2015b) identificaram que as folhas dos clones estudados de *Morus nigra* e *Morus alba* apresentaram maiores valores de capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> quando comparados com os mesmos clones das frutas.

Iqbal et al. (2012) demonstraram que a *Morus nigra* obteve o maior teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante pelos métodos de captura dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> quando comparado aos extratos metanólicos das folhas de outras duas variedades de amora. Foram utilizados três métodos para avaliar o potencial antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) no qual houve correlação apenas entre os métodos de DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, indicando que os componentes presentes podem apresentar atividades diferentes diante de diversos ensaios.

Ningsih e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antioxidante de 4 tipos de folhas da planta *Chrysophyllum cainito* L. utilizando diferentes solventes extratores (etanol 96 %, 70 %, 50 %, acetona 96 %, 70 % e 50%) sendo que o extrato etanol 70% também foi o que apresentou a maior atividade antioxidante.

O E<sub>70</sub> foi o que apresentou o menor valor CE<sub>50</sub>, conseqüentemente é o extrato que apresentou a maior atividade antioxidante, ou seja, uma menor quantidade do extrato E<sub>70</sub> é necessária para capturar 50 % dos radicais presentes na solução. O E<sub>50</sub> apresentou a menor atividade antioxidante para ambos os métodos.

O valor encontrado de CE<sub>50</sub> do ácido ascórbico usado como antioxidante padrão é menor quando comparado aos valores encontrado para os extratos por ambos os métodos (DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>), isso significa que requer uma menor concentração de ácido ascórbico para atingir a atividade em relação aos extratos. O ácido ascórbico possui poder redutor prevenindo a oxidação no meio celular (COUTO; CANNIATTI- BRAZACA, 2010). Porém, mesmo o ácido ascórbico sendo uma referência em relação à atividade antioxidante, o seu uso em produtos finalizados é dificultado pela baixa estabilidade química. Desta forma, a solução para a instabilidade seria sintetizar novos derivados ou utilizar extratos naturais que apresentem compostos antioxidantes (DALCIN et al., 2003). Por esse motivo os estudos com extratos vegetais que apresentam atividade antioxidante, são de grande importância, e essa atividade pode estar relacionada com vários compostos presentes que podem atuar em

sinergia possibilitando o desenvolvimento de produtos cosméticos com maiores benefícios uma vez que existem evidências de maior eficiência na proteção contra enfermidades por combinações fitoquímicas quando comparadas ao composto isolado (DE KOK et al., 2008).

Os resultados obtidos puderam inferir que o E<sub>70</sub> é o mais promissor para ser utilizado em produtos cosmeto-dermatológicos, pois apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais e o maior potencial antioxidante nos dois métodos avaliados.

#### **4.4 Validação da metodologia pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>**

A validação da metodologia visa estabelecer por meio de testes laboratoriais que a utilização do método proposto cumpre os requisitos para a aplicação pretendida, garantindo a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; BREIER, 2007; INMETRO, 2007; RANDAU et al., 2005).

O método realizado foi o proposto pela Resolução-RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

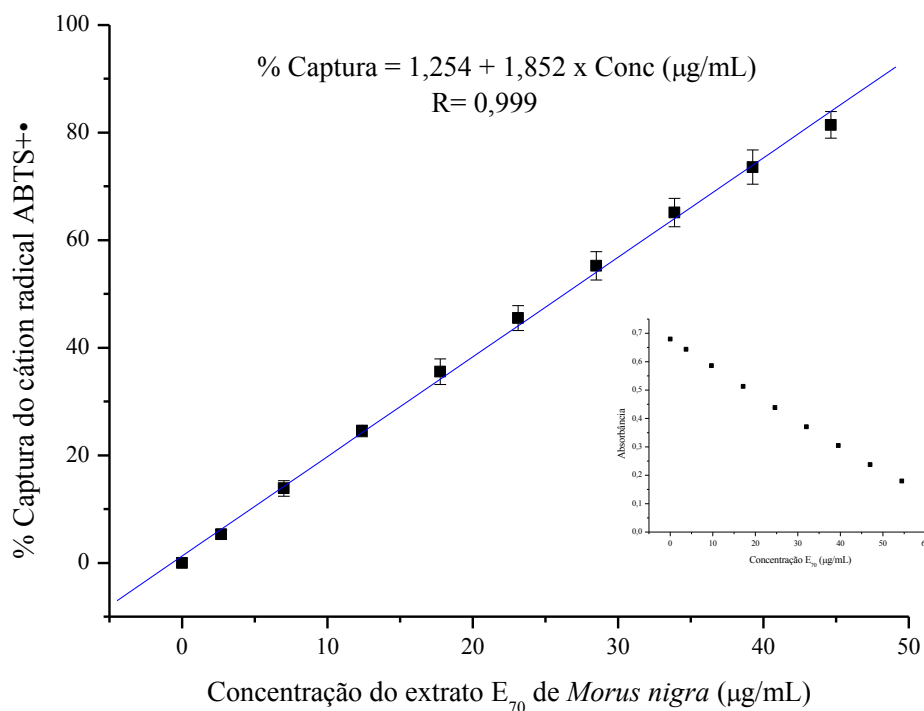
Portanto, foi realizada a validação da metodologia pelo método de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> utilizando o extrato E<sub>70</sub> de *Morus nigra*, o mais promissor dentre os extratos, para verificar se o método utilizado foi apropriado para o estudo e avaliação do potencial antioxidante uma das principais atividades estudadas nesse trabalho.

##### **4.4.1 Linearidade**

Linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de tempo especificado (BRASIL, 2003).

Foi construída a média de três curvas analíticas da porcentagem de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> pela concentração de extrato E<sub>70</sub> de *Morus nigra* e por regressão linear foi obtida a equação da reta da Figura 16.

**Figura 16-** Média das porcentagens de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> pelo extrato extrato hiroetanólico 70% de *Morus nigra* para avaliação da linearidade do método



Através do gráfico é possível observar que o valor de correlação ( $R^2$ ) é de 0,999 portanto, o método é considerado linear uma vez que Brasil (2003) propõe um valor de  $R^2$  acima de 0,99. A intersecção com o eixo y é 1,2538 e o coeficiente angular é 1,8520.

#### 4.4.2 Limite de detecção e quantificação

Foi determinado o limite de detecção que é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado pelo método em questão (BRASIL, 2003).

Também foi determinado o limite de quantificação que é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

Os valores foram calculados conforme procedimento descrito anteriormente utilizando as Equações 2 e 3 e as 3 curvas analíticas realizadas no teste de linearidade. Os resultados estão representados na tabela 5:

**Tabela 5-** Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*

|                                                  |          |
|--------------------------------------------------|----------|
| <b>Curva analítica 1 (Intercepto com eixo Y)</b> | 1,6458   |
| <b>Curva analítica 2 (Intercepto com eixo Y)</b> | 0,7303   |
| <b>Curva analítica 3 (Intercepto com eixo Y)</b> | 1,3853   |
| <b>Desvio Padrão</b>                             | 0,471704 |
| <b>Inclinação da curva</b>                       | 1,852    |
| <b>Limite de detecção (µg/mL)</b>                | 0,764099 |
| <b>Limite de quantificação (µg/mL)</b>           | 2,546995 |

Assim como demonstrado na Tabela 5, a concentração mínima detectável pelo método proposto é de 0,76 µg/mL e a menor quantidade capaz de ser detectada com exatidão e precisão aceitável é de 2,55 µg/mL.

#### 4.4.3 Precisão

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

Foram avaliados a repetibilidade ou precisão intra-córidas; precisão intermediária ou precisão inter-córidas.

Para a repetibilidade ou precisão intra-córidas foram avaliadas três concentrações da curva analítica. Para que o método seja considerado preciso, os valores de desvio padrão relativo (DPR) não podem ultrapassar 5 % (BRASIL, 2003). A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para avaliação da repetibilidade do método.

**Tabela 6-** Avaliação da repetibilidade do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*

|           | <b>CT</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>CE 1</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>CE 2</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>CE 3</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio</b> | <b>DPR %</b> |
|-----------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>C1</b> | 12,37                       | 13,06                         | 13,06                         | 12,98                         | 12,46        | 0,55          | 4,41         |
| <b>C2</b> |                             | 11,94                         | 11,57                         | 12,24                         |              |               |              |
| <b>C1</b> | 23,13                       | 24,63                         | 24,56                         | 24,88                         | 23,45        | 1,16          | 4,95         |
| <b>C2</b> |                             | 22,52                         | 21,64                         | 22,76                         |              |               |              |
| <b>C1</b> | 44,65                       | 45,44                         | 43,41                         | 42,69                         | 43,09        | 1,38          | 3,20         |
| <b>C2</b> |                             | 42,03                         | 41,46                         | 41,95                         |              |               |              |

CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; C1: Valor obtido na leitura do período 1; C2: Valor obtido na leitura do período 2; DPR: Desvio Padrão Relativo.

Os resultados representados garantiram a repetibilidade do método, já que, todas as concentrações avaliadas, não apresentaram DPR maior que 5%.

Seguindo a metodologia descrita por Brasil (2003), também foi avaliado a precisão intermediária ou inter-corrida no qual os valores de desvio padrão relativo (DPR) não devem ultrapassar os 5% para ter precisão no método.

Os resultados encontrados durante a avaliação da precisão intermediária do método estão na Tabela 7.

**Tabela 7-** Avaliação da precisão intermediária do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*

|           | <b>CT</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>CE 1</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>CE 2</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>CE 3</b><br><b>(µg/ml)</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio</b> | <b>DPR %</b> |
|-----------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>C1</b> | 12,37                       | 13,06                         | 13,06                         | 12,98                         | 12,82        | 0,34          | 2,67         |
| <b>C2</b> |                             | 12,19                         | 12,98                         | 13,06                         |              |               |              |
| <b>C1</b> | 28,51                       | 29,78                         | 30,71                         | 30,63                         | 29,80        | 0,69          | 2,32         |
| <b>C2</b> |                             | 29,44                         | 29,84                         | 29,69                         |              |               |              |
| <b>C1</b> | 39,27                       | 40,86                         | 40,46                         | 40,62                         | 39,99        | 0,61          | 1,53         |
| <b>C2</b> |                             | 39,88                         | 39,26                         | 39,58                         |              |               |              |

CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; C1: Valor obtido na leitura do período 1; C2: Valor obtido na leitura do período 2; DPR: Desvio Padrão Relativo.

Através dos resultados obtidos de valores inferiores a 5 % é sugerido que o método apresentou precisão intermediária.

#### 4.4.4 Robustez

A robustez mede a capacidade de resistir a pequenas variações dos padrões analíticos, constatando a suscetibilidade do método a variações das condições analíticas (BRASIL, 2003).

Para esse teste foi alterado o fornecedor de solvente (etanol), em relação ao utilizado nos outros ensaios da validação do método. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para a robustez do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*.

**Tabela 8-** Avaliação da robustez do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*

| CT      | CE 1    | CE 2    | CE 3    | Média | Desvio | DPR % |
|---------|---------|---------|---------|-------|--------|-------|
| (µg/ml) | (µg/ml) | (µg/ml) | (µg/ml) |       |        |       |
| 2,69    | 2,66    | 2,89    | 2,74    | 2,75  | 0,11   | 3,84  |
| 23,13   | 25,26   | 24,74   | 23,51   | 24,16 | 1,00   | 4,16  |
| 44,65   | 46,89   | 46,89   | 47,37   | 46,48 | 1,23   | 2,66  |

CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; DPR: Desvio Padrão Relativo.

O método foi considerado robusto pois os valores de DPR não ultrapassaram 5 %.

#### 4.4.5 Exatidão

É a proximidade dos valores obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de três concentrações conhecidas (concentrações teóricas) que foram utilizadas para avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico 70 % de *Morus nigra* seguindo a metodologia proposta. Através da equação da reta obtida no teste de linearidade foi possível calcular a concentração experimental e os resultados foram representados na tabela 9.

**Tabela 9-** Avaliação da exatidão do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*

| CT (µg/ml) | CE 1 (µg/ml) | CE 2 (µg/ml) | CE 3 (µg/ml) | Exatidão % |
|------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| 12,6       | 12,12        | 12,82        | 13,75        | 101,79     |
| 29,03      | 29,50        | 29,52        | 29,87        | 101,56     |
| 39,99      | 39,23        | 38,97        | 38,68        | 98,06      |

CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental

O método foi considerado exato pois os valores encontrados estão entre 95 e 105 % (BRASIL, 2003).

#### 4.4.6 Especificidade e seletividade

Especificidade e seletividade consiste em medir, exatamente, um composto na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Soluções do extrato com três concentrações diferentes foram contaminadas com creme base, em seguida foi determinado a atividade antioxidante para encontrar os valores experimentais os quais foram comparados com o valor teórico das concentrações do extrato E<sub>70</sub> que são os valores obtidos durante a preparação da solução. A Tabela 10 apresenta os resultados encontrados.

**Tabela 10-** Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*

| CT<br>(µg/ml) | CE 1<br>(µg/ml) | CE 2<br>(µg/ml) | CE 3<br>(µg/ml) | Média | Desvio | DPR % |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|--------|-------|
| 2,64          | 2,73            | 2,89            | 2,94            | 2,80  | 0,14   | 4,98  |
| 27,99         | 27,95           | 27,91           | 29,41           | 28,32 | 0,73   | 2,58  |
| 43,83         | 45,29           | 45,96           | 44,12           | 44,80 | 0,99   | 2,23  |

CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; DPR: Desvio Padrão Relativo.

O método foi considerado específico e seletivo para o extrato de *Morus nigra*, pois os valores de DPR foram menores que 5 % nas três concentrações avaliadas.

#### 4.5- Desenvolvimento da formulação creme base.

A formulação preparada foi do tipo óleo em água (O/A) e as matérias-primas foram utilizadas de maneira a garantir a viscosidade adequada e um sensorial agradável, de toque seco, seguindo o proposto na literatura (DOW CORNING, 2016), visto que a finalidade do produto final era para área facial. Algumas formulações foram testadas até obter a que mais se enquadrava nas características propostas.

O *Dicaprylyl carbonate* foi usado como emoliente que conferiu toque seco à emulsão O/A e, conseqüentemente, auxiliou no efeito de pele seca aveludada (BASF, 2016).

Como silicone foi usado o *Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer (and) Dimethicone (and) Laureth-23 (and) Laureth-4* que, sensorialmente, auxiliou a conferir o toque aveludado, e, devido à rápida absorção, apresentou uma característica de toque seco (DOW CORNING, 2016; UNIVAR, 2016).

O *Sodium polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6* (Rapithix A-60) é um modificador reológico desenvolvido, principalmente, para uso em processos a frio. Este produto conferiu um ajuste na viscosidade da emulsão O/A preparada a frio. Além disso, pôde garantir um sensorial sedoso e suave para a formulação (ASHLAND, 2016).

O conservante microbiológico de amplo espectro utilizado foi *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben*, pois apresenta efeito bactericida e fungicida em diferentes produtos cosméticos incluindo emulsões O/A (MAPRIC, 2016).

O *Disodium* EDTA foi utilizado para potencializar o sistema conservante da formulação assim como atuar quelando metais (MAPRIC, 2016).

A Tabela 11 apresenta a composição percentual das matérias primas utilizadas no desenvolvimento da formulação.

**Tabela 11-** Composição percentual das formulações

| <b>INCI Name</b>                                                                                            | <b>% Formulação</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>Dicaprylyl carbonate</i>                                                                                 | 3,0                 |
| <i>Sodium polyacrylate, hydrogenated polydecene, trideceth-6</i>                                            | 2,5                 |
| <i>Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer (and) Dimethicone (and) Laureth-23 (and) Laureth-4</i> | 3,0                 |
| <i>Disodium EDTA</i>                                                                                        | 0,1                 |
| <i>Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben</i>            | 0,8                 |
| <i>Aqua q.s.p</i>                                                                                           | 100                 |

#### **4.6- Incorporação do extrato**

Para incorporação do extrato hidroetanólico 70 % (selecionado por apresentar o maior potencial antioxidante) no creme base foi utilizado como critério os valores de  $CE_{50}$  obtido e o pressuposto de que a formulação não liberaria 100 % do ativo.

A concentração de extrato de 0,5% foi determinada para incorporação no creme base, isso corresponde a 5.000  $\mu\text{g}$  de extrato em 1 g da formulação base. Supondo um perfil de liberação com células de difusão de área 1,77  $\text{cm}^2$  sobre a qual fosse colocada uma membrana sintética com 0,3 g de amostra, seria encontrado uma liberação máxima de 1500  $\mu\text{g}$  extrato/ 1,77  $\text{cm}^2$ , portanto se 100 % do ativo fosse liberado, teria 847,46  $\mu\text{g}$  de ativo/ $\text{cm}^2$ . Esse valor de ativo corresponde aproximadamente 18 vezes o valor  $CE_{50}$  encontrado pelo método DPPH $^{\bullet}$  (47,98  $\mu\text{g/mL}$ ) e, aproximadamente, 32 vezes o valor de  $CE_{50}$  encontrado pelo método do ABTS $^{•+}$  (26,35  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 5 Conclusão

Os extratos obtidos a partir das folhas secas de *Morus nigra* apresentaram atividade antioxidante significativa, além da presença de compostos fenólicos e flavonoides. A quantidade de compostos fenólicos e flavonóides, extraídos em cada extrato, apresentou diferentes características provavelmente devido a diferença de polaridades dos solventes utilizados. O E<sub>70</sub> foi o extrato que se demonstrou mais promissor como ativo natural para uso em produtos cosme-to-dermatológicos devido aos maiores resultados de potencial antioxidante encontrados pelo método de captura dos radicais, além do relevante teor de compostos fenólicos e flavonóides, também encontrados. Ao avaliar os resultados e os dados da literatura, pode ser sugerido que o potencial antioxidante nos extratos avaliados poderia ser usado a favor da prevenção do envelhecimento da pele, porém, ensaios de citotoxicidade, liberação do ativo, permeação e atividade antioxidante do fitocosmético devem ser considerados para garantir a segurança e eficácia do uso deste produto.

Com os resultados satisfatórios para o extrato E<sub>70</sub>, este foi eleito para incorporação em formulação cosmética, desenvolvida para uso facial e com matérias primas que garantiram o toque seco e aveludado.

A incorporação do extrato em emulsão cosmética foi realizada com sucesso e aparentemente não houve instabilização do sistema emulsionado, porém seria interessante dar sequência aos estudos após essa incorporação com avaliação da estabilidade da formulação e até mesmo a reologia para garantir a qualidade e a eficácia do produto.

Desse modo, o extrato hidroetanólico 70 % apresenta-se com características consideráveis para ser usado como ativo em formulações cosméticas antienvlhecimento.

## 6 Referências Bibliográficas

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ALMEIDA, M. G. J. **Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum***. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORRÊA, M.A.; CHUNG, M.C.; ISAAC, V.L.B. Determinação da atividade antioxidante do extrato de *Ascophyllum nodosum* para incorporação em base cosmética. **Anais do 26º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2012.

ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORRÊA, M.A.; CHUNG, M.C.; ISAAC, V.L.B. Validation of an Alternative Analytical Method for the Quantification of Antioxidant Activity in Plant Extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, Araraquara, v.32, n.1, p. 90-95, 2013.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Science Technology**, Murcia, v.11, p.419-421, 2000.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, Columbia, v.3, n.1, p. 36-41, 2000.

ASHLAND. **Rapithix™ polímeros**. Application Information. Technical Literature. Disponível em: <[www.ashland.com/products/rapithix-polymers](http://www.ashland.com/products/rapithix-polymers)>. Acesso em: 08 de setembro de 2016.

AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p. 795-801, 1997.

AYDIN, S.; YLMAZ, O.; GOKCE, Z. Effectiveness of matured *Morus nigra* L. (black mulberry) fruit extract on 2,2- dephenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl (OH) radicals as compared to less matured fruit extract. **African Journal of Biotechnology**, v.10 (71), p.16037-16044, 2011.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; OLIVEIRA DE PAULA, S.; MINIM, V.P.R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.23, n.4, Jul/Ago, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, Jan/Fev 2006.

BASF. Cetiol<sup>®</sup> CC **The multifunctional dry emollient**. Disponível em: <[www.carecreations.basf.com/product-formulations/product-highlights/product-highlights-detail/CETIOL%20CC/30527869](http://www.carecreations.basf.com/product-formulations/product-highlights/product-highlights-detail/CETIOL%20CC/30527869)> Acesso em: 05 setembro 2016.

BATISTELA, M.A.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.2, p.59-62, 2007.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os princípios antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, maio/ago, 1999.

BOEIING, J.S.; BARIZÃO, E.O.; COSTA E SILVA, B.; MONTANHER, P.F.; ALMEIDA, V.C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compound and antioxidant capacities from the berrie: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, Maringá, v.8, n.48, 2014.

BUONO, S.; LANGELLOTTI, A.L.; MARTELLO, A.; BIMONTE, M.; TITO, A.; CAROLA, A.; APONE, F.; COLUCCI, G.; FOGLIANO, V. Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. **Archives of Dermatological Research**, v.304, p. 755-764, 2012.

**BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária** Resolução (RE) nº 889, de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.

BREIER, A. R. **Fexofenadina: Validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade**. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CAMPOS, P.M. **Avaliação da atividade inibitória de melanogênese do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi**. 106f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2010.

CHAI COUSKI, A.; ESTINA DA SILVA, J.; FERREIRA DA TRINDADE, J.L.; CANTERI, M.H.G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquidos e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 16, n.1, p. 33-41, 2014.

CHAN, K.C.; HO, H.H.; HUANG, C.N.; LIN, M.C.; CHEN, H.M.; WANG, C.J. Mulberry leaf extract inhibits vascular smooth muscle cell migration involving a block of small GTPase and Akt/NF-kappaB signals. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.57, p. 9147–9153, 2009.

CHIARI, B.G., SEVERI, J.A., PAULI-CREDENDIO, P.A., SYLOS, C.M., VILEGAS, W., CORRÊA, M.A., ISAAC, V.L.B. Assessment of chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v.4, n.5, p.331-336, 2012.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI- BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, supl.1, p. 15-19, maio, 2010.

CUNHA, M.G.; CUNHA, A.L.G.; MACHADO, C.A. Hipoderme e tecido adiposo subcutâneo duas estruturas diferentes. **SurgicalandCosmeticDermatology**, v.6, n.4, p.355-359, 2014.

DALCIN, K.B.; SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S. S. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações e estabilidade. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v.19, n.2, p. 69-79, 2003.

DE KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. **European Journal of Nutrition**, v.47 Suppl, n.2, p.51-9, 2008.

DOW CORNING. **DC 73101 Elastomer Blend HIP Emulsion**. Disponível em < <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/259/6693/Dow-Corning-7-3101-Elastomer-Blend-HIP-Emulsion> > Acesso em 07 setembro 2016.

DUGO, P.; MONDELLO, L.; ERRANTE, G.; ZAPPIA, G.; DUGO, G. Identification of Anthocyanins in Berries by Narrow- Bore High- Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 3987-3992, 2001.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morusalba*), red (*Morusrubra*) and black (*Morusnigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v.103, p. 1380-1384, 2007.

ERCISLI, S. ORHAN, E. Some physic-chemical characteristics of black mulberry (*Morusnigra*L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **ScientiaHorticulturae**, Erzurum, v.116, p. 41-46, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FONTES, I.J.G. **Antioxidantes como substâncias cosmetologicamenteactivas**. 46f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

FRIES, A.T.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revistacontextosaúde**, v.10, n.19, p. 17-23, jul/dez 2010.

FLOEGE, A.; KIM, D.O.; CHUNG, S.J.; KOO, S.L.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidante capacity in popular antioxidant- rich US foods. **Journal of food composition and analysis**, London, v.42, p.1043-1048, 2011.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, Kent, v.224, p.1–18, 2001.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Kent, v.28, p. 291-299, 2004.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v.33, n.7, p.601-617, Jul 1995.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v.11, p. 298- 300, 1956.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Omaha, v.78, n.11, p. 7124-7128, 1981.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, Omaha, v.5, n.5, p. 557-561, 2003.

HARMAN, D. Free radical theory of aging: as update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Omaha v.1067, p. 10-21, 2006.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; Identification and characterization of anthocyanins from wild mulberry (*MorusNigra* L.) growing in Brazil. **Food Science and Technology International**, v.13, p.17-25, 2007.

HUANG, H.P.; SHIH, Y.W.; CHANG, Y.C.; HUNG, C.N.; WANG, C.J. Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p9286-9293, 2008.

HO, Y.-C.; YU, H.-T.; SU, N.-W. Re- examination of Chromogenic Quantitative Assays for Determing Flavonoid Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Taiwan, v.60, p.2674-2681, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO), NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE 008**: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, p.20, 2007.

IQBAL, S.; YOUNAS, U.; SIRAJUDDIN; CHAN, K. W.; SARFRAZ, R. A.; UDDIN, Md. K. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A comparative study. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p. 6651-6664, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**.12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 354-365.

JIAO, H.; WANG, S.Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Beltsville, v. 48, p.5672-5676, 2000.

KANG, T. H.; HUR, J. Y.; KIM, H.B.; RYU, J.H.; Kim, S,Y. Neuroprotective effects of the cyanidin –O-β-D- glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebraleschemia. **Neuroscience Letters**, v.391, p. 168-172, 2006.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p. 3954-3962, 1999.

KOSTIĆ, D.A.; DIMITRIJEVIĆ, D.S.; MITIĆ, S. S.; MITIĆ, M. N.; STOJANOVIĆ, G. S.; ŽIVANOVIĆ, A.V. Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of *Morusnigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. **Tropical Joirnal of Pharmaceutical Research**, Benin, v.12, n.1, p. 105-110, 2013.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.517-520, 2003.

LIU, F. F.; ANG, C. Y. W.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3364-3371, 2000.

LONG, S.A., WERTZ, P.W., STRAUSS, J.S., DOWNING, D.T. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. **Archives of Dermatologic Research**, Iowa, n.277, p. 284-287, 1985.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Iowa, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003

MAIA, M. S. **Espécies reativas do metabolism do oxigênio, antioxidante e função espermática**. 22f. Monografia (Programa de pós-graduação) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Abril/2003.

MARJUKKA SUHONEN, T.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 149-161, 1999.

MEMON, A. A., MEMON, N., LUTHRIA, D.L., BHANGER, M. I., PITAFI, A.A. Phenolics acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*MorusLaevigata W.*, *MorusNigra L.*, *Morus Alba L.*) leaves and fruits grown in Pakistan. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.60, n.1, p.25-32, 2010.

MENON, G. k.; CLEARY, G.W.; LANE, M.E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n.1, p. 3-9, 2012.

Mapric, **Phenoxietanol e parabenos**. Informe técnico. Disponível em <[www.mapric.com.br/anexos/boletim640\\_22082008\\_083625.pdf](http://www.mapric.com.br/anexos/boletim640_22082008_083625.pdf)>. Acesso em: 08 de setembro de 2016.

Mapric. **EDTA**. Informe técnico. Disponível em <[http://www.mapric.com.br/anexos/boletim119\\_03092007\\_085652.pdf](http://www.mapric.com.br/anexos/boletim119_03092007_085652.pdf)>. Acesso em 08 de setembro de 2016.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.66, n.3, Set. 2014.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) forestimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Wiltshire, v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

MOTA, G.S.T.; ARANTES, A.B.; SACCHETTI, G.; SPAGNOLETTI, A.; ZIOSI, P.; SCALAMBRA, E.; VERTUANI, S.; MANFREDINI, S. Antioxidant activity of cosmetic formulations based on novel extracts from seeds of Brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertoll) Kuntza. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v.4, p. 190-202, 2014.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Washington, v. 72, p. 145-171, 2001.

NINGSIH, I.Y.; ZULAIKHAH, S.; HIDAYAT, M.A.; KUSWANDI, B. Antioxidant activity of various Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) leaves extracts from Jember, Indonesia. **International Conference on Food, Agriculture, and Natural Resources**, v.9, p.378-385, 2016.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid- substituted compounds of Moraceous plants. **Natural product report**, v.11, p.205-218, 1994.

NOMURA, T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Funabashi, v. 53, p. 87-201, 1988

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.3, 2009.

OLIVEIRA, L.F. **Análise Morfológica e Imunológica da Pele de acordo com as características epidemiológicas de idosos autopsiados**. 63f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral)- Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Uberaba, 2011.

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, N. A.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, v.100, p. 1523-1530, 2007.

OTUKI, M.F. **Atividade Antiinflamatória Tópica de Extratos e Triterpenos Isolados da *ProtiumKleinii***.121f. Dissertação (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

OZGEN, M.; SERCE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morusnigra* and *Morusrubra* fruits. **ScientiaHorticulturae**, v.119, p. 275-279, 2009.

PADILHA, M.M.; MOREIRA, L.Q.; MORAIS, F.F.; ARAÚJO, T.H.; ALVES-DA-SILVA, G. Estudo Farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Alfenas v.20, n.4, p. 621-626, 2010.

PADILHA, M.M.; VILELA, F.C.; ROCHA, C.Q.; DIAS, M.J.; SONCINI, R.; DOS SANTOS, M.H.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytotherapy research**, v.24, p. 1496-1500, 2010b.

PARK, E.; LEE, S-M. LEE, J.e.; KIM, J-H. Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- Kb. **Journal of Functional Foods**, v.5, p. 178-186, 2013.

PAWLOWSKA, A.M. OLESZEK, W. BRACA, A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.56, p. 3377-3380, 2008.

PENG, C.-H.; LIU, L.-K.; CHUANG, C.-M.; CHYSU, C.-C.; HUANG, C.-N.; WANG, C.-J. Mulberry water extracts possess an Anti- obesity Effect and Ability To inhibit Hepatic Lipogenesis and Promote Lipolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.2663-2671, 2011.

PÉREZ- GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L. M. SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **Food Science and Technology**, v.44, p. 1793-1801, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **International Journal of Food Science & Technology**, Madrid, v.43, p.185-191, 2008.

PIEKARSKI, P. Análise nutricional e fitoquímica de frutos da *Morus nigra* L. 140f. Dissertação (Mestrado em Segurança alimentar e Nutricional) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, Stefanowskiego 4/10, v. 40, p. 1-11, 2007.

RADOJKOVIĆ, M. M. et al. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. **Hemijaska Industrija**, v. 66, n. 4, p. 547-552, 2012b.

RADOJKOVIĆ, M.M.; ZEKOVIĆ, Z.P.; VIDOVIĆ, S.S.; KOČAR, D.D.; MAŠKOVIĆ, P.Z. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. **Hemijaska industrija**, v 66 n. 4, p. 547-552, 2012.

RADOJKOVIĆ, M.; ZEKOVIĆ, Z.; JOKIĆ, S.; VIDOVIĆ, S.; LEPOJEVIĆ, Z.; MILOSEVIĆ, S. Optimizations of solid-liquid extraction of antioxidants from Black Mulberry leaves by response surface methodology. **Food Technology and Biotechnology**, v.50, n.2, p. 167-176, 2012b.

RANDAU, K.P.; MEIRA, J.L.; FARIAS BRAGA, J.M.; MONTEIRO, D.B.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) - Matéria-Prima. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Recife, v. 24, n. 1, p. 104-108, 2005.

REYES-CARMONA, J.; YOUSEF, G.G.; MARTÍNEZ-PENICHE, R.A.; LILA, M.A. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. **Journal of Food Science**, v.70, p.497-503, 2005.

RIBEIRO, S.M.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G; COSTA, N.M.B; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n.3, p133-149, Set/Dez, 2005.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E.M.; MENA, P.; GARCIA- VIGUERA, C.; HERNÁNDEZ, F.; MARTÍNEZ, J.J. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of White (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. **Journal of Functional Foods**, v.18, 9. 1039-1046, 2015.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E.M.; Mena, P.; Garcia- Viguera, C.; Martínez, J.J; Hernández, F. Phytochemical evaluation of White (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. **Journal of functional foods**, v.12, p. 399-408, 2015b.

SALABY, E.A.; SHANNAB, S.M.M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Geo- Marine Sciences**, Giza, v. 42, n.5, p. 556-564, September 2013.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.43, n.2, 2007.

SHOUQIN, Z.; JUN, X.; CHANGZHENG, W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Changchun, v.80, p.50-54, 2005

SILVA, R. S. **Potencial antioxidante correlacionado com fenóis totais e antocianinas de cultivares de amora-preta, mirtilo, morango e pêssego. 62 f.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Macie, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v.215, p.213-219, 1993.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANNA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.669-682, 2010.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, Torrance, v.67, p.477-502, 2000.

UNIVAR. **Emulsões de silicone.** Disponível em: <[www.univar.com/~media/PDFs/BR%20Region%20PDFs/Catalogos/PERSONAL%20CAR E/maio/Lamina%20Dow%20Corning%20-%20Xiameter%202015.ashx](http://www.univar.com/~media/PDFs/BR%20Region%20PDFs/Catalogos/PERSONAL%20CAR E/maio/Lamina%20Dow%20Corning%20-%20Xiameter%202015.ashx)>. Acesso em: 05 de setembro de 2016.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; CRONIN, M.T.D; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VIZZOTTO, M.; RASEIRA, M.C.B.; PEREIRA, M.C.; FETTER, M.R. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura** v.34, n.3, p.853-858, 2012.

VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; SINZATO, S.; CAMPOS, K. E.; RUDGE, M. V. C.; DAMASCENO, D. C. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p. 691- 696, 2011.

WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends Food Science Technology**, Lincoln, v.17, p.300–312, 2006

YANG, M.Y.; HUANG, C-N.; CHAN, K-C.; YANG, Y.-S.; PENG, C-H.; WANG, C-J. Mulberry leaf polyphenols possess antiatherogenesis Effect via Inhibiting LDL Oxidation and Foam Cell Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.1985-1995, 2011.

ZIBOH, V. A.; CHAPKIN, R. S. METABOLISM AND FUNCTION OF SKIN LIPIDS. **PROGRESS IN LIPID RESEARCH**, CALIFORNIA, V. 27, P. 81–105, 1988.

ZUCCO, A.; SANTANA DE SOUZA, F.; ROMEIRO, M.C. **Cosméticos naturais: uma opção sustentável nas empresas.** Encontro Internacional sobre Gestão Empresarial e Meio Ambiente. Disponível em: <[www.engema.org.br/XVIENGEMA/405.pdf](http://www.engema.org.br/XVIENGEMA/405.pdf)> Acesso em: 20 de setembro de 2016.

Araraquara, 13 de janeiro de 2017

De acordo,

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> VERA LUCIA BORGES ISAAC  
Orientadora

JULIANA BRANCO FILA  
Aluna