

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EXTRATO DE folhas de *Morus nigra* L.: PROSPECÇÃO DE NOVO ATIVO E SUA
APLICAÇÃO EM PRODUTO COSMETODERMATOLÓGICO

MARIA GABRIELA JOSÉ DE ALMEIDA CINCOTTO

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EXTRATO DE folhas de *Morus nigra* L.: PROSPECÇÃO DE NOVO ATIVO E SUA
APLICAÇÃO EM PRODUTO COSMETODERMATOLÓGICO

MARIA GABRIELA JOSÉ DE ALMEIDA CINCOTTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção de Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Almeida-Cincotto, Maria Gabriela José de
A447e Extrato de folhas de *Morus nigra* L.: Prospecção de novo Ativo e sua Aplicação em Produto Cosmetodermatológico / Maria Gabriela José de Almeida-Cincotto. – Araraquara, 2016.
146 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. Fitocosmético. 2. *Morus nigra* L. 3. Antioxidante. 4. Envelhecimento cutâneo.
I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

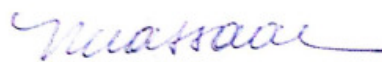
MARIA GABRIELA JOSÉ DE ALMEIDA CINCOTTO

EXTRATO DE folhas de Morus nigra L.: PROSPECÇÃO DE NOVO ATIVO E SUA APLICAÇÃO EM
PRODUTO COSMETODERMATOLÓGICO

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em
Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 26 de Agosto de 2016

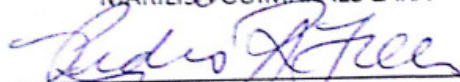
BANCA EXAMINADORA



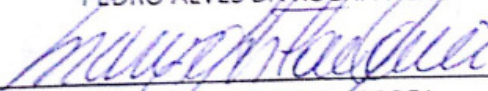
VERA LUCIA BORGES ISAAC



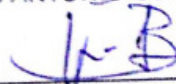
MARILISE GUIMARÃES LARA



PEDRO ALVES DA ROCHA FILHO



MARCOS ANTONIO CORREA



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

Dedicatória

Aos meus pais, em especial a minha mãe Heloisa
que sempre me motivou a seguir com meus sonhos
compreendendo o que era importante para mim.
Muito obrigada por tudo!

Ao meu marido Fernando que sempre esteve
ao meu lado nesta longa jornada me dando carinho,
apoio e incentivo
Muito obrigada por estar sempre ao meu lado!

A todos os meus familiares e amigos que de
alguma maneira estiveram presentes em minha
vida trazendo alegrias durante este período.

Agradecimentos

À prof^a. **Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac** que abriu as portas do Laboratório de Cosmetologia, e esteve comigo desde o estágio até o final deste trabalho.

À prof^a. **Dr^a. Chung Man Chin** que, por um gesto de amizade, começou a orientação deste trabalho, possibilitando que eu pudesse iniciá-lo.

Ao prof. **Dr. Marcos Antonio Corrêa** pelos ensinamentos, pelas contribuições durante o desenvolvimento do trabalho, na banca de defesa e pela amizade.

A **Capes** (Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

À **Predilecta Indústria de Alimentos** por ceder as folhas de amoreira para execução deste trabalho.

Ao **PADC – Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico – da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP** pelo apoio financeiro.

Aos **professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Barreto Cicarelli, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos e ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos professores, **Bruna Galdorfini Chiari Andréo, Leila Chiavacci, Marcos Antonio Corrêa, Iguatemy Lourenço Brunetti, Marilisa Guimarães Lara e Pedro Alves Rocha Filho** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando nas bancas de qualificação ou defesa.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: **Claúdia, Márcia, Daniela, Joyce, Fátima, Ilza, Margarete, Mateus, Queila**, por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos os **amigos do Laboratório de Cosmetologia e de república**: Ana Carolina, Bruna, Bruninha, Carol, Daniele, Gabi Romão, Ilza, Juliana, por toda a amizade, risadas, ajudas e companheirismo, muitos mesmo não estando mais presentes no laboratório.

E a todos os amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos que não são da Faculdade também!

Muito obrigada a todos!

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quantidade de compostos fenólicos totais presente nos extratos de folhas de <i>Morus nigra</i>	57
Tabela 2. Quantidade de flavonoides totais presente nos extratos de folhas de <i>Morus nigra</i>	59
Tabela 3. Valores de CE ₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do radical DPPH.....	66
Tabela 4. Valores de CE ₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do ABTS ⁺	73
Tabela 5. Comparação dos valores de CE ₅₀ entre o método de captura do DPPH [•] e o método de captura do ABTS ⁺	76
Tabela 6. Valores de CE ₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do O ₂ ^{•-} (SOD-like activity).	82
Tabela 7. Valores de CE ₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do O ₂ ^{•-}	87
Tabela 8. Equação da reta e valores de CE ₅₀ para os extratos e padrões pelo método de clareamento da crocina.	95
Tabela 9. Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO [•] do E ₇₀ em equivalentes aos padrões.....	96
Tabela 10. Valores de CE ₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do HOCl/OCl ⁻	100
Tabela 11. Valores de CE ₅₀ para os padrões pelo método de captura de H ₂ O ₂	104
Tabela 12. Valores de CE ₅₀ para citotoxicidade do E ₇₀ nas diferentes linhagens celulares.....	106
Tabela 13. Concentração de colágeno produzido por HDFa após tratamento com diferentes concentrações de extrato E ₇₀	114
Tabela 14. Avaliação da repetitividade do método analítico de inibição do radical ABTS para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i>	117
Tabela 15. Avaliação da precisão intermediária do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i>	117
Tabela 16. Avaliação da exatidão do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i>	118

Tabela 17. Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i>	119
Tabela 18. Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i>	119
Tabela 19. Avaliação da robustez do método analítico para determinação de extrato de <i>Morus nigra</i>	120
Tabela 20. Composição percentual da formulação.	123
Tabela 21. Valores de viscosidade mínima aparente para formulação base e fitocosmético.	126
Tabela 22. Valor de compliância máxima (Jmax) e porcentagem de recuperação da formulação base e fitocosmético no ensaio de fluência e relaxação.....	130

Lista de Figuras

Figura 1. Frutos e folhas de <i>Morus nigra</i> L.	33
Figura 2. Estrutura química dos padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante.	40
Figura 3. Esquema da placa utilizada no ensaio de atividade antioxidante pelo método de captura de ânion radical superóxido.	43
Figura 4. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT.	47
Figura 5. Representação esquemática do tratamento com extrato até a leitura do ensaio para avaliação da estimulação de biossíntese de colágeno pelo E ₇₀	49
Figura 6. Curva analítica do ácido gálico para determinação do teor de compostos fenólicos totais.	56
Figura 7. Curva analítica da quercetina para determinação do teor de flavonoides totais.	59
Figura 8. Esquema representativo da reação entre o radical DPPH e antioxidantes.	61
Figura 9. Perfil de captura do radical DPPH pelo ácido ascórbico.	62
Figura 10. Perfil de captura do radical DPPH pelo ácido gálico.	62
Figura 11. Perfil de captura do radical DPPH pelo trolox.	63
Figura 12. Perfil de captura do radical DPPH pelo E ₅₀	63
Figura 13. Perfil de captura do radical DPPH pelo E ₇₀	64
Figura 14. Perfil de captura do radical DPPH pelo E ₉₀	64
Figura 15. Perfil de captura do radical DPPH pelo E _{Aq}	65
Figura 16. Gráfico comparativo dos perfis de captura do radical DPPH pelos padrões e pelo extrato.	65
Figura 17. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo ácido ascórbico.	69
Figura 18. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo ácido gálico.	69
Figura 19. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo trolox.	70
Figura 20. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo E ₅₀	70
Figura 21. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo E ₇₀	71
Figura 22. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo E ₉₀	71
Figura 23. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo E _{Aq}	72

Figura 24. Gráfico comparativo dos perfis de captura do ABTS ^{•+} pelos padrões e pelo extrato.....	73
Figura 25. Estrutura química do DPPH [•] e do ABTS ^{•+}	75
Figura 26. Representação esquemática da reação onde o antioxidante atua como a SOD.....	77
Figura 27. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido ascórbico (SOD- <i>like</i> activity). ..	77
Figura 28. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido gálico (SOD- <i>like</i> activity).	78
Figura 29. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo trolox (SOD- <i>like</i> activity).	79
Figura 30. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo E ₅₀ (SOD- <i>like</i> activity).	79
Figura 31. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo E ₇₀ (SOD- <i>like</i> activity).	80
Figura 32. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo E ₉₀ (SOD- <i>like</i> activity).	80
Figura 33. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo E _{Aq} (SOD- <i>like</i> activity).	81
Figura 34. Gráfico comparativo dos perfis captura do O ₂ ^{•-} pelos padrões e extratos (SOD- <i>like</i> activity).	82
Figura 35. Representação esquemática da formação do O ₂ ^{•-} <i>in vitro</i> e a reação com NBT na ausência (A) e presença de antioxidantes (B).	84
Figura 36. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido ascórbico.....	85
Figura 37. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido gálico.....	85
Figura 38. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo trolox.....	86
Figura 39. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo E ₇₀	86
Figura 40. Gráfico comparativo dos perfis captura do O ₂ ^{•-} pelos padrões e E ₇₀	87
Figura 41. Estrutura química da crocina.....	89
Figura 42. Representação esquemática da reação de formação de radical peroxila e ataque à estrutura da crocina.	90
Figura 43. Esquema representativo da reação do radical peroxila com a substância antioxidante.....	90
Figura 44. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com ácido ascórbico. O gráfico <i>inset</i> apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V ₀) e na presença (V) do ácido ascórbico (µg/mL), em função do tempo.	92
Figura 45. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com ácido gálico. O	

gráfico <i>inset</i> apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) do ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.	92
Figura 46. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com trolox. O gráfico <i>inset</i> apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) do trolox ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.	93
Figura 47. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com E_{70} . O gráfico <i>inset</i> apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) de E_{70} ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.	93
Figura 48. Gráfico representativo entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina para os padrões e E_{70} ...	94
Figura 49. Representação esquemática da reação de oxidação do TMB e da captura de HOCl/OCl^- por um antioxidante.	97
Figura 50. Perfil de captura do HOCl/OCl^- pelo ácido ascórbico.	98
Figura 51. Perfil de captura do HOCl/OCl^- pelo ácido gálico.	98
Figura 52. Perfil de inibição do radical HOCl/OCl^- pelo trolox.	99
Figura 53. Perfil de captura do HOCl/OCl^- pelo E_{70}	99
Figura 54. Gráfico comparativo dos perfis captura do HOCl/OCl^- pelos padrões e E_{70}	100
Figura 55 Representação esquemática da reação entre H_2O_2 e TNB e da captura do H_2O_2 por substâncias antioxidantes.	102
Figura 56. Perfil de captura de peróxido de hidrogênio por ação da catalase.	102
Figura 57. Perfil de captura do peróxido de hidrogênio pelo ácido ascórbico.	103
Figura 58. Perfil dose-resposta de citotoxicidade para células HepG2 após tratamento com extrato E_{70}	105
Figura 59. Perfil dose-resposta de citotoxicidade para células HaCat após tratamento com extrato E_{70}	105
Figura 60. Perfil dose-resposta de citotoxicidade para células HDFa após tratamento com extrato E_{70}	106
Figura 61. Pré-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato E_{70} e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM.	109

Figura 62. Pré-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato E ₇₀ e peróxido de hidrogênio a 5 mM.	109
Figura 63. Co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato E ₇₀ e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM.	110
Figura 64. Co-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato E ₇₀ e peróxido de hidrogênio a 5 mM.	110
Figura 65. Curva analítica de colágeno tipo I.	112
Figura 66. Porcentagem de produção de colágeno por HDFa após tratamento com extrato E ₇₀	113
Figura 67. Produção de colágeno promovida pelo tratamento de células HDFa com extrato E ₇₀	114
Figura 68. Média dos valores das curvas para avaliação da linearidade do método.	116
Figura 69. Espectros da solução aquosa de E ₇₀ durante 10 dias de análise.	121
Figura 70. Concentração do E ₇₀ na solução aquosa avaliada por 10 dias.	122
Figura 71. Curva de fluxo da formulação base e fitocosmético.	125
Figura 72. Varredura de frequência da formulação base e fitocosmético.	127
Figura 73. Varredura de tensão para a formulação base e fitocosmético.	128
Figura 74. Fluência e relaxação para formulação base e fitocosmético.	129

Lista de Abreviaturas

AAPH: 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloreto

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE₅₀: concentração efetiva 50, necessária para capturar 50% de espécies reativas ou para causar 50% de morte celular

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DTNB: ácido 2-nitrobenzóico

E₅₀: extrato hidroetanólico 50% de folhas de *Morus nigra* L.

E₇₀: extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* L.

E₉₀: extrato hidroetanólico 90% de folhas de *Morus nigra* L.

E_{Aq}: extrato aquoso de folhas de *Morus nigra* L.

ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HaCat: queratinócitos humanos

HDFa: fibroblastos humanos de adulto

HepG2: células de hepatoma humano

HO•: radical hidroxila

HO₂•: radical hidroperoxila

HOCl: ácido hipocloroso

MEM: Minimal Essential Medium

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

Na₄P₂O₇: pirofosfato de sódio

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NBT: azul de tetrazólio

O/A: óleo em água

O₂: oxigênio molecular

O₂^{•-}: radical ânion superóxido

OCI⁻: ânion hipoclorito

PMS: metossulfato de fenazina

q.s.p.: quantidade suficiente para

SOD: superóxido dismutase

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNB: ácido 2-nitro-5-tiobenzóico

WST-1: 2-(2-iodophenyl)-3-(4-(nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

Sumário

Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
1. Revisão da Literatura	22
1.1. Plantas medicinais e fitocosméticos.....	22
1.2. Extratos vegetais e sua utilização em cosmetologia	23
1.3. Radicais livres	27
1.4. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	30
1.5. Extratos vegetais como antioxidantes.....	31
1.6. Amora preta (<i>Morus nigra</i> L.)	33
2. Objetivos	36
3. Material e Métodos.....	37
3.1. Preparo do material vegetal	37
3.2. Preparo dos extratos.....	37
3.3. Determinação do teor de compostos fenólicos	38
3.4. Determinação do teor de flavonóides	38
3.5. Avaliação do potencial antioxidante.....	39
3.5.1. Método de captura do DPPH [•]	40
3.5.2. Método de inibição do ABTS ^{•+}	41
3.5.3. Método de captura de ânion radical superóxido (atividade como da SOD)	42
3.5.4. Método de captura de ânion radical superóxido	43
3.5.5. Ensaio do clareamento da crocina.....	44
3.5.6. Capacidade de captura do HOCl/OCl ⁻	45
3.5.7. Capacidade de captura sobre o H ₂ O ₂	45

3.6.	Avaliação da citotoxicidade do E ₇₀ em células HepG2, HaCat e HDFa	46
3.7.	Avaliação do potencial quimioprotetor do E ₇₀ em células HepG2 e HaCat	48
3.8.	Avaliação da biossíntese de colágeno em células HDFa	48
3.9.	Validação de metodologia de quantificação do E ₇₀ pelo método de captura do radical ABTS.....	50
3.9.1.	Linearidade	50
3.9.2.	Precisão	50
3.9.3.	Exatidão	51
3.9.4.	Especificidade e Seletividade.....	51
3.9.5.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	52
3.9.6.	Robustez	52
3.10.	Avaliação da estabilidade da solução aquosa do extrato E ₇₀ ..	53
3.11.	Obtenção da formulação cosmética	53
3.12.	Caracterização reológica da formulação	53
4.	Resultados e Discussão.....	55
4.1.	Preparo do material vegetal.....	55
4.2.	Preparo dos extratos	55
4.3.	Avaliação do teor de compostos fenólicos.....	55
4.4.	Avaliação do teor de flavonoides	58
4.5.	Avaliação do potencial antioxidante.....	60
4.5.1.	Método de captura do DPPH [•]	60
4.5.2.	Método de captura do ABTS ^{•+}	68
4.5.3.	Método de captura de ânion radical superóxido (atividade como da SOD)	76
4.5.4.	Método de captura do ânion radical superóxido.....	83
4.5.5.	Ensaio do clareamento da crocina.....	88

4.5.6.	Capacidade de captura do HOCl/OCl ⁻	96
4.5.7.	Capacidade de captura sobre o H ₂ O ₂	101
4.6.	Avaliação da citotoxicidade do extrato em células HepG2, HaCat e HDFa	104
4.7.	Avaliação do potencial quimioprotetor do E ₇₀ em células HepG2 e HaCat	107
4.8.	Avaliação da biossíntese de colágeno em células HDFa	111
4.9.	Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação do extrato hidroetanólico 70.....	115
4.9.1.	Linearidade.....	115
4.9.2.	Precisão.....	116
4.9.3.	Exatidão.....	118
4.9.4.	Especificidade e seletividade.....	118
4.9.5.	Limite de detecção e quantificação	119
4.9.6.	Robustez	120
4.10.	Avaliação da estabilidade da solução aquosa do extrato E ₇₀	120
4.11.	Preparo da formulação e incorporação do E ₇₀	122
4.12.	Caracterização reológica das formulações.....	124
5.	Considerações parciais	131
6.	Conclusão	133
7.	Referências Bibliográficas.....	134

Resumo

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas com finalidade curativa e, além do emprego na terapêutica, os extratos vegetais têm sido amplamente utilizados na indústria cosmética, como ativos, uma vez que sua composição complexa pode proporcionar efeitos benéficos mais intensos do que substâncias puras. Dados da literatura apontam que amoreira preta (*Morus nigra* L.) contém alta quantidade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, os quais promovem efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano. Por isso, neste trabalho, foram obtidos quatro tipos de extratos de folhas de *Morus nigra* L. (aquoso - E_{Aq}, hidroetanólico 50% – E₅₀, hidroetanólico 70% – E₇₀ e hidroetanólico 90% – E₉₀), determinado o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e avaliado o potencial antioxidante, a fim de determinar qual o extrato mais eficaz para utilização como ativo cosmetodermatológico. O extrato que apresentou melhor atividade antioxidante, foi utilizado para avaliação da citotoxicidade em células HepG2, HaCat e HDFa, avaliação do efeito quimioprotetor em células HepG2 e HaCat e avaliação ao estímulo à biossíntese de colágeno. Também foi desenvolvida uma emulsão, na qual o extrato foi incorporado e para posterior caracterização reológica. Os resultados obtidos indicaram que os quatro extratos contêm compostos fenólicos e flavonoides apresentando efeito antioxidante, porém, o que apresentou maior teor e maior efetividade foi o E₇₀. Desta forma, foi avaliada a citotoxicidade do E₇₀ o qual apresentou segurança de uso nas concentrações necessárias para obter efeito antioxidante frente a espécies reativas radicalares e não radicalares, tais como ânion radical superóxido, ácido hipocloroso e na prevenção de lipoperoxidação em sistema modelo. Não foi verificado efeito quimioprotetor frente a células HepG2 e HaCat, fato esperado uma vez que o extrato não apresentou atividade frente à captura de H₂O₂ *in vitro*. No entanto, com os resultados obtidos, foi possível concluir que o extrato hidroetanólico 70° GL de folhas de *Morus nigra* L. é um candidato a uso como ativo cosmetodermatológico para produtos que previnem o envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: fitocosmético, *Morus nigra* L., amoreira preta, antioxidante, envelhecimento cutâneo

Abstract

Since ancient times the plants are used with curative purpose. Besides employment in therapy, plant extracts have been widely used in the cosmetic industry as active, because their complex composition. The extracts can provide more intense beneficial effects than pure substances. Literature data show that black mulberry (*Morus nigra* L.) contains phenolic compounds, including flavonoids, which promote antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial effects. Therefore, in this study we were obtained four *Morus nigra* L. leaf extracts (aqueous - EAq, hydroethanol 50% - E₅₀, hydroethanol 70% - E₇₀ and hydroethanol 90% - E₉₀). The total phenolic compounds, total flavonoid and antioxidant potential are evaluated in order to verify the most effective for use as cosmetic active. The extract that showed better antioxidant activity, was used to evaluation for cytotoxicity in HepG2, HaCaT and HDFa cells, quimioprotector effect on HepG2 and HaCaT cells and stimulate collagen biosynthesis. The extract has been incorporated on emulsion and their rheological characterization was also developed. The results indicated that the four extracts contain phenolic compounds and flavonoids having antioxidant effect, however, with the highest levels was observed to E₇₀. Thus, the cytotoxicity of E₇₀ was measured and their use is considered safety at the concentrations required for antioxidant activity against biological radicals, such as superoxide anion, hypochlorous acid and prevention of lipid peroxidation. There was no effect quimioprotector front of HepG2 and HaCaT cells. This fact was expected since the extract showed no activity against H₂O₂ capture *in vitro*. However, it was concluded that the E₇₀ is a candidate for use as cosmetic active in products to prevent skin aging.

Key-words: phytocosmetic, *Morus nigra* L., antioxidant, skin aging

Introdução

Antes mesmo da descoberta da escrita, as plantas já eram utilizadas pelos povos antigos com a finalidade curativa, ou seja, mesmo sem estudos prévios, já eram conhecidas as propriedades de cura de algumas plantas. Com o passar dos anos, a terapêutica foi evoluindo e, atualmente, muitas plantas são utilizadas na fabricação de medicamentos fitoterápicos ou, até mesmo, passam por processamento para extração e isolamento de substâncias ativas que são denominados fitofármacos.

Os extratos obtidos de plantas, além de seu uso na terapêutica, podem ser empregados na formulação de produtos cosméticos, sendo obtidos desta forma os denominados fitocosméticos, que são produtos que contêm matéria prima de origem vegetal, não necessariamente orgânica. Os fitocosméticos são uma tendência no mercado mundial de cosméticos, pois, cada vez mais, os consumidores estão buscando produtos de origem vegetal, já que remetem a uma segurança, que nem sempre pode ser associada a eles. Uma vez que apresentam composição complexa, os extratos podem ter substâncias atuando em sinergismo, podendo promover mais efeitos benéficos à pele do consumidor e, também devem ter sua segurança comprovada, uma vez que essa mistura de substâncias pode apresentar maior risco de toxicidade que substâncias puras isoladas ou sintetizadas.

Em formulações fitocosméticas, são utilizados ativos de origem vegetal, no entanto, na maioria das vezes, não há uma concentração pré-determinada deste ativo a ser incorporada na formulação. Por este motivo, cabe ao formulador esta determinação, levando em consideração a concentração do ativo que apresentará efetividade e segurança durante todo o período de uso.

Na última década, as principais preocupações com a pele são o envelhecimento cutâneo e o desenvolvimento de câncer. Ambos os processos podem ser acelerados por reações oxidativas, que causam modificações celulares e, até mesmo, mutação no DNA.

O envelhecimento cutâneo pode ser dividido em cronológico, de característica intrínseca, pode ser adiado, enquanto o fotoenvelhecimento, de característica extrínseca, pode ser evitado com o uso de antioxidantes, uma vez que auxiliam no combate as espécies reativas. Além disso, o

envelhecimento cronológico pode atuar a favor do organismo, impedindo que modificações no DNA se propaguem e possam ocasionar o aparecimento de lesões pré-neoplásicas e o fotoenvelhecimento contribui para a formação destas lesões neoplásicas benignas ou malignas, tais como os cânceres de pele.

Por este motivo, a utilização de cosméticos com ativos que sejam capazes de atuar neutralizando espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) formadas no organismo é muito importante, pois o sistema de defesa antioxidante endógeno nem sempre é capaz de manter o equilíbrio entre oxidantes e redutores já que, as ERO e ERN podem ser de origem endógena e/ou exógena.

As principais espécies reativas formadas em sistemas biológicos são as ERO, ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$), óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Os vegetais apresentam, em sua composição, metabólitos secundários que foram desenvolvidos em seu organismo para defesa contra ataque de herbívoros ou proteção contra os efeitos deletérios promovidos pela radiação ultravioleta, uma vez que esta radiação é necessária para que haja o processo de fotossíntese, mas pode ocasionar efeitos maléficos.

Os metabólitos secundários das plantas podem promover atividades biológicas nos humanos, sendo que a classe dos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, oferece propriedades benéficas como a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

Morus nigra L. (amoreira preta), é uma espécie de planta originária da Ásia, mas que foi bem aclimatada no Brasil. É uma planta cultivada em jardins e sua fruta fresca é de difícil comercialização, devido à fragilidade e, por isso, seu comércio é realizado, principalmente, na forma de geléia. Embora a fruta seja comercializada com a finalidade alimentícia, outras partes da amoreira preta, como caule e folhas, podem ser utilizadas com finalidades terapêuticas.

Além disso, o uso de extratos de folhas e caule pode apresentar uma importante alternativa cosmética, mostrando que esta planta pode apresentar maior valor agregado aos produtores ao investirem não apenas em um produto obtido a partir de seu cultivo, já que é uma planta de rápido crescimento.

Por isso, neste trabalho, foram investigados o teor de compostos fenólicos e flavonoides e o potencial antioxidante dos extratos hidroetanólico (50%, 70% e 90%) e aquoso. Além disso, a partir de uma triagem, foi determinado o potencial antioxidante frente a outras espécies reativas, citotoxicidade, efeito quimioprotetor e capacidade em atuar induzindo a biossíntese de colágeno do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra L.*, a fim de obter um ativo cosmético de origem vegetal para incorporação em formulação com finalidade de prevenção de envelhecimento cutâneo.

1. Revisão da Literatura

1.1. Plantas medicinais e fitocosméticos

As plantas medicinais são utilizadas com finalidade terapêutica desde o início da história da humanidade pela chamada “medicina caseira”. Este tipo de medicina, também denominada etnomedicina, faz referência a sistemas de tratamento de doenças que ocorrem devido à cultura de vários grupos, tais como curandeiros, benzedores, erveiros, que utilizam os recursos naturais como medicamentos, principalmente em países em desenvolvimento (FREITAS, 1999; BARATA, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2014; SILVA, 2014).

No contexto terapêutico, as plantas medicinais são um recurso alternativo a tratamentos alopáticos em diversas enfermidades e, ainda, podem ser utilizadas como complemento de muitas terapias em casos de doenças crônicas, principalmente para pacientes adultos e idosos; porém, é necessário ter cautela quanto ao seu uso, uma vez que não são isentas de efeitos colaterais e tóxicos (BRASIL, 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003) os fitoterápicos são medicamentos fabricados exclusivamente com matéria prima vegetal e, neste caso, utilizam plantas medicinais ou componentes isolados destas plantas como componentes ativos (CORDEIRO *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2014).

A biodiversidade brasileira é a maior do mundo; no entanto, não é muito explorada em relação a plantas medicinais (CARNEIRO *et al.*, 2014). Além do Brasil, outros países possuem plantas que podem ser utilizadas com a finalidade de tratamento em medicamentos fitoterápicos ou, ainda, podem ser aplicadas como ativo cosmético, obtendo produtos denominados fitocosméticos, uma vez que, atualmente, os cosméticos apresentam benefícios à pele e não cumprem apenas a função de adorno (GALEMBECK e CSORDAS, 2011).

Os fitocosméticos são produtos que contêm matérias primas de origem vegetal, sendo uma tendência de vendas no mercado mundial, uma vez que a maioria dos consumidores está buscando, cada vez mais, os benefícios

promovidos pelos extratos vegetais, seja para pele ou anexos (PINTO *et al.*, 2002; GUARATINI *et al.*, 2009). Os fitocosméticos devem apresentar eficácia e segurança comprovadas além de promover o desenvolvimento sustentável (FERRARI *et al.*, 2007; IHA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2013).

Neste contexto, é extremamente importante o estudo de extratos vegetais e avaliação das possíveis atividades cosméticas por eles proporcionadas.

1.2. Extratos vegetais e sua utilização em cosmetologia

Os vegetais apresentam composição química complexa, contendo grande variedade de substâncias que podem apresentar atividades biológicas diversas, por isso, a extração destas substâncias e o emprego de extratos em formulações cosméticas têm sido realizados nos últimos anos (ALMEIDA *et al.*, 2012; CHIARI, B G *et al.*, 2012; ALMEIDA, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013; CHIARI-ANDRÉO, 2014; CHIARI *et al.*, 2014).

Devido à busca, pelos consumidores, por produtos cosméticos que contêm ativos de origem vegetal, pesquisadores e formuladores estão realizando estudos de eficácia e, principalmente, de segurança dos extratos vegetais, a fim de garantir produtos com qualidade e, assegurar o bem estar do consumidor sem oferecer riscos à saúde (DWECK, 2001; CHIARI, B G *et al.*, 2012; ALMEIDA, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013; CHIARI *et al.*, 2014).

Muitas vezes, o extrato vegetal é conhecido pelas propriedades observadas através da medicina popular e, a partir deste conhecimento, é que pesquisadores investigam possíveis atividades cosméticas ou medicamentosas.

A alteração no processo de neutralização de espécies reativas formadas no organismo ou geradas a partir de fatores externos é denominada estresse oxidativo e pode estar relacionado ao fotoenvelhecimento e ao surgimento de cânceres de pele.

O envelhecimento cutâneo pode ser classificado didaticamente em cronológico e fotoenvelhecimento. O envelhecimento cronológico, intrínseco, é um processo que ocorre naturalmente devido ao metabolismo do indivíduo não sendo possível sua prevenção, enquanto o fotoenvelhecimento, extrínseco,

ocorre devido à exposição do indivíduo a fatores externos, tais como tabagismo, exposição à radiação ultravioleta e dieta com falta de nutrientes (FISHER *et al.*, 2002).

Quando há formação de quantidades de espécies reativas, maiores que a capacidade antioxidante do indivíduo, é gerado um estado denominado estresse oxidativo, sendo possível preveni-lo ao diminuir a exposição a estes fatores ou, ainda, utilizando produtos tópicos ou por via oral que sejam capazes de neutralizar o excesso das espécies reativas geradas (FISHER *et al.*, 2002; WULF *et al.*, 2004; BERRA e MENCK, 2006).

O envelhecimento cronológico não é o “vilão” desta história, já que dados da literatura (YAAR, 2002; BAGATIN, 2009) apontam que este envelhecimento tem a capacidade de reparar danos causados ao DNA genômico, impedindo a ocorrência de lesões pré-neoplásicas; mas, a exposição excessiva à radiação solar pode acelerar o fotoenvelhecimento e, conseqüentemente, o surgimento de cânceres cutâneos.

Por estes motivos, o uso de extratos ou óleos vegetais, na maioria das vezes, incorporados entre 3 e 10% nos fitocosméticos, podem ser interessantes como alternativas à prevenção do fotoenvelhecimento e do surgimento de cânceres de pele. Além disso, o uso não precisa ser apenas nesta faixa de concentração, desde que seja observada eficácia e segurança do material que será utilizado (PEYREFITTE *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2013).

Chiari (2011) incorporou diferentes concentrações (5,0%, 10,0% e 20,0%) de extrato hidroetanólico 70% de *Psidium guajava* em formulação fitocosmética, sendo verificado que a concentração de 5,0% ficou retida no extrato córneo e apresenta potencial antioxidante. Desta forma, foi determinada que a concentração ideal para obtenção do fitocosmético foi de 5,0% (CHIARI, 2011).

Almeida (2013) avaliou o potencial antioxidante e a citotoxicidade de extrato aquoso de *Ascophyllum nodosum*. A partir destes estudos, foi possível determinar que a concentração de 1,2% de extrato de *Ascophyllum nodosum*, quando incorporada a uma formulação cosmética é suficiente para que o mesmo seja considerado um fitocosmético com ação preventiva do envelhecimento cutâneo e segura para uso (ALMEIDA, 2013).

Os fitocosméticos são indicados devido aos diferentes efeitos, tais como: 1) prevenção do envelhecimento, devido a características antioxidantes; 2) regeneradores, por atuarem no processo de biossíntese de colágeno; 3) despigmentantes, por atuarem na inibição da síntese de melanina; como 4) fotoprotetores, devido à capacidade de absorção ou reflexão da radiação ultravioleta; 5) anti acne e anticelulite, dentre outras (PEYREFITTE *et al.*, 1998; FERRARI *et al.*, 2007; HAZRA *et al.*, 2008; IHA *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; CHIARI-ANDRÉO, 2014).

Dados da literatura apresentam diversas espécies vegetais que poderiam ser utilizadas em produto antienvelhecimento, seja por ação antioxidante, fotoprotetora, estimuladora da síntese de colágeno, despigmentação cutânea, entre outras e não apenas na forma de extratos vegetais, mas também seus óleos (KAVALCIOGLU *et al.*, 2010; CHIARI, B G *et al.*, 2012; ALMEIDA, 2013; ALMEIDA, M. G. J. *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; CHIARI *et al.*, 2014).

Kavalcioğlu e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquoso e metanólico de *Bellis perennis* (margarida), observando que os extratos não apresentavam efeito inibidor de alguns patógenos, no entanto, apresentavam atividade antioxidante (KAVALCIOGLU *et al.*, 2010).

Hashim e colaboradores (2011) analisaram o extrato de folhas de *Centella asiática* e verificaram que este extrato é capaz de aumentar a produção de colágeno; atuar como antioxidante e lipolítico, além de apresentar atividade fotoprotetora similar ao metoxicinamato de octila a 10,0%, sendo um extrato vegetal que pode ser aplicado amplamente na indústria de cosméticos (HASHIM *et al.*, 2011).

Souza e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antioxidante e a atividade fotoprotetora de emulsões contendo extrato de acerola (*Malpighia glabra* L.) e observaram que este extrato não foi capaz de conferir fator de proteção solar (FPS) à formulação; porém, apresentou atividade antioxidante *in vitro*, sendo interessante sua aplicação em formulações cosméticas, pois, por sinergismo, pode complementar a ação de outras substâncias frente à radiação ultravioleta (UV) (SOUZA *et al.*, 2013).

Em nosso grupo de pesquisa, pesquisas são desenvolvidas a fim de obter extratos vegetais com atividade cosmética e segurança comprovadas, sendo alguns destes trabalhos citados abaixo.

Chiari e colaboradores (2012c) prepararam extrato hidroetanólico 70% dos frutos da goiaba (*Psidium guajava* L.) e observaram atividade antioxidante *in vitro* frente ao radical DPPH podendo ser um ativo incorporado em formulações cosméticas com finalidade de prevenção do envelhecimento (CHIARI, B G *et al.*, 2012).

Almeida (2013) determinou o potencial antioxidante e inibidor de tirosinase, *in vitro*, do extrato aquoso seco de *Ascophyllum nodosum*, uma alga marinha marrom, e verificou atividade antioxidante, além de poder atuar como um despigmentante se utilizado em concentrações mais elevadas (ALMEIDA, 2013; ALMEIDA, M. G. J. *et al.*, 2013).

Chiari e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antioxidante e potencial fotoprotetor do óleo de café verde, verificando a atividade antioxidante *in vitro* deste óleo. Em relação à atividade fotoprotetora, foi possível notar que o óleo avaliado apresentou sinergismo de ação com o metoxinamato de octila, um filtro solar sintético, sendo capaz de aumentar em 20% o valor do fator de proteção solar quando 10,0% do óleo foi acrescentado em uma emulsão contendo 7,5% do filtro solar sintético (CHIARI *et al.*, 2014). Este resultado é interessante; no entanto, a quantidade de óleo utilizada ainda é elevada para o valor de acréscimo proporcionado ao FPS.

A maioria dos extratos vegetais ou outros extratos de origem natural e óleos podem apresentar atividade antioxidante; ou seja, serem capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). Este fato é interessante quando se fala em aplicação cosmética, uma vez que o processo de envelhecimento, seja ele intrínseco ou extrínseco, é ocasionado, em sua grande parte, por espécies reativas em excesso no organismo, formadas a partir do metabolismo ou devido à ação da radiação UV. Por isso, é importante que extratos vegetais apresentem, além da atividade antioxidante, outras atividades biológicas, sendo de grande importância o conhecimento sobre as espécies reativas radicalares e não radicalares e os mecanismos de ação de cada um deles (SCOTTI *et al.*, 2007).

1.3. Radicais livres

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, sendo formados no organismo através de reações de óxido-redução, e por isso apresentam alta reatividade podendo ser consideradas como moléculas responsáveis por processos fisiopatológicos, tais como o envelhecimento e câncer de pele. No entanto, esta denominação nem sempre é válida, já que existem radicais patogênicos que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como por exemplo, o H_2O_2 que é considerado um falso radical. Por este motivo, os radicais livres são também denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

As ERO estão presentes nos sistemas biológicos e, a partir do metabolismo do oxigênio molecular (O_2), podem ser formados diferentes radicais tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) que são espécies intermediárias altamente reativas (COHEN, 1989; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 não apresenta elétrons desemparelhados em sua camada de valência. *In vivo*, esta espécie é gerada a partir da dismutação, espontânea ou catalisada pela SOD, do ânion radical superóxido ou, então, pela oxidação e decomposição de ácidos graxos e peróxidos orgânicos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL *et al.*, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

Apesar de não ter elevada reatividade quando comparado a outras espécies, como o radical hidroxila, a presença de H_2O_2 no organismo é preocupante, pois é capaz de atravessar membranas lipídicas e, assim, gerar espécies reativas no interior das células. Além disso, o H_2O_2 tem vida longa e apresenta citotoxicidade, que é aumentada quando na presença de Fe^{2+} e Cu^{2+} , principalmente no interior dos eritrócitos (SCOTT *et al.*, 1991; HALLIWELL *et al.*, 2000).

Nas mitocôndrias, devido ao processo de respiração celular, há formação exacerbada de ânion radical superóxido, convertido pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 , sendo que este é parcialmente degradado pela ação enzimática da catalase, glutathione peroxidase e outras peroxidases; no entanto, uma grande parte é liberada para a célula, podendo ocasionar citotoxicidade ou formação de outros radicais livres (HALLIWELL *et al.*, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A formação do ânion radical superóxido ocorre em praticamente todas as células aeróbicas, durante o processo de respiração celular, para obtenção de energia. Além disso, o ânion radical superóxido também é produzido durante processos inflamatórios e infecciosos, por ativação máxima de eosinófilos, macrófagos, monócitos e neutrófilos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

São considerados radicais menos reativos e atuam como precursores do radical hidroxila, capaz de gerar danos por reagir com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; ASSIS *et al.*, 2015).

Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), dentre as ERO, é um dos mais reativos, sendo capaz de reagir com biomoléculas facilitando a reação próximo ao local onde foi gerado. Além disso, se houver metal de transição presente, a reação ocorre de maneira mais rápida, portanto, se o $OH^{\bullet}$ for produzido próximo ao DNA ligado a um metal, provavelmente ocorrerão modificações nas bases purínicas e pirimidínicas, podendo ocasionar mutação do DNA ou, até mesmo, sua inativação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

A formação do radical hidroxila pode ocorrer pela reação do peróxido de hidrogênio com ferro, denominada Reação de Fenton ou pela reação do peróxido de hidrogênio com o radical ânion superóxido, denominada Reação de Haber-Weiss que, na presença de um metal de transição, tem sua velocidade aumentada, podendo ocasionar danos oxidativos *in vivo*, principalmente pela oxidação de ácidos graxos polinsaturados das membranas

celulares, processo denominado lipoperoxidação (BARREIROS *et al.*, 2006; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

Lipoperoxidação

As membranas celulares apresentam estrutura de bicamadas lipídicas, sendo um dos principais alvos de ataque dos radicais livres. Neste caso, são induzidas reações de peroxidação lipídica que, de forma exagerada, podem gerar acúmulo de compostos tóxicos às células, ocasionando perda na seletividade das trocas iônicas e liberação do conteúdo das organelas, tais como enzimas lisossomais, que podem liberar produtos citotóxicos, interrompendo o funcionamento normal do metabolismo celular e das funções de proteção, podendo estar associados à etiologia de várias doenças, tais como o câncer e até mesmo levar à morte celular (HERSHKO, 1989; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O processo de lipoperoxidação pode ser benéfico ou maléfico. Muitas vezes, os produtos da lipoperoxidação estão presentes na resposta inflamatória, pois atuam na cascata do ácido araquidônico, auxiliando a formação de prostaglandinas. No entanto, este processo pode estar diretamente relacionado aos mecanismos de câncer, envelhecimento e aumento da toxicidade de xenobióticos (SHAN *et al.*, 1990; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Desta forma, a lipoperoxidação pode ocasionar consequências graves, sendo necessária a avaliação de substâncias com mecanismos de ação antioxidante contra radicais biológicos, como é o caso do radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) (LUCIO *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2015).

Espécies reativas de nitrogênio

Além das ERO, radicalares e não radicalares, no organismo, há formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Dentre estas espécies pode ser citado o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), sintetizado pelo organismo através de uma reação enzimática entre a óxido nítrico sintase e o aminoácido L-arginina que resulta em $\text{NO}^\bullet$ e L-citrulina (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O NO[•] faz parte de diversos processos biológicos, dentre eles a emissão de neurotransmissores, regulação imunológica, relaxação muscular e regulação da pressão arterial (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O NO[•] tem um tempo de meia vida extremamente curto, aproximadamente 10 segundos, mas é capaz de reagir rapidamente com ERRO, principalmente o O₂^{•-} ocasionando a formação de peroxinitrito (OONO⁻) que são produtos tóxicos e podem acarretar em peroxidação lipídica devido a nitração de proteínas (RIBEIRO *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

1.4. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Os radicais livres são gerados naturalmente pelo próprio organismo como consequência ao processo do metabolismo de oxigênio ou por disfunções biológicas devido a substâncias provenientes do meio ambiente. Desta forma, pode ocorrer um desequilíbrio entre agentes oxidantes e redutores ocasionando um processo denominado estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).

O excesso de espécies reativas pode causar danos oxidativos em membranas celulares, proteínas, DNA e RNA, por isso, o organismo possui sistemas de defesa, enzimáticos ou não enzimáticos, contra o ataque destas espécies. Como sistemas enzimáticos podem ser citados a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase e, como sistemas não enzimáticos podem ser citados a vitamina E, que atua removendo o agente agressor antes que cause a lesão ou, ainda, o organismo pode contar com a ação do ácido ascórbico e glutathione reductase. A glutathione reductase atua de forma a manter a concentração de glutathione reduzida nas células, visto que esta molécula é responsável por reparar a lesão que já ocorreu juntamente com o ácido ascórbico (HEBBEL, 1986; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).

Dentre os sistemas de defesa, antes da lesão, a catalase e a superóxido dismutase são extremamente importantes. A primeira catalisa a reação de redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular, enquanto a segunda catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de

hidrogênio e água, em meio aquoso. Também é possível citar a glutathione peroxidase que catalisa a redução do H_2O_2 e de peróxidos orgânicos a alcoóis através da conversão de glutathione reduzida a glutathione oxidada (ARUOMA *et al.*, 1989; ACHARYA *et al.*, 1991; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).

Nem sempre os antioxidantes endógenos conseguem atuar de maneira a manter o equilíbrio entre oxidantes e redutores; por este motivo, é importante que antioxidantes exógenos sejam introduzidos no organismo, seja pela alimentação, suplementação ou por administração tópica. O envelhecimento cutâneo é acelerado pelo excesso de espécies reativas e, por este motivo, é necessário o uso de cosméticos com ativos antioxidantes a fim de prevenir o envelhecimento precoce.

Moléculas como compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides, carotenoides apresentam função antioxidante, sendo capazes de impedir os danos oxidativos ocasionados aos sistemas biológicos ou de reparar estes danos (BARREIROS *et al.*, 2006; SCOTTI *et al.*, 2007). Por isso, extratos vegetais que contêm estas substâncias tem sido uma alternativa como ativos cosméticos antioxidantes.

1.5. Extratos vegetais como antioxidantes

De maneira geral os vegetais contêm dois tipos de metabólitos, os primários que são responsáveis pela sobrevivência do vegetal (carboidratos, lipídios, proteínas) e os secundários, que são aqueles associados à defesa, por exemplo, contra ataque de herbívoros e, à proteção contra os radicais livres formados pela radiação UV, uma vez que esta é necessária para realização do processo de fotossíntese (SCOTTI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários são classificados de acordo com sua rota biossintética em compostos contendo nitrogênio, terpenos e compostos fenólicos (TAYZ e ZEIGER, 2004; SILVA *et al.*, 2010).

Na classe de metabólitos secundários, os compostos fenólicos apresentam grande variedade de atividades biológicas, podendo ser citadas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antiglicação, anticancerígena,

antimutagênica, dentre outras (NAKAMURA *et al.*, 2003; ERCISLI e ORHAN, 2007; BASTOS *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é verificada na maioria dos extratos vegetais e ocorre devido à neutralização da espécie radicalar por redução com a doação de um átomo de hidrogênio (F'GUYER *et al.*, 2003; NIKOLIC, 2006; SCOTTI *et al.*, 2007).

A estrutura dos compostos fenólicos é formada por vários grupos benzênicos com hidroxilas como substituintes. Dependendo da posição da substituição e da quantidade de grupos hidroxila, o potencial antioxidante dos compostos fenólicos sofre variação. Além disso, as ligações de hidrogênio e as propriedades de outros substituintes também influenciam nesta atividade (HERNANDEZ e PIETRO GONZÁLES, 1999; CHENG *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2003).

Outra influência na atividade antioxidante de compostos fenólicos é a posição de substituição das hidroxilas considerando que uma esteja em posição fixa: se a substituição ocorrer em posição *orto* ou *meta*, os compostos formados são menos ativos do que se a substituição ocorrer em *para* (PANNALA *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2003; SCOTTI *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em não flavonoides, que são os fenóis simples ou ácidos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico e hidroxibenzóico e, em flavonoides, que são os polifenóis, que podem se apresentar de diferentes formas, tais como, flavonóis, flavanóis, flavonas, isoflavonas, flavanona, flavan-3-ol, antocianidinas, chalconas, etc (HRAZDINA *et al.*, 1970; GRAHAM, 1992; VANACKER *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos são amplamente encontrados em café, cebola, uva, cereja sendo que as frutas coloridas, principalmente aquelas de “cores fortes”, contêm alta quantidade de compostos fenólicos, dentre eles antocianinas, carotenoides e flavonoides, sendo os últimos a classe de maior interesse cosmético (GRAHAM, 1992; VANACKER *et al.*, 1996; CIESLIK *et al.*, 2006; ERCISLI e ORHAN, 2007; SCOTTI *et al.*, 2007).

Com base nestas informações e em dados da literatura (NOMURA e HANO, 1994; HASSIMOTTO *et al.*, 2007; PADILHA, VILELA, *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013), neste trabalho foi avaliada a atividade antioxidante de

extrato de folhas de *Morus nigra* (amora preta), pois devido à cor da fruta, é possível inferir que os compostos fenólicos, incluindo flavonoides, podem estar presentes nesta espécie, proporcionando atividade antioxidante.

1.6. Amora preta (*Morus nigra* L.)

A espécie *Morus nigra* L. (Figura 1) pertence ao gênero *Morus*, família *Moraceae* e teve sua origem na Ásia. O gênero *Morus* é constituído por aproximadamente 24 espécies, uma subespécie e pelo menos 100 variedades. A espécie *Morus nigra* L. foi aclimatizada no Brasil sendo uma espécie não nativa (PADILHA, MOREIRA, *et al.*, 2010).

Figura 1. Frutos e folhas de *Morus nigra* L.



(Fonte: http://www.hedging.co.uk/acatalog/pics_10581.html)

Morus nigra L., também conhecida como amora preta, é uma planta cultivada em jardins. Sua fruta fresca é de difícil comercialização devido à fragilidade e, por isso, seu comércio é realizado, principalmente, na forma de geléia (HASSIMOTTO *et al.*, 2007).

Estudos realizados revelaram que a espécie *Morus nigra* tem sido utilizada não apenas devido a seus valores alimentares nutricionais, mas também devido às ações terapêuticas que podem ser observadas não só dos frutos mas, também, de outras partes das plantas, tais como caule e folhas (NADERI *et al.*,

2004). Ao verificar a existência de propriedades terapêuticas em extratos obtidos a partir das frutas, folhas e caule da *Morus nigra* (NOMURA e HANO, 1994; NADERI *et al.*, 2004; HASSIMOTTO *et al.*, 2007; PADILHA, MOREIRA, *et al.*, 2010; PADILHA, VILELA, *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013) é possível a utilização destes extratos para o desenvolvimento de fitocosméticos, aumentando o valor agregado ao cultivo desta planta.

Algumas das propriedades terapêuticas verificadas são analgésica, diurética, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, lipolítica, cicatrizante, antisséptica, vermífuga, hipoglicemiante, tratamento do climatério, entre outras. Além disso, outras espécies pertencentes ao gênero *Morus* (principalmente *Morus alba*), também apresentaram propriedades semelhantes (NOMURA e HANO, 1994; NADERI *et al.*, 2004; HASSIMOTTO *et al.*, 2007; PADILHA, MOREIRA, *et al.*, 2010; PADILHA, VILELA, *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013).

Como as frutas são utilizadas, devido aos seus valores nutricionais, na forma de alimento sua aplicação na área farmacêutica e cosmética não é amplamente explorada. Desta forma, para aplicação nestas áreas é possível a utilização das folhas e caule para melhor aproveitamento da planta sem prejudicar o setor alimentício em atuação.

As plantas pertencentes ao gênero *Morus* são ricas em compostos fenólicos, tais como, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina, quercetina, entre outros (KANG *et al.*, 2006; ERCISLI e ORHAN, 2007; LIN e TANG, 2007; ERCISLI e ORHAN, 2008; HUANG *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos encontrados nas espécies do gênero *Morus* fazem parte da classe de compostos que conferem propriedades antioxidante e antitumoral a espécie, além disso, são responsáveis pela atividade anti-inflamatória desempenhada pelos extratos (KANG *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2009; PADILHA, VILELA, *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013).

Ercisli e Orhan (2008) avaliaram extratos metanólicos de frutas de cinco genótipos diferentes de *Morus nigra* sendo observado que o teor de compostos fenólicos, teor de flavonóides e potencial antioxidante se alteraram entre os diferentes genótipos. Desta forma, dependendo da característica desejada, é possível determinar qual genótipo deve ser cultivado, sendo esta informação extremamente importante quando se pensa em cultivo comercial (ERCISLI e ORHAN, 2008).

Padilha e colaboradores (2010) verificaram o efeito anti-inflamatório de extrato de *Morus nigra* utilizando diclorometano como solvente extrator. Neste caso, foi verificado efeito anti-inflamatório do extrato pelo ensaio *in vivo* de edema de pata, porém os mecanismos pelos quais este efeito é obtido ainda precisam ser investigados (PADILHA, VILELA, *et al.*, 2010).

Ou e colaboradores (2011) avaliaram se o extrato de frutos de *Morus alba* L. era capaz de inibir o acúmulo de triglicerídeos no fígado e, como afetaria o metabolismo em hepatoma humano (células HepG2). O resultado demonstrou que o extrato avaliado foi capaz de inibir a biossíntese de lipídios, podendo ser utilizado na prevenção de acúmulo de gordura no fígado (OU *et al.*, 2011).

Iqbal e colaboradores (2012) avaliaram extrato metanólico 80% de folhas de três espécies pertencentes ao gênero *Morus* (*Morus alba* L., *Morus rubra* L. e *Morus nigra* L.). Foram analisados diferentes parâmetros físico-químicos sendo observada diferença na composição centesimal em relação ao teor de fibras, proteínas, entre outros. Além disso, foi verificado que o teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante também são diferentes entre as espécies, possibilitando concluir que *Morus rubra* contém maior teor de nutrientes podendo ser utilizada como nutracêutico e *Morus nigra* apresentou maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, sendo indicada, dentre as espécies estudadas para uso em doenças devido ao potencial preventivo (IQBAL *et al.*, 2012).

Park e colaboradores (2013) obtiveram extratos de folhas de amoreira utilizando solventes orgânicos. Segundo dados da pesquisa, o uso de solvente orgânico é capaz de extrair de 2 a 3 vezes mais compostos fenólicos quando comparados a solventes aquosos. Além disso, os autores avaliaram a atividade anti-inflamatória e citotóxica (em macrófagos) dos extratos, sendo concluído que o extrato é eficaz e seguro para as atividades propostas (PARK *et al.*, 2013).

Analizando os estudos sobre extratos de plantas do gênero *Morus*, a proposta deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e a citotoxicidade de extratos hidroetanólicos e aquoso de folhas de *Morus nigra* para obtenção de um ativo cosmético eficaz e seguro para utilização em fitocosmético para prevenção do envelhecimento cutâneo.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar em extratos de folhas de *Morus nigra* obtidos com diferentes solventes extratores, o seu potencial como ativo cosmético no desenvolvimento de um fitocosmético com para prevenção do envelhecimento cutâneo.

Para atingir os objetivos foram realizados:

- Coleta do material vegetal e preparo de extratos de folhas de *Morus nigra*, em diferentes solventes extratores;
- Avaliação do teor de compostos fenólicos e flavonóides dos quatro extratos de folhas de *Morus nigra* obtidos;
- Avaliação do potencial antioxidante dos quatro extratos de folhas de *Morus nigra* frente a várias espécies reativas;
- Definição do extrato de maior potencial antioxidante para continuação dos experimentos;
- Avaliação do potencial citotóxico do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra*;
- Avaliação do potencial quimioprotetor do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra*;
- Avaliação do potencial de estimular a biossíntese de colágeno do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra*;
- Validação de metodologia analítica para quantificação do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra*;
- Avaliação a estabilidade do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* em solução aquosa;
- Desenvolvimento de formulação para incorporação do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* de maior potencial antioxidante;
- Caracterização reológica da formulação desenvolvida.

3. Material e Métodos

3.1. Equipamentos

Espectrofotômetro UV/Vis (Beckman); espectrofotômetro de placas (Bio-rad Model 550 e Biotek (Power Wave XS2)); espectrofotômetro OceanOptics USB 4000 com agitação magnética e termostatização com peltier; estufa de CO₂ (Shel Lab); agitador (Labor Technik RW20DZM.n); reômetro AR2000ex utilizando sensor cone-placa (diâmetro = 40mm e angulação = 2°); estufa (Quimis); peagômetro (GeHaka PG 1800); estufa de ar circulante (Soc Fabel modelo 170), tamises; liquidificador doméstico (Arno); evaporador rotativo (Marconi MA-120), liofilizador (Moduloyd Freeze Dryer – Thermo Scientific); centrífuga; pipetadores automáticos com volume variável (Eppendorf).

3.2. Preparo do material vegetal

Ramos de amoreira contendo folhas foram coletados na cidade de São Lourenço do Turvo, SP. Uma exsicata foi preparada e enviada para o Herbário do Laboratório de Zoologia e Botânica da UNESP, Campus São José do Rio Preto para identificação da espécie.

As folhas foram colhidas no dia 28 de fevereiro de 2013, no período da tarde, por volta de 16 horas. No mesmo dia, as folhas foram limpas sendo retiradas impurezas e colocadas para secar em estufa de ar circulante a 40° C até que o peso se mantivesse constante.

Após a determinação da perda de água, o material seco foi triturado e acondicionado em recipiente de vidro hermeticamente fechado mantido à temperatura de $-5 \pm 2^\circ \text{C}$.

3.3. Preparo dos extratos

A partir do material seco, foram preparados quatro extratos, utilizando como solventes extratores etanol 50% (v/v), etanol 70% (v/v), etanol 90% (v/v) e água deionizada.

As extrações com solução hidroetanólica foram realizadas por maceração com proporção de solvente 1:15 (g/mL) (RADOJKOVIĆ *et al.*, 2012) ao final do período de 96 horas (4 dias), sendo o solvente trocado a cada 24 horas.

A extração com água deionizada foi realizada com a mesma proporção em massa de material vegetal seco:volume de solvente (1:15, m/v) que no processo de maceração; porém, a técnica extrativa utilizada foi a infusão, devido a problemas de contaminação microbiológica.

Os extratos obtidos (hidroetanólico 50%, E₅₀; hidroetanólico 70%, E₇₀, hidroetanólico 90%, E₉₀) foram submetidos à rotaevaporação até eliminação do solvente e, em seguida, os quatro extratos foram liofilizados para obtenção de extratos secos. O material seco foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado à temperatura $-5 \pm 2^\circ \text{C}$.

3.4. Determinação do teor de compostos fenólicos

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos (E₅₀, E₇₀, E₉₀ e E_{Aq}) inicialmente foi obtida uma curva analítica com ácido gálico, utilizado como padrão de compostos fenólicos, adicionando a tubos de ensaio 400,0 µL de solução de ácido gálico (0,0 a 5,4 µg/mL) e, em seguida, 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Após 8 minutos, 1,5 mL de carbonato de sódio 7,5% (m/v) foram adicionados ao meio reacional. Foram aguardados 30 minutos e as absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro em 415 nm (SINGLETON e ROSSI, 1965; KAHKONEN *et al.*, 1999).

O mesmo procedimento foi realizado para os extratos (E₅₀, E₇₀, E₉₀ e E_{Aq}) na concentração de 50,0 µg/mL. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para calcular o teor de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100,0 g do extrato seco. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5. Determinação do teor de flavonóides

Para a determinação do teor de flavonoides dos extratos (E₅₀, E₇₀, E₉₀ e E_{Aq}) inicialmente foi obtida uma curva analítica com quercetina, utilizada como

padrão de flavonoides, adicionando 500,0 µL de solução de quercetina em diferentes concentrações (0,0 a 10,2 µg/mL) a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida, foram adicionados 100,0 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% (m/v), 100,0 µL de solução aquosa de acetato de sódio (CH_3COONa) na concentração de 1 mol/L e 2,8 mL de água, para volume final de 5,0 mL. Após 30 minutos, as soluções foram avaliadas em espectrofotômetro em 510 nm (HO *et al.*, 2012).

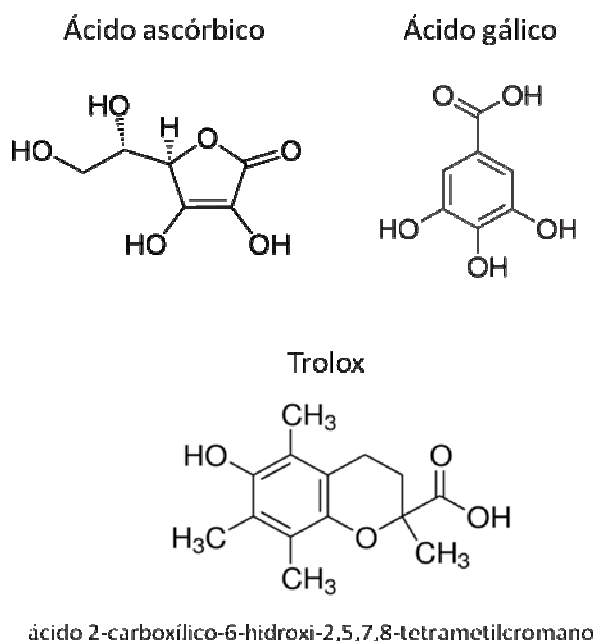
O mesmo procedimento foi realizado para os extratos (E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq}) na concentração de 260,0 µg/mL. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para calcular o teor flavonóides equivalentes à quercetina e os resultados foram expressos em mg de flavonoides equivalentes à quercetina (FEQ) por 100,0 g do extrato seco. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6. Avaliação do potencial antioxidante

Para avaliação do potencial antioxidante foram utilizados radicais modelos ($\text{DPPH}^\bullet$ e $\text{ABTS}^{+\bullet}$) e radicais biológicos ($\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl/OCl^- , H_2O_2 , $\text{ROO}^\bullet$).

Como padrões antioxidantes foram utilizados ácido ascórbico, ácido gálico e Trolox (Figura 2). O ácido ascórbico e o Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) foram utilizados devido à atividade antioxidante reconhecida e o ácido gálico foi utilizado uma vez que dados da literatura (CHAN *et al.*, 2009) indicam sua presença em extratos de folhas de amoreira. Os mesmos padrões foram mantidos para todos os ensaios de atividade antioxidante.

Figura 2. Estrutura química dos padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante.



3.5.1. Método de captura do DPPH[•]

A determinação do potencial antioxidante dos extratos (E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq}) foi realizada adicionando 2,5 mL de solução metanólica do radical DPPH a 1,0 mL de solução aquosa dos extratos em diferentes concentrações. A mistura reacional foi mantida ao abrigo de luz durante 30 minutos e os valores de absorbância avaliados em espectrofotômetro em 515 nm (CHIARI, B G *et al.*, 2012). As concentrações testadas para cada extrato foram diferentes devido à diferença entre o potencial de cada um deles, sendo de 0,0 a 200 µg/mL para o E_{50} e E_{90} ; de 0,0 a 170 µg/mL para o E_{70} e de 0,0 a 150 µg/mL para o E_{Aq} .

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de captura do DPPH[•] (equação 1).

$$\% \text{ Captura} = \frac{(ABS_{max} - ABS_{amostra})}{ABS_{max}} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

ABS_{max} é a absorbância na ausência de extrato;

$ABS_{amostra}$ é a absorbância na presença de extrato.

A partir dos valores de concentrações utilizadas e os valores de porcentagem de captura obtidos foi possível obter uma curva analítica e calcular o valor de CE_{50} , concentração efetiva 50, ou seja, quantidade de extrato necessária para capturar 50% dos radicais DPPH em solução. O mesmo procedimento foi realizado para o ácido ascórbico (nas concentrações de 0,0 a 7 $\mu\text{g/mL}$), para o ácido gálico (nas concentrações de 0,0 a 1,7 $\mu\text{g/mL}$) e para o trolox (nas concentrações de 0,0 a 9,15 $\mu\text{g/mL}$) como substâncias padrão.

3.5.2. Método de inibição do $ABTS^{+}$

A determinação do potencial antioxidante dos extratos (E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq}) pelo método de inibição do cátion radical ABTS foi realizada após o preparo do $ABTS^{+}$ através da reação de 5,0 mL de solução aquosa do sal de ABTS (7 mM) com 88,0 μL de solução de persulfato de potássio (140 mM) por 18 horas à temperatura ambiente na ausência de luz (RUFINO *et al.*, 2007; ALMEIDA, M. G. J. d. *et al.*, 2013).

Antes de dar início ao experimento, o radical $ABTS^{+}$ foi diluído em etanol até que sua absorbância em 734 nm (espectrofotômetro UV/Vis) atingisse o valor de $1,00 \pm 0,05$. Em seguida, 2,0 mL da solução diluída do radical foram adicionados a 1,030 mL de amostra e, após 6 minutos, foram avaliados em espectrofotômetro UV/Vis em 734 nm. As concentrações testadas para cada extrato foram diferentes, devido à diferença de potencial antioxidante entre eles, sendo de 0,0 a 74 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{50} , de 0,0 a 45 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{70} , de 0,0 a 76 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{90} e de 0,0 a 60 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{Aq} .

As absorbâncias das amostras foram utilizadas para calcular a porcentagem de captura do $ABTS^{+}$. Foi obtida uma curva analítica com os

valores de concentração e porcentagem de captura das amostras e, a partir desta curva, foi calculado o valor de CE_{50} para cada um dos extratos. O mesmo procedimento foi realizado utilizando o ácido ascórbico (concentrações de 0,0 a 3,5 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (concentrações de 0,0 a 1,35 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (concentrações de 0,0 a 9 $\mu\text{g/mL}$) como substâncias padrão.

3.5.3. Método de captura de ânion radical superóxido (atividade como da SOD)

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos (E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq}) pelo ensaio de captura de ânion radical superóxido (*SOD-like activity*) foi realizado utilizando o *SOD determination kit* (Sigma-Aldrich). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços conforme apresentado na Figura 3.

Inicialmente, 20,0 μL das soluções de amostras foram adicionadas nos poços correspondentes a AMOSTRA e BRANCO 2 sendo que, em cada linha, a concentração da amostra e do branco 2 eram as mesmas. As concentrações testadas para cada extrato foram de 0,0 a 155 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{50} , de 0,0 a 80 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{70} , de 0,0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{90} e de 0,0 a 125 $\mu\text{g/mL}$ para o E_{Aq} . A diferença observada entre as concentrações testadas para cada extrato ocorre devido à diferença entre o potencial antioxidante de cada um deles. Nos poços correspondentes ao BRANCO 1 e BRANCO 3 foram adicionados 20 μL de água Mili-Q ao invés de amostra. Em seguida, em todos os poços da placa foram adicionados 200 μL da solução de trabalho do WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt). A mistura foi agitada e, em seguida, adicionados 20 μL de tampão de diluição nos poços correspondentes ao BRANCO 2 e BRANCO 3. Nos poços correspondentes ao BRANCO 1 e a AMOSTRA foram adicionados 20 μL de solução de trabalho da enzima (xantina oxidase). A placa foi agitada e incubada a 37 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos e, em seguida, os valores de absorbância foram obtidos, em espectrofotômetro de placas, em 450 nm.

Figura 3. Esquema da placa utilizada no ensaio de atividade antioxidante pelo método de captura de ânion radical superóxido.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRANCO 1			-----			BRANCO 3			-----		
B												
C												
D	AMOSTRA			BRANCO 2			AMOSTRA			BRANCO 2		
E												
F												
G												
H												

A porcentagem de captura do ânion radical superóxido foi calculada conforme a equação 2.

$$\% \text{ Captura} = \left\{ \frac{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}}) - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco2}})}{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}})} \right\} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

Onde, A_{branco1} , A_{branco2} , A_{branco3} e A_{amostra} são os valores de absorbância dos poços referentes ao BRANCO 1, BRANCO 2, BRANCO 3 AMOSTRA, respectivamente.

A partir dos valores de porcentagem de captura e concentração de cada extrato foram obtidas curvas analíticas para cada um dos extratos e o valor de CE_{50} foi calculado. O ensaio também foi realizado para os padrões ácido ascórbico (0,0 – 40 µg/mL), ácido gálico (0,0 – 3,0 µg/mL) e trolox (0,0 – 60 µg/mL).

3.5.4. Método de captura de ânion radical superóxido

Além da atividade como da SOD a avaliação da atividade antioxidante por captura de ânion radical superóxido foi realizada em tampão pirofosfato de sódio (25mM) pH 8,3. Inicialmente, foram adicionados 150,0 µL de tampão, amostra, variando seu volume para obter diferentes concentrações, 10,0 µL de

metassulfato de fenazina (PMS) (372 μM) e 25,0 μL de azul de tetrazólio (NBT) (600 μM). A placa foi incubada por 2 minutos e, em seguida, foram adicionados 15,0 μL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (1560 μM) seguidos de 2 minutos de incubação. Ao final, foi adicionada água destilada para completar o volume para 300,0 μL . As absorbâncias foram avaliadas, em espectrofotômetro de placas, em 560 nm, para determinação da quantidade de formazana gerada, uma vez que é proporcional à quantidade de ânion radical superóxido em solução, pois, é a partir da reação entre o ânion radical superóxido e o NBT, que a formazana é formada (HAZRA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2010).

A partir dos valores de absorbância obtidos foi calculada a porcentagem de captura do ânion superóxido. Uma curva analítica foi obtida e o valor de CE_{50} , quantidade de substância necessária para capturar 50% dos radicais em solução, foi determinado para cada substância avaliada.

Para o E_{70} foram avaliadas concentrações de 0,0 a 1085 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio também foi realizado para os padrões, ácido ascórbico (0,0 – 60 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (0,0 – 41 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (0,0 – 950 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.5. Ensaio do clareamento da crocina

O ensaio do clareamento da crocina foi realizado em tampão fosfato de sódio (120 mM) pH 7,0 sendo adicionados 24,4 $\mu\text{g/mL}$ de crocina em dimetilsulfóxido (DMSO) e diferentes concentrações de E_{70} (0,0 a 50,8 $\mu\text{g/mL}$) e padrões, ácido ascórbico (0,0 a 0,810 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (0,0 a 4,17 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (0,0 a 6,26 $\mu\text{g/mL}$) utilizando água destilada como solvente. Para o início da reação foi adicionada solução de AAPH (2,2'-azobis-(2-aminopropano) 12,5 mM preparada em tampão fosfato (120 mM) pH 7,0, sendo o volume final de reação de 2,0 mL. A reação foi monitorada em espectrofotômetro (OceanOptics USB 4000) em 443 nm, por 10 minutos, à temperatura de 40 ± 2 °C e agitação constante, sendo observada velocidade linear de clareamento da crocina após 1 minuto da adição do AAPH. Foi verificada a possível interferência das amostras realizando o ensaio na ausência de crocina (BORS *et al.*, 1984).

3.5.6. Capacidade de captura do HOCl/OCl⁻

Para a realização deste ensaio, o agente oxidante ácido hipocloroso (HOCl/OCl⁻) foi preparado a partir da diluição do hipoclorito de sódio (NaOCl) 12% em hidróxido de sódio (NaOH) 10 mM, a fim de determinar a concentração do OCl⁻, por espectrofotometria com o uso de seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 292 nm) (ZGLICZYN.JM *et al.*, 1971).

Em placas de 96 poços, foram adicionados 180,0 μL de tampão fosfato (50 mM) pH 7,4; 40,0 μL de amostra (para o teste) ou solvente (para o branco) e volume de HOCl para obter uma concentração de 30 μM no volume final de reação. O volume de HOCl foi determinado pelo cálculo através do coeficiente de extinção molar. A placa foi incubada à temperatura ambiente, $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em ausência de luz por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60,0 μL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (1,4mM) e a placa foi incubada, novamente, durante 5 minutos. A leitura foi realizada espectrofotometricamente, em 652 nm.

O ensaio foi realizado para o E₇₀ (de 0 a 9 $\mu\text{g/mL}$) e para os padrões ácido ascórbico (de 0,0 a 4,8 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (de 0,0 a 1,25 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (de 0,0 a 8 $\mu\text{g/mL}$). O resultado foi expresso em porcentagem de captura de HOCl/OCl⁻ e o valor de CE₅₀ foi calculado a partir da equação da reta. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.5.7. Capacidade de captura sobre o H₂O₂

Para a avaliação da capacidade de captura sobre o H₂O₂, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB) foi preparado de acordo com Ching et al (1994). Após o preparo, a concentração da solução de TNB foi determinada, a partir do valor de absorção da solução em 412 nm, utilizando o coeficiente de absortividade molar de $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, neste comprimento de onda (CHING *et al.*, 1994).

A solução estoque de H₂O₂ deve estar a 15 mM para que, ao adicionar no tubo, sua concentração seja de 0,3 mM. Desta forma, foi preparada a partir da diluição da solução a 30% e sua concentração foi aferida, espectrofotometricamente, em 230 nm ($\epsilon = 80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BRETEL, 1985).

O ensaio foi realizado em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 pela adição da amostra e 0,3 mM de H_2O_2 , com incubação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado TNB (53 μM) e, novamente, houve incubação por 1 hora, a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 412 nm.

A partir dos valores de absorbância, foi calculada a porcentagem de captura do H_2O_2 através da inibição da oxidação do TNB com mesma equação utilizada para o cálculo da porcentagem de captura para o DPPH $^\bullet$ (Equação 1, item 3.5.1).

O ensaio também foi realizado na presença de catalase como padrão da reação (de 0,0 a 0,8 U/mL), além do ácido ascórbico (até 78 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (até 850 $\mu\text{g/mL}$), trolox (até 625 $\mu\text{g/mL}$) e E_{70} (até 2575 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada uma das substâncias.

3.7. Avaliação da citotoxicidade do E_{70} em células HepG2, HaCat e HDFa

A avaliação do potencial citotóxico do E_{70} foi avaliada pelo método do 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT).

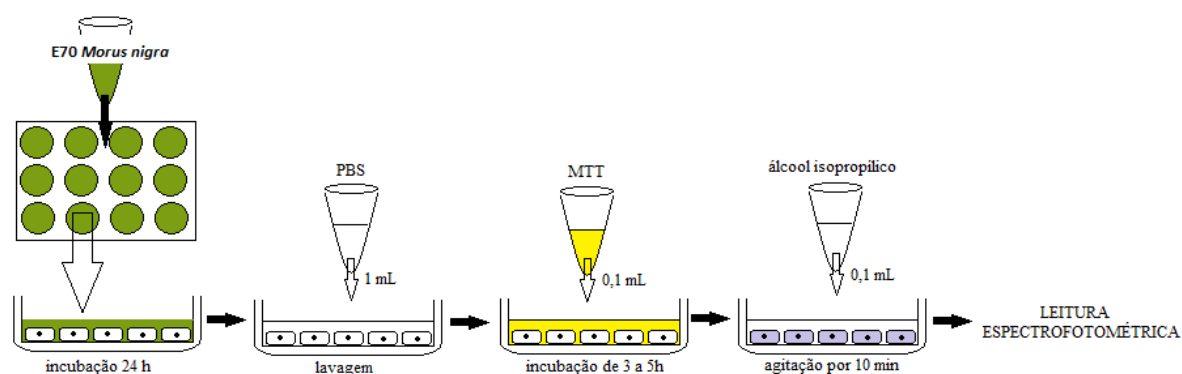
Cada linhagem celular foi cultivada em meio de cultura específico: MEM (*Minimal Essential Medium*) para HaCat e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para HepG2 e HDFa, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas celulares foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de gás carbônico (CO_2). Quando foi atingido de 80 a 90% de confluência, as células foram tripsinizadas e a atividade da tripsina foi interrompida utilizando meio de cultura contendo SFB. A suspensão celular foi centrifugada, a 1500 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e meio de cultura suficiente foi adicionado ao *pellet* de células, dando origem a uma nova suspensão celular com densidade de 1×10^6 células/mL. Essa suspensão foi semeada em placas de 96 poços, 100 μL em cada poço. As placas foram incubadas por 24 horas para completa adesão celular às placas.

Após a adesão celular às placas, o meio de cultura foi completamente removido e as células foram tratadas com 100 μL de diferentes concentrações do extrato, utilizando como solvente meio de cultura sem soro. Como controle

positivo, foi utilizado DMSO a 10% em meio de cultura sem soro e, como controle negativo, apenas meio de cultura sem soro. As placas foram novamente incubadas, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas.

Decorridas 24 horas, o tratamento foi removido e as placas foram lavadas com tampão fosfato salina (*phosphate buffer saline* – PBS) (BRUGGISSER *et al.*, 2002) e 100 µL de MTT (1mg/ml em PBS) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violeta de formazana (3 a 5 horas). A solução de MTT foi retirada da placa e, para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço. Após completa solubilização dos cristais violeta de formazana, as absorbâncias foram obtidas em leitor de placas, a 595 nm (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT.



Fonte: adaptado de (CHIARI, Bruna Galdorfini, MARTINI, Paula C, *et al.*, 2012).

Com os valores de absorbância obtidos, foi possível calcular a porcentagem de células não viáveis em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2004). A partir da porcentagem de células não viáveis, foi possível calcular a porcentagem de células viáveis. Com estes valores, foi construída uma curva dose *versus* resposta e o valor de CE₅₀, concentração de extrato necessária para que a viabilidade celular seja de 50%, foi calculado. Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem celular e, cada um deles, foi realizado em triplicata.

3.8. Avaliação do potencial quimioprotetor do E₇₀ em células HepG2 e HaCat

Para avaliação do efeito quimioprotetor foi realizada a mesma metodologia descrita para avaliação da citotoxicidade (item 3.6), no entanto, o tratamento das células foi realizado de duas maneiras diferentes. O primeiro teste foi denominado co-tratamento e foi utilizado concomitantemente o E₇₀ em diferentes concentrações (HepG2 até 7,5 mg/mL e HaCat até 3,4 mg/mL) e o H₂O₂ na concentração referente ao CE₅₀. O segundo teste foi denominado pré-tratamento, no qual as células foram tratadas por 24 horas com o E₇₀ e decorrido este período o tratamento com E₇₀ foi retirado e realizado um novo tratamento com H₂O₂ na concentração referente ao CE₅₀. Foram utilizados o meio de cultura como controle negativo e apenas o H₂O₂ como controle positivo (CHIARI-ANDRÉO, 2014).

O efeito protetor do E₇₀ contra os danos induzidos pelo H₂O₂ foi avaliado por comparação dos resultados apenas com o H₂O₂ e com a utilização do E₇₀. Os ensaios foram realizados em triplicata, com três experimentos independentes.

3.9. Avaliação da biossíntese de colágeno em células HDFa

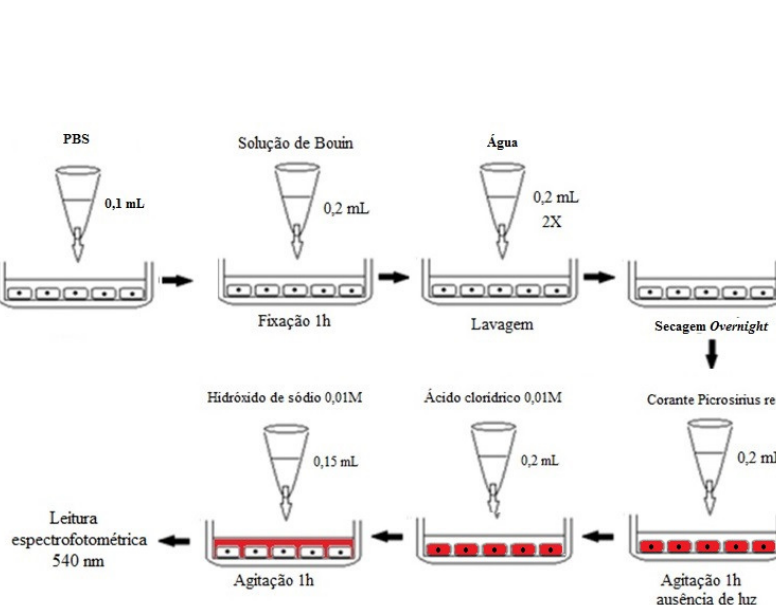
Para a avaliação da capacidade do extrato (E₇₀) em aumentar a taxa de biossíntese de colágeno em HDFa, as células foram cultivadas conforme descrito no item 3.6 até a etapa do tratamento, no entanto, não foi utilizado controle positivo apenas como controle negativo DMEM sem soro. Foram testadas concentrações de 0 a 6000 µg/mL do E₇₀ utilizando como solvente DMEM sem soro.

O tratamento foi descartado 24 horas após sua adição à placa. Em seguida, a placa foi lavada com 100 µL de PBS que também foram descartados. A cada poço, foram adicionados 200 µL de solução de Bouin para fixar o material. Após 1 hora, a solução de Bouin foi descartada e a placa lavada com água de torneira até remover totalmente a cor do sobrenadante.

Todo o líquido foi retirado da placa, que foi mantida à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) *overnight* para completa secagem.

Depois que a placa já estava seca, foram adicionados 200 μL da solução de vermelho Sirius (Sirius Red – Sigma Aldrich) em cada poço. A placa foi mantida sob agitação, em ausência de luz, por 1 hora. Em seguida, o sobrenadante foi removido e a placa foi lavada com 200 μL ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L até completa remoção da cor do sobrenadante (4 vezes). Foram adicionados a cada poço, 200 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol/L e a placa foi mantida em agitação por, 1 hora, para completa solubilização das fibras colágenas. As absorbâncias foram obtidas em leitor de placas a 540 nm (Figura 5). Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata.

Figura 5. Representação esquemática do tratamento com extrato até a leitura do ensaio para avaliação da estimulação de biossíntese de colágeno pelo E₇₀.



A partir dos valores de absorbância, foi calculada a porcentagem de colágeno produzido pelas células tratadas com E₇₀ em relação ao controle negativo.

3.10. Validação de metodologia de quantificação do E₇₀ pelo método de captura do radical ABTS

A validação do método de captura do ABTS^{•+} para a quantificação do E₇₀ em ensaios como liberação *in vitro* e estabilidade química da formulação contendo extrato foi realizada segundo a Resolução – RE nº 899, de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2003). Foram analisados linearidade, precisão, exatidão, especificidade e seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

3.9.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da obtenção de três curvas analíticas experimentais. Foram utilizadas soluções aquosas de E₇₀ em uma faixa de concentração que variou de 0,0 a 45,0 µg/mL sendo utilizado o método de captura do ABTS^{•+} (ALMEIDA, M. G. J. d. *et al.*, 2013). As três curvas foram realizadas em triplicata e, com a média desses valores, foi obtida uma curva de linearidade. A equação que descreve a curva analítica e o coeficiente linear foi obtida através da regressão linear. Foram consideradas lineares equações onde o valor do coeficiente linear foi igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003).

3.9.2. Precisão

A avaliação da precisão do método analítico foi realizada em dois níveis: precisão intermediária (precisão intercorridas) e repetitividade (precisão intracorrida). Em ambos os casos foi calculada como desvio padrão relativo, segundo a equação 3:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \text{ (Equação 3),}$$

onde:

DPR = desvio padrão relativo;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003).

O método foi considerado preciso quando o DPR não ultrapassou 5% (BRASIL, 2003).

Para avaliação da precisão do método, foram realizadas determinações, em triplicata, de três diferentes concentrações da solução aquosa do E₇₀ compreendidas no intervalo de linearidade do método. Foram realizadas avaliações da repetitividade (precisão intra-dia), com análises realizadas em um mesmo dia, porém em períodos diferentes, utilizando o mesmo equipamento e o mesmo analista, e precisão intermediária (precisão inter-dia) com análises realizadas com as mesmas condições que para repetitividade, porém em dias diferentes. Neste caso, não foi avaliada a reprodutibilidade do método.

3.9.3. Exatidão

A exatidão de um método avalia o quão próximo o resultado experimental está do teórico. Neste caso, a exatidão foi avaliada pela recuperação de três concentrações de E₇₀ conhecidas e compreendidas no intervalo de linearidade do método. A relação entre a concentração experimental observada e a concentração teórica foi avaliada. O método foi considerado exato quando os valores de recuperação foram entre 95 e 105% (BRASIL, 2003).

3.9.4. Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade de um método analítico avaliam se o método é capaz de quantificar apenas o analito de interesse ou se sofre influência da matriz no qual ele está inserido. Neste caso, foram realizadas determinações, em triplicata, de três diferentes concentrações do E₇₀ compreendidas na faixa de linearidade do método, utilizando uma formulação emulsionada na qual o extrato seria inserido, para quantificação em estabilidade química. Os resultados obtidos foram comparados com o da curva de linearidade. A especificidade e seletividade foram expressas como DPR. O método foi considerado específico e seletivo quando o DPR observado foi igual ou menor que 5% (BRASIL, 2003).

3.9.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção do método foi calculado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base, através da equação 4:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 4}),$$

onde,

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações da substância ativa próximas ao suposto limite de quantificação;

IC = inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação foi calculado da mesma maneira que o limite de detecção, porém ao invés de três vezes o ruído da linha de base foi calculado por dez vezes este valor, pela equação 5:

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 5}),$$

onde:

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do ativo próximas ao suposto limite de quantificação;

IC = inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

3.9.6. Robustez

A robustez do método foi realizada variando o fabricante do etanol utilizado na diluição do cátion radical. Para isso, foram realizadas determinações em triplicata de três diferentes concentrações do E_{70} compreendidas na faixa de linearidade do método. O método foi considerado robusto quando o valor do DPR não ultrapassou 5% (BRASIL, 2003).

3.11. Avaliação da estabilidade da solução aquosa do extrato E₇₀

A avaliação da estabilidade do extrato em solução aquosa foi realizada por varredura entre 190 e 500 nm, uma vez que a solução do extrato apresentou pico de absorção neste intervalo de comprimento de onda, além da avaliação da atividade antioxidante do extrato, pelo método de inibição do radical ABTS, por um período de 10 dias.

3.12. Obtenção da formulação cosmética

A formulação utilizada neste trabalho foi uma emulsão do tipo O/A preparada por técnica a frio. Neste caso, todos os componentes, exceto a água, foram adicionados em um béquer e, a água foi acrescentada lentamente, sob agitação constante. Ao final do processo, realizado à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), a formulação obtida foi denominada formulação base (FB). Nesta formulação, foi adicionado E₇₀ para obtenção do fitocosmético (Fito). A quantidade de extrato incorporada foi determinada com base em ensaios de atividade antioxidante e citotoxicidade.

3.13. Caracterização reológica da formulação

A caracterização reológica das formulações (FB e Fito) foi realizada em reômetro AR2000ex utilizando sensor cone-placa (diâmetro = 40mm e angulação = 2°). Os dados foram analisados pelo software *Rheology Advantage Instrument Control AR*.

Para a determinação do comportamento reológico das formulações foram realizados testes de propriedade de fluxo, com taxa de cisalhamento de $0 - 100 \text{ s}^{-1}$ para curva ascendente e de $100 - 0 \text{ s}^{-1}$ para curva descendente, durante 120 segundos cada; varredura de tensão com tensão de cisalhamento de $0 - 10 \text{ Pa}$, com frequência constante de 20,0 Hz; varredura de frequência de $0 - 50 \text{ Hz}$, com tensão constante de 1 Pa; fluência e relaxação, com tensão de cisalhamento constante de 1,0 Pa por 120 segundos e recuperação, cessando a tensão aplicada, por 120 segundos (GREGOLIN *et al.*, 2010; CHIARI, Bruna

Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012; ISAAC, CEFALI, *et al.*, 2013; ISAAC, MORAES, *et al.*, 2013).

Os ensaios foram realizados à temperatura de $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em triplicata e apresentados como valores médios. Os gráficos foram obtidos em software Origin 8.6 e análises de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) foram realizadas, quando necessário.

4. Resultados e Discussão

4.1. Preparo do material vegetal

A espécie foi identificada no Herbário do Laboratório de Zoologia e Botânica da UNESP, Campus São José do Rio Preto como pertencente à Família *Moraceae*, espécie *Morus nigra* (SJRP3123840).

A quantidade de material fresco coletado foi de 1437,09 g e, após a secagem, a massa chegou a 432,14 g. Portanto, a perda de água foi de aproximadamente 70%, em massa. O material seco foi triturado e apenas o material com granulometria inferior a 0,59 mm foi utilizado na preparação dos extratos. Este material foi acondicionado em recipientes de vidro hermeticamente fechados e armazenados à temperatura de $-5 \pm 2^\circ \text{C}$.

4.2. Preparo dos extratos

A partir do material seco, foram utilizados quatro solventes extratores diferentes (etanol 50%, etanol 70%, etanol 90% e água deionizada), para preparação de diferentes extratos, a fim de verificar se o teor alcoólico do solvente ou o uso apenas de água deionizada no processo de extração interferiria no teor de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante dos extratos.

A extração com água deionizada foi realizada pela técnica de infusão, uma vez que ao deixar as folhas em contato com água, à temperatura de 25°C , no ambiente, ocorreu a proliferação de fungos, não permitindo a utilização do extrato.

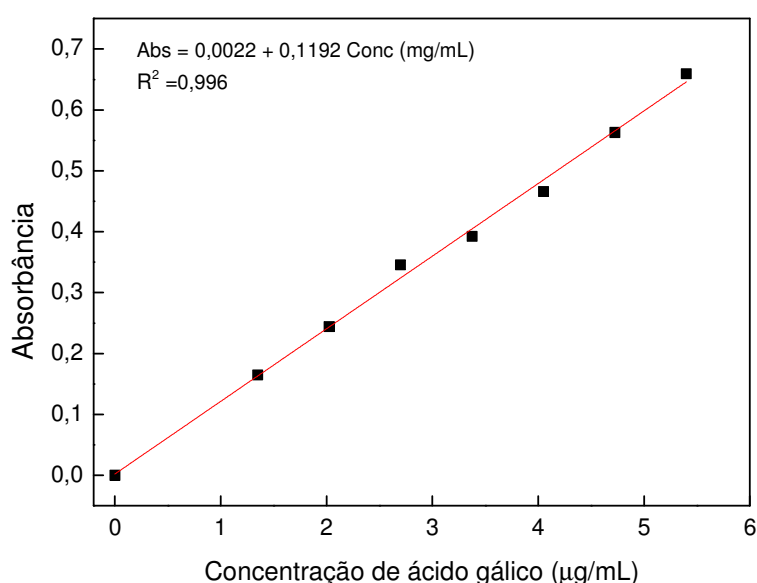
4.3. Avaliação do teor de compostos fenólicos

É comum a extração de compostos fenólicos em extratos vegetais, o que pode conferir atividade antioxidante devido à neutralização dos espécies reativas por doação de um átomo de hidrogênio (ligação entre O-H) ou pelo grau de estabilização das espécies radicalares formadas (WRIGHT *et al.*, 2001; F'GUYER *et al.*, 2003; CAO *et al.*, 2005; NIKOLIC, 2006). Por este motivo, foi importante a determinação do teor de compostos fenólicos totais em extratos

de *Morus nigra*, cuja finalidade é sua utilização como ativo cosmético em produtos para prevenir o envelhecimento cutâneo.

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada utilizando como padrão o ácido gálico, sendo obtida inicialmente uma curva analítica do padrão (Figura 6) para posterior comparação com o valor obtido para os extratos.

Figura 6. Curva analítica do ácido gálico para determinação do teor de compostos fenólicos totais.



Após a regressão linear (Figura 6) da curva analítica do padrão, foi possível calcular a quantidade de compostos fenólicos equivalente ao ácido gálico que os extratos E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq} contêm. A alta concentração de compostos fenólicos é um indicativo de que o extrato apresenta propriedades antioxidantes e, por isso, seu uso pode apresentar benefícios ao consumidor, principalmente quando se trata de produtos cosmetodermatológicos (SOTO *et al.*, 2015).

Os extratos (E_{50} ; E_{70} ; E_{90} e E_{Aq}) foram avaliados na concentração de 50 µg/mL quanto à presença de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 1. Quantidade de compostos fenólicos totais presente nos extratos de folhas de *Morus nigra*.

Extrato de folha de <i>Morus nigra</i>	mg CFEAG/ 100 g de extrato seco (média $\pm$ DP)
E ₅₀	5778 $\pm$ 90 ^a
E ₇₀	7175 $\pm$ 76 ^b
E ₉₀	6164 $\pm$ 28 ^c
E _{Aq}	4880 $\pm$ 38 ^d

*CFEAG: compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico; DP: desvio padrão; a,b,c,d: letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 1) foi possível verificar que o extrato E₇₀ contém maior quantidade de compostos fenólicos, enquanto o extrato aquoso (E_{Aq}) foi o que apresentou menor quantidade desta classe de compostos.

Estes dados estão de acordo com o relatado na literatura, onde é relatado que solventes com alta polaridade como a água ou de muito baixa polaridade e apolares não são bons sistemas extratores de compostos fenólicos (LIU *et al.*, 2000; VIZZOTTO e PEREIRA, 2011). Além disso, a água pura como solvente é capaz de extrair ácidos orgânicos, açúcares e proteínas solúveis, que são substâncias que não pertencem à classe de compostos fenólicos, dificultando sua extração (CHIRINOS *et al.*, 2007; VIZZOTTO e PEREIRA, 2011).

Com base nestas informações, é possível inferir que o E_{Aq} e o E₅₀ apresentam polaridades relativamente elevadas e não são capazes de extrair de maneira significativa os compostos fenólicos presentes nas folhas de *Morus nigra*. Além disso, a utilização de etanol 90% pode gerar uma polaridade menor que do etanol 70%, o que favorece a extração com o solvente mais hidratado (LIU *et al.*, 2000; VIZZOTTO e PEREIRA, 2011).

Iqbal e colaboradores (2012) obtiveram extrato de folhas de *Morus nigra* utilizando metanol 80% como solvente extrator e sonicação por 45 minutos a temperatura ambiente para extração, com proporção de 1:10 (g/mL) droga vegetal:solvente extrator. No estudo, o teor de compostos fenólicos observado foi de 24,37 mg CFEAG/g de extrato, ou seja, 2437 mg CFEAG/100g de extrato seco. Este fato indica que, apesar do etanol e metanol apresentarem polaridades semelhantes, o teor de compostos fenólicos obtido com metanol 80%, como solvente extrator e sonicação para extração, foi menor do que os solventes e as técnicas utilizadas neste estudo.

Desta forma, com os resultados apresentados neste estudo, é esperado que o E₇₀, por conter maior teor de compostos fenólicos, poderá apresentar maior atividade antioxidante quando comparado aos outros extratos avaliados, se sua atividade antioxidante estiver relacionada apenas à presença de compostos fenólicos; por isso, apenas este resultado não é suficiente para afirmar tal atividade.

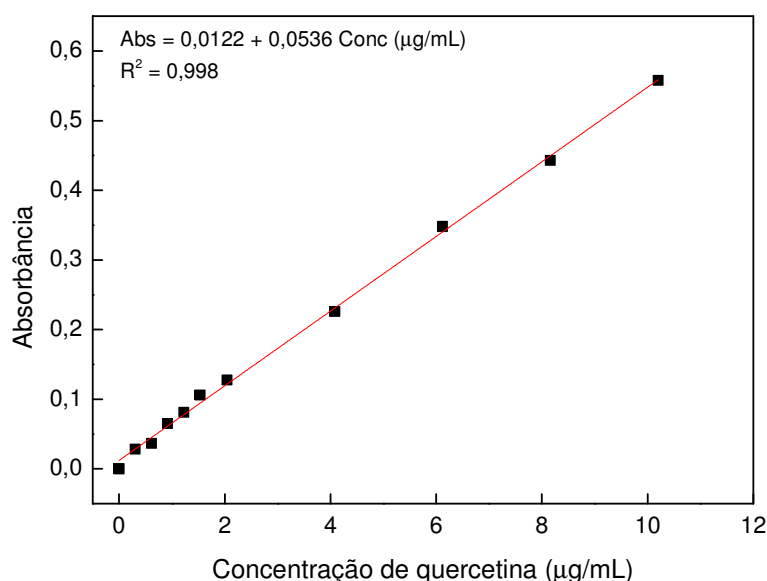
4.4. Avaliação do teor de flavonoides

Dentre a classe de compostos fenólicos, os flavonoides são os compostos de maior interesse cosmético, uma vez que sua estrutura é ideal para sequestrar espécies reativas, apresentando atividade antioxidante maior até mesmo que as vitaminas E e C (BARREIROS *et al.*, 2006; SCOTTI *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante destes compostos pode estar relacionada à diferentes fatores como à facilidade em doar um átomo de hidrogênio e elétrons, à capacidade de quelar metais, tais como ferro (Fe³⁺) e cobre (Cu²⁺), à estabilidade do radical formado e a sua capacidade de solubilização e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006).

Devido ao reconhecido potencial antioxidante de flavonoides e da presença de compostos fenólicos observada nos extratos de *Morus nigra* (E₅₀, E₇₀, E₉₀ e E_{Aq}), foi realizada a quantificação dos flavonoides totais presentes nestes extratos. Para tal avaliação, foi utilizada uma curva analítica padrão de quercetina (Figura 7).

Figura 7. Curva analítica da quercetina para determinação do teor de flavonoides totais.



A partir da equação da reta obtida pela regressão linear da curva analítica da quercetina, foi possível calcular o teor de flavonoides totais presente nos extratos. Para isso, foram avaliadas soluções dos extratos na concentração de 260 µg/mL. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 2. Quantidade de flavonoides totais presente nos extratos de folhas de *Morus nigra*.

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

*FEQ: Flavonoides equivalentes à quercetina; DP: desvio padrão; a,b: letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

Analisando os dados apresentados na Tabela 2, foi possível observar que, numericamente, o teor de flavonoides é maior no E₇₀ e menor para o E_{Aq}. Tais resultados eram esperados, uma vez que seguiu a mesma tendência que os resultados apresentados para o teor de compostos fenólicos. No entanto, ao realizar uma comparação estatística, não houve variação significativa entre E₇₀ e E₉₀ e, também, entre E₅₀ e E_{Aq}.

Este fato pode ter ocorrido pela diferença de polaridade entre os solventes utilizados, uma vez que, na classe dos flavonoides, existem os heterosídeos, que contêm, em sua estrutura, moléculas de açúcar, sendo mais solúveis em água e solventes de alta polaridade e, as agliconas, que apresentam solubilidade em solventes de polaridade intermediária (SIMÕES *et al.*, 2011).

Com base nos resultados apresentados, aliado à presença de compostos fenólicos elevados em relação aos flavonoides, é possível sugerir que estes extratos apresentam potencial atividade antioxidante (SOTO *et al.*, 2015), sendo interessante a comprovação desta atividade para aplicação destes extratos como ativo antioxidante em formulações cosméticas.

4.5. Avaliação do potencial antioxidante

Considerando que há compostos fenólicos e flavonoides presentes em todos os extratos avaliados, foi realizada a determinação do potencial antioxidante de cada um dos extratos frente a diferentes radicais, sendo o DDPH[•], o ABTS^{•+} (radicais modelo) e o O₂^{•-} (radical de ocorrência biológica) utilizados para triagem dos extratos e, os demais, para a comprovação da atividade antioxidante do extrato de folhas de *Morus nigra*, com maior potencial antioxidante, frente a diferentes espécies reativas radicalares e não radicalares de ocorrência em sistemas biológicos.

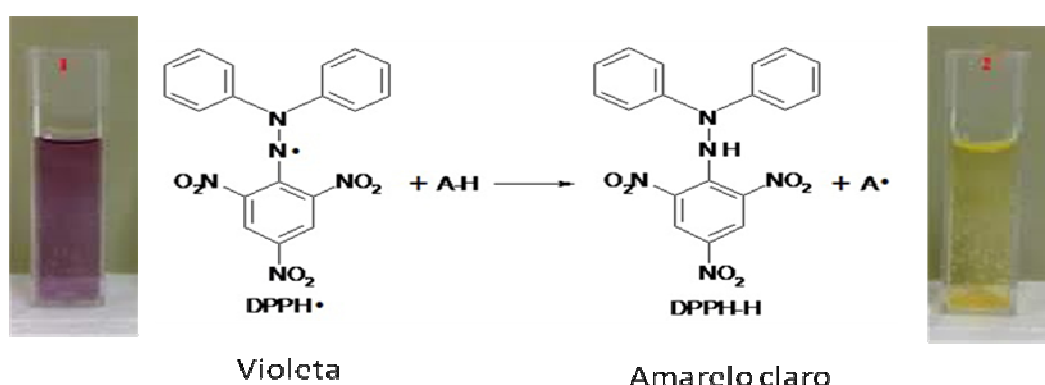
Em cada um dos ensaios foi utilizado como padrão antioxidante, o ácido ascórbico, o ácido gálico e o trolox, a fim de avaliar a eficiência do método, além de poder comparar o resultado obtido com os extratos a substâncias puras de atividade conhecida.

4.5.1. Método de captura do DPPH[•]

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) é um radical livre estável e disponível comercialmente. Quando em sua forma oxidada, este radical apresenta um elétron desemparelhado no átomo de hidrogênio que está conjugado ao anel aromático. Desta forma, apresenta coloração violeta e é absorvido em 515 nm (BORGUINI, 2006; CHEN *et al.*, 2016).

Ao entrar em contato com substâncias com capacidade antioxidante e receber um átomo de hidrogênio, o radical DPPH é reduzido e a conjugação entre o átomo de nitrogênio e o anel aromático é diminuída. Desta forma, a capacidade de absorção em 515 nm também é reduzida, sendo observada, visualmente, pela mudança de coloração da solução, de violeta para amarelo claro (Figura 8) e verificada pela diminuição da absorbância em 515 nm, em espectrofotômetro (PRIOR *et al.*, 2005; BORGUINI, 2006).

Figura 8. Esquema representativo da reação entre o radical DPPH e antioxidantes.



(Fonte: adaptado de Oliveira, 2015 e <http://qnint.sbq.org.br/>)

Desta forma, é possível afirmar que a redução dos valores de absorbância das soluções avaliadas em 515 nm (comprimento de onda de máxima absorção da coloração violeta) está diretamente relacionada ao aumento da capacidade antioxidante das substâncias testadas, pois são capazes de reduzir o radical DPPH ao doarem um hidrogênio ou elétron ao radical (VASCO *et al.*, 2008; PEREZ-GREGORIO *et al.*, 2011).

Além disso, o radical DPPH pode ser utilizado para avaliação do potencial antioxidante de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis, uma vantagem que faz deste radical a primeira escolha em testes de triagem de amostras de composição desconhecida (CHEN *et al.*, 2016), como pode ser o caso de extratos vegetais que não passaram por testes de identificação dos seus componentes.

O ensaio de inibição do radical DPPH foi realizado para os quatro extratos obtidos neste trabalho (E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq}) além dos padrões ácido ascórbico,

ácido gálico e trolox. As Figuras 9 a 15 apresentam o perfil de captura para cada amostra e padrão analisados.

Figura 9. Perfil de captura do radical DPPH pelo ácido ascórbico.

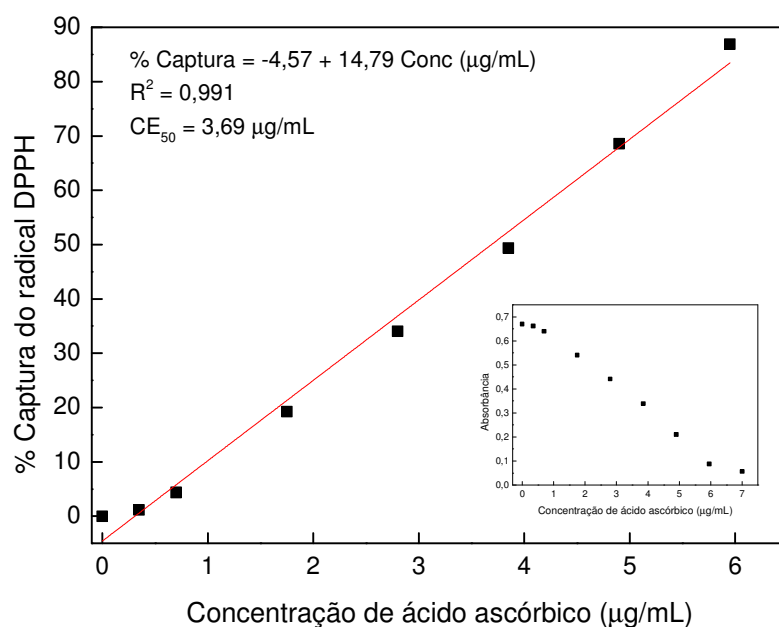


Figura 10. Perfil de captura do radical DPPH pelo ácido gálico.

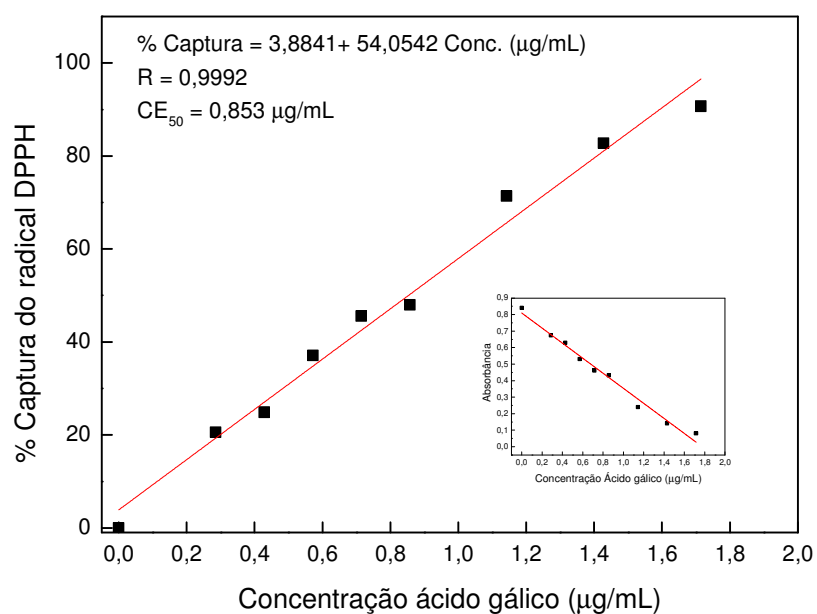


Figura 11. Perfil de captura do radical DPPH pelo trolox.

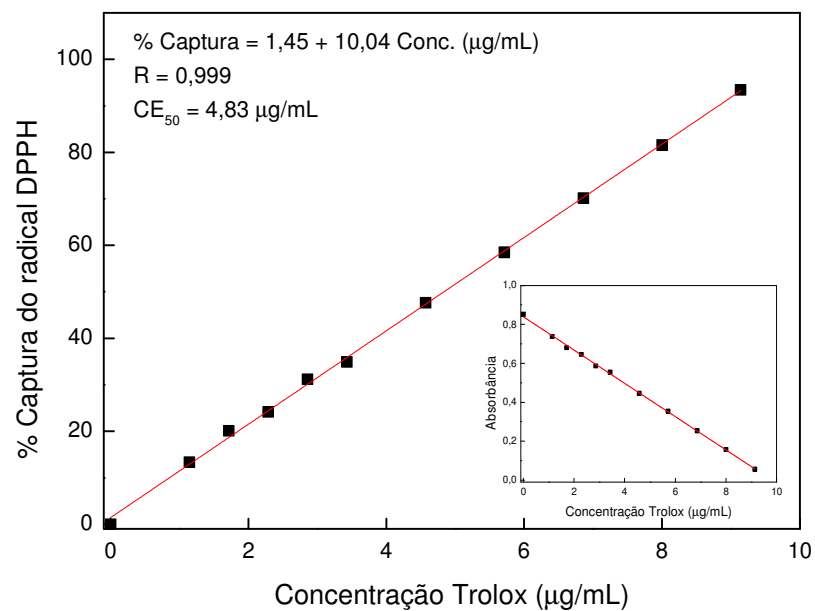


Figura 12. Perfil de captura do radical DPPH pelo E₅₀.

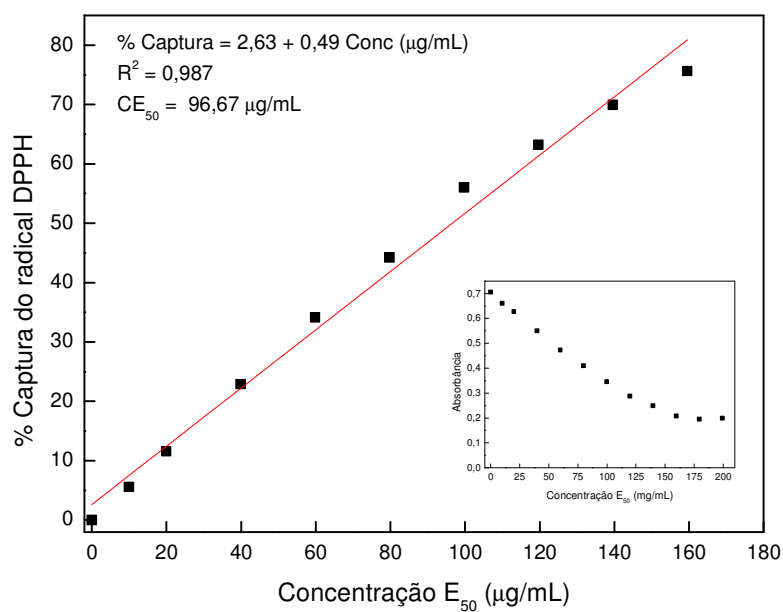


Figura 13. Perfil de captura do radical DPPH pelo E₇₀.

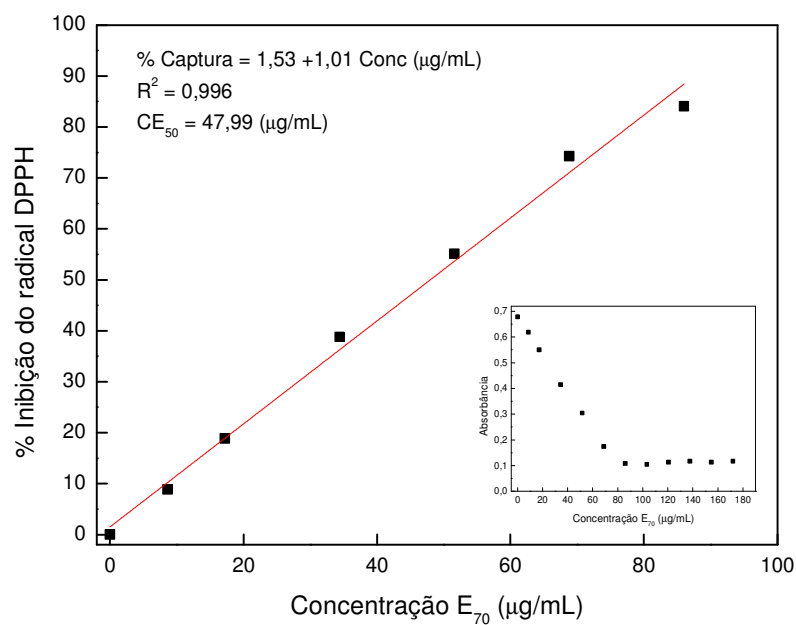


Figura 14. Perfil de captura do radical DPPH pelo E₉₀.

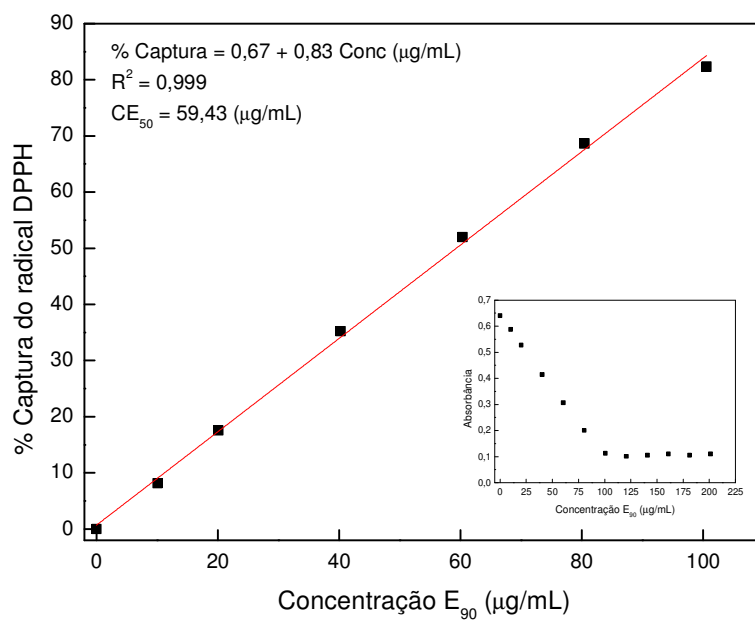
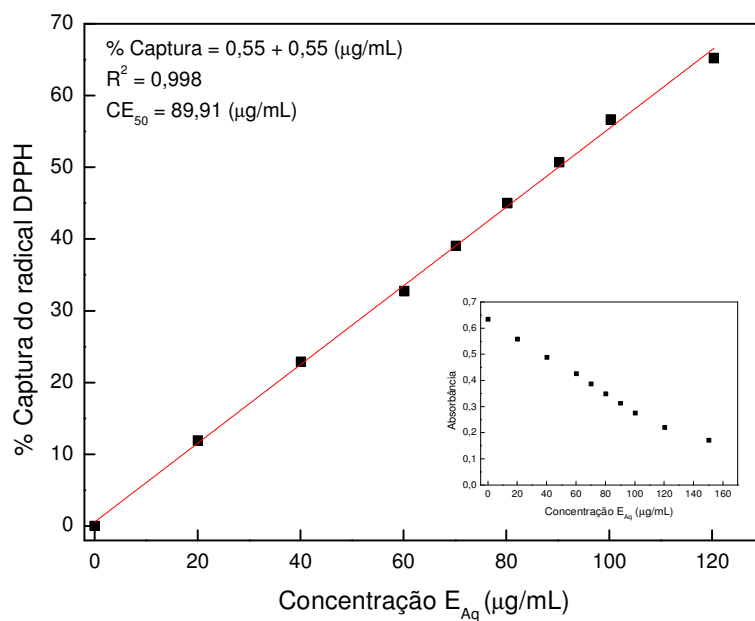
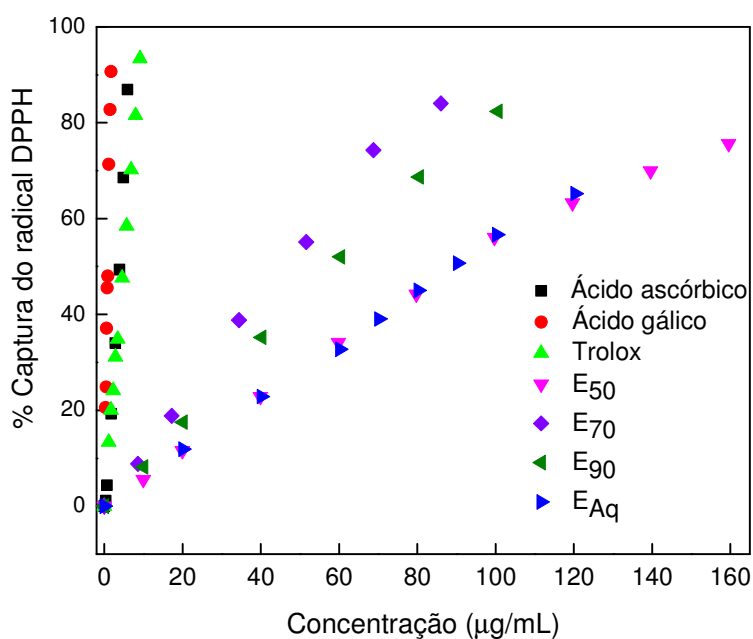


Figura 15. Perfil de captura do radical DPPH pelo E_{Aq}.



Para melhor comparação dos resultados a Figura 16 apresenta a curva de porcentagem de captura versus concentração dos padrões e dos extratos.

Figura 16. Gráfico comparativo dos perfis de captura do radical DPPH pelos padrões e pelo extrato.



Analisando a Figura 16, é possível inferir que quanto maior a inclinação da reta, maior é o potencial antioxidante da substância. Dessa forma, os resultados indicam que o ácido gálico é o padrão mais potente e que, o E₇₀ é o extrato que apresenta maior atividade.

A partir das concentrações de amostras avaliadas, foi possível obter a região de linearidade, onde há proporcionalidade entre o aumento da concentração e porcentagem de captura do radical DPPH. Desta forma, foi realizada a regressão linear, que resultou em uma equação da reta. Com estas equações, foi possível calcular a quantidade de amostra necessária para capturar (neutralizar) 50% dos radicais presentes em solução (CE₅₀). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de CE₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do radical DPPH.

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL) (média)
ácido ascórbico	3,69 ^a
ácido gálico	0,853 ^b
trolox	4,83 ^c
E ₅₀	96,67 ^d
E ₇₀	47,99 ^e
E ₉₀	59,43 ^f
E _{Aq}	89,91 ^d

a, b, c, d, e, f: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Comparando os resultados de CE₅₀ obtidos (Tabela 3), foi possível verificar que, dentre os extratos, o E₇₀ apresentou maior atividade antioxidante; porém, quando comparado aos padrões, foi observado que é necessária uma concentração muito maior de E₇₀ para atingir o mesmo potencial antioxidante, por exemplo, quando comparado ao ácido ascórbico, a concentração de E₇₀ tem que ser aproximadamente 13 vezes maior.

No entanto, apesar da diferença verificada entre as atividades dos padrões e dos extratos, a utilização destes extratos ainda pode ser recomendada, uma vez que sua composição é complexa, podendo ocorrer sinergismos, potencialização ou adição entre seus componentes *in vivo*, aumentando seus efeitos benéficos em relação à utilização de substâncias puras.

O efeito sinérgico é observado quando há uma atividade final superior a soma da atividade de duas ou mais substâncias. Já o efeito aditivo é quando a soma das atividades de duas ou mais substâncias apresenta exatamente cada um dos efeitos envolvidos. A potencialização de efeito é verificada quando a atividade de uma substância é combinada a atividade de outras aumentando o efeito de uma delas (RUPPENTHAL, 2013).

Ao correlacionar os dados de atividade antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH com o teor de compostos fenólicos e flavonóides foi observado que o E₇₀ apresentou maior concentração destes compostos e, também, o maior potencial antioxidante, fato que não pode ser relacionado ao extrato de menor atividade antioxidante, E₅₀, já que o menor teor de compostos fenólicos e flavonoides foi verificado para o E_{Aq}. Este fato pode estar ligado à estrutura química dos componentes do E₅₀ que podem apresentar impedimento estérico e, desta maneira, dificultar a reação com o radical DPPH (ALMEIDA, 2013). Além disso, os constituintes do extrato E₇₀ podem ter maior afinidade pelo radical DPPH do que os constituintes dos outros extratos avaliados.

Contudo, a partir da avaliação da atividade antioxidante, pelo método de inibição do radical DPPH, foi possível verificar qual extrato apresenta maior potencial antioxidante, cumprindo com o objetivo de triagem dos extratos para posterior uso como ativo cosmético antioxidante.

Chiari e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante de extratos hidroetanólico 70% e 90%, etanólico e aquoso de frutas de *Psidium guajava* L. frente ao DPPH[•], obtendo valores de CE₅₀ de 290,56 µg/mL, 689,26 µg/mL, 894,03 µg/mL e 676,99 µg/mL, respectivamente (CHIARI, B G *et al.*, 2012). Todos os extratos de *Psidium guajava* avaliados apresentaram valor de CE₅₀ superiores ao extrato E₇₀ de folhas de *Morus nigra* (47,99 µg/mL).

Vongsak e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antioxidante de extrato hidroetanólico de folhas de *Moringa oleífera* L. frente ao DPPH[•] sendo verificada uma concentração efetiva 50 (CE₅₀) de 62,94 µg/mL. O resultado obtido pelos autores mostra que o extrato desenvolvido é menos potente frente ao DPPH[•] quando comparado ao CE₅₀ do E₇₀ de folhas de *Morus nigra* (47,99 µg/mL) (VONGSAK *et al.*, 2013).

Almeida (2013) avaliou a atividade antioxidante do extrato aquoso de *Ascophyllum nodosum* pelo método de captura do DPPH[•] sendo observado um

CE₅₀ de 51,88 µg/mL (ALMEIDA, 2013). Comparando o resultado de CE₅₀ do extrato aquoso de *A. nodosum* e do E₇₀ de folhas de *Morus nigra* os valores observados são muito próximos e estatisticamente pode não haver diferença; porém, *Morus nigra* é uma espécie de planta que pode ser cultivada em jardins enquanto *A. nodosum* é uma alga marinha marrom e a dificuldade de encontrar para extração é muito maior.

4.5.2. Método de captura do ABTS^{•+}

O ABTS^{•+} foi formado em solução aquosa *in vitro*, a partir do sal de ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), que reage com persulfato de potássio, dando origem ao radical. Este radical é um cromóforo e apresenta picos de absorção em 645 nm, 734 nm e 815 nm, sendo mais comumente utilizado para sua quantificação em 734 nm (PRIOR e CAO, 1999; RE *et al.*, 1999).

Neste ensaio, o ABTS^{•+} em sua forma oxidada apresenta coloração verde e, após a adição de substâncias antioxidantes, se torna incolor em na forma reduzida. Desta maneira, quanto maior o decréscimo de absorbância em 734 nm, maior a atividade antioxidante do composto avaliado.

Assim como no ensaio de captura do DPPH[•], a avaliação da atividade antioxidante por captura do ABTS^{•+} foi realizada para os quatro extratos obtidos neste trabalho (E₅₀, E₇₀, E₉₀ e E_{Aq}), além dos padrões ácido ascórbico, ácido gálico e trolox previamente descritos. As Figuras 17 a 23 apresentam o perfil de captura para cada amostra e padrão analisados.

Figura 17. Perfil de captura do ABTS^{•+} pelo ácido ascórbico.

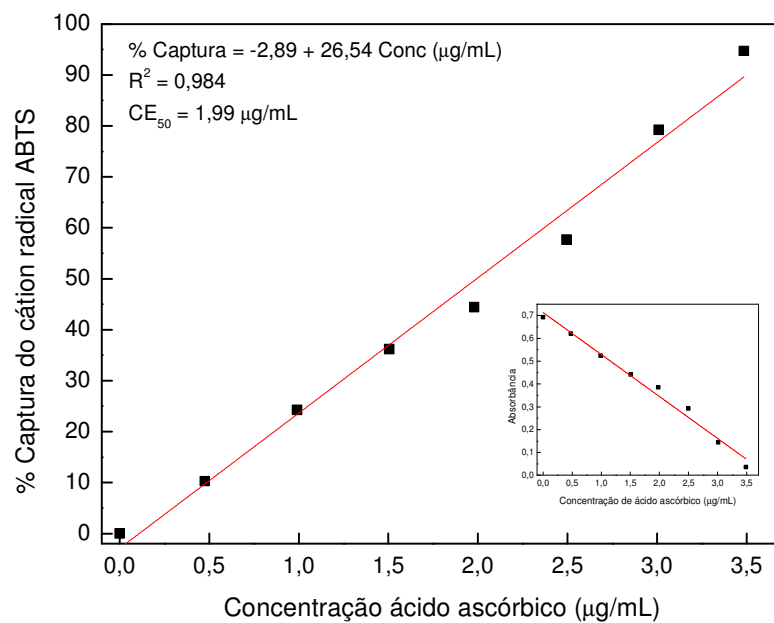


Figura 18. Perfil de captura do ABTS^{•+} pelo ácido gálico.

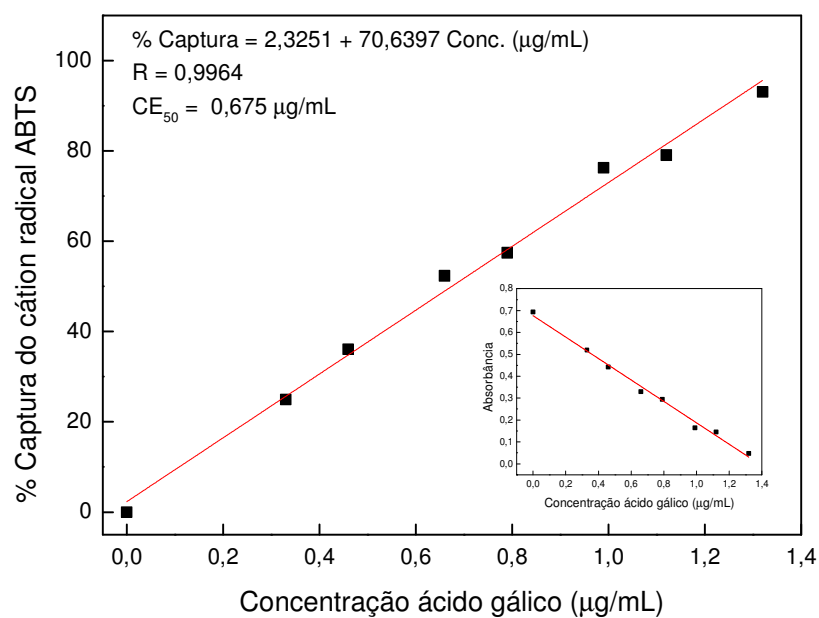


Figura 19. Perfil de captura do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ pelo trolox.

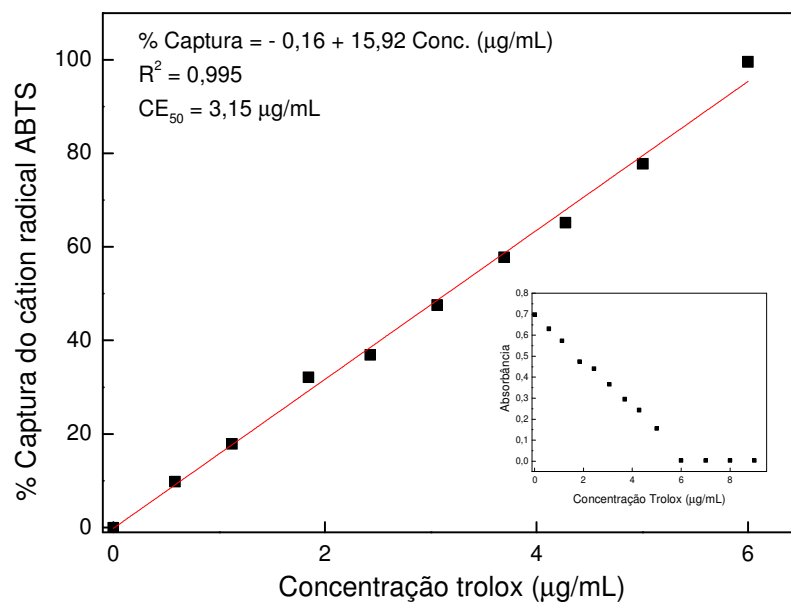


Figura 20. Perfil de captura do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ pelo E_{50} .

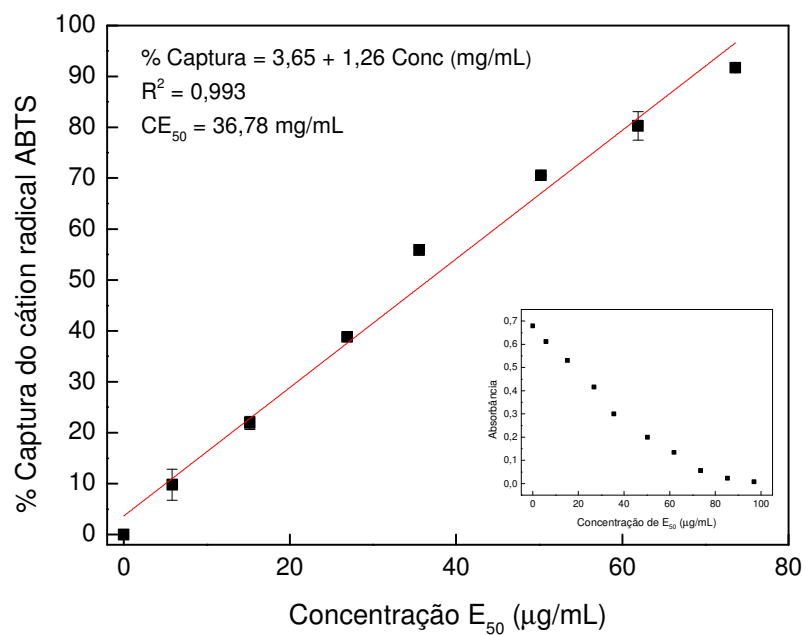


Figura 21. Perfil de captura do ABTS^{•+} pelo E₇₀.

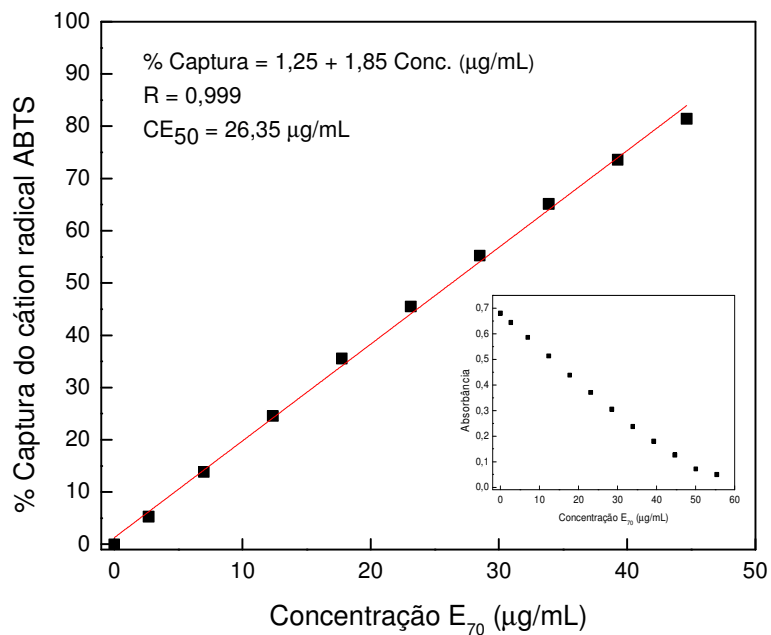


Figura 22. Perfil de captura do ABTS^{•+} pelo E₉₀.

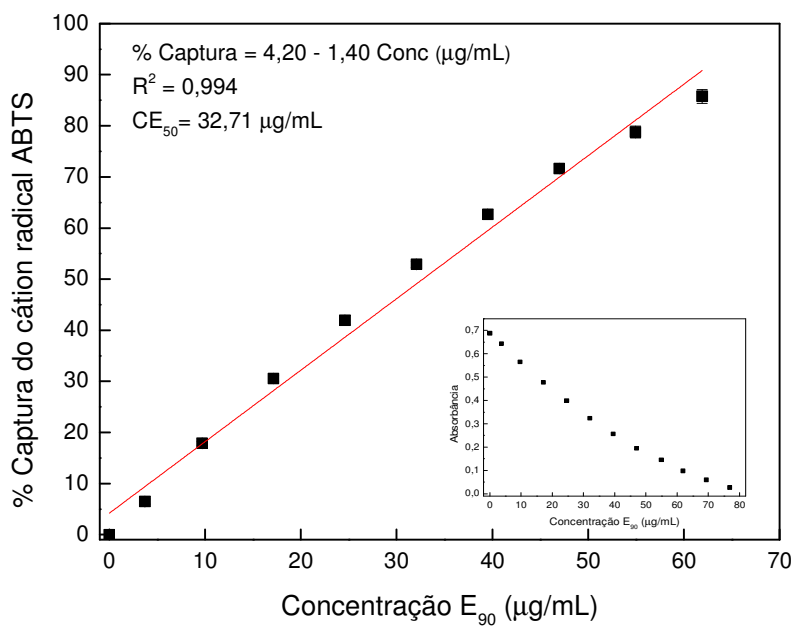
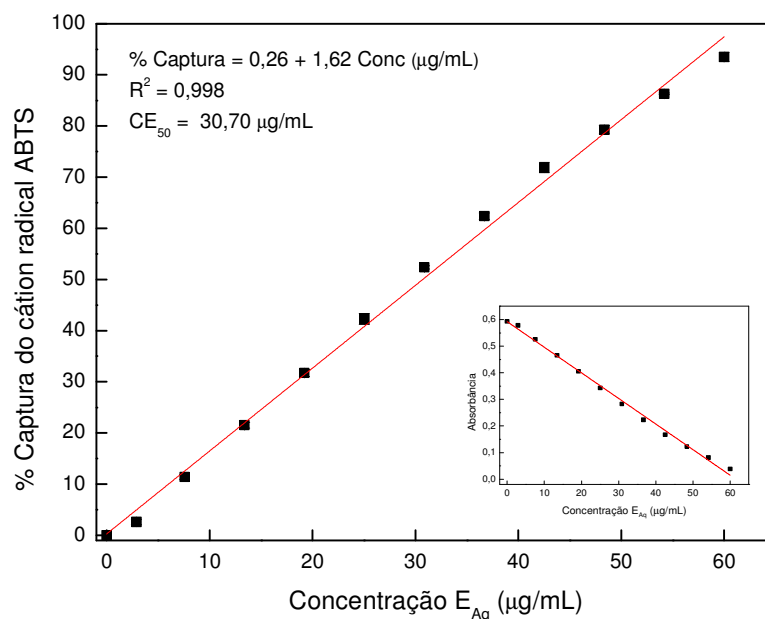


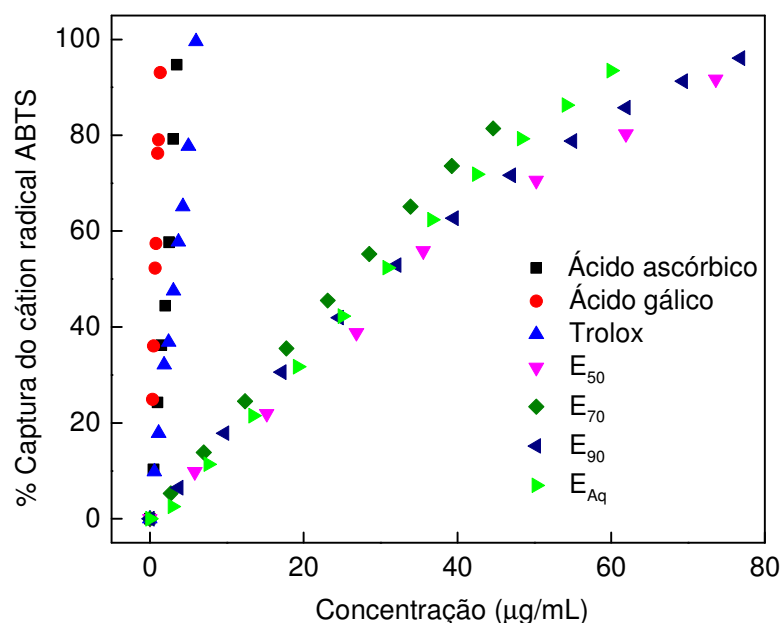
Figura 23. Perfil de captura do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ pelo E_{Aq} .



Com a análise das Figuras 17 a 23, foi possível verificar a faixa linear de concentração, observando o aumento da porcentagem de captura do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, conforme aumentava a concentração de amostra.

A Figura 24 apresenta o perfil de captura do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ pelos padrões e extratos para melhor comparação. Quanto maior a inclinação da reta maior a potencia antioxidante evidenciando que os padrões são mais potentes que os extratos e que, dentre os extratos o E_{70} foi o que apresentou maior atividade.

Figura 24. Gráfico comparativo dos perfis de captura do ABTS^{•+} pelos padrões e pelo extrato.



A partir dos gráficos obtidos, foi realizada a regressão linear, que resultou em uma equação da reta. Com estas equações, foi possível calcular o valor de IC₅₀. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de CE₅₀ para os extratos e padrões pelo método de captura do ABTS^{•+}.

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL) (média)
ácido ascórbico	1,99 ^a
ácido gálico	0,675 ^b
trolox	3,15 ^c
E ₅₀	36,78 ^d
E ₇₀	26,35 ^e
E ₉₀	32,71 ^f
E _{Aq}	30,70 ^g

a, b, c, d, e, f, g: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Analisando os valores de CE₅₀ obtidos, foi possível observar que, novamente, o E₇₀ foi o extrato que apresentou maior potencial antioxidante. Assim como verificado para o ensaio com radical DPPH, o valor de CE₅₀ para o E₇₀ foi superior aos obtidos para os padrões, indicando que é necessária uma

maior concentração de E_{70} , aproximadamente 13 vezes mais, no caso do ácido ascórbico, para que o extrato apresente a mesma potencia antioxidante que o padrão. No entanto, conforme citado anteriormente, o uso de extratos ao invés de substâncias ativas puras pode ser benéfico *in vivo*, uma vez que podem atuar em sinergismo com outras substâncias. Novamente, apesar de não ser o extrato com menor teor de compostos fenólicos e flavonoides, o E_{50} foi o que apresentou menor potencial antioxidante.

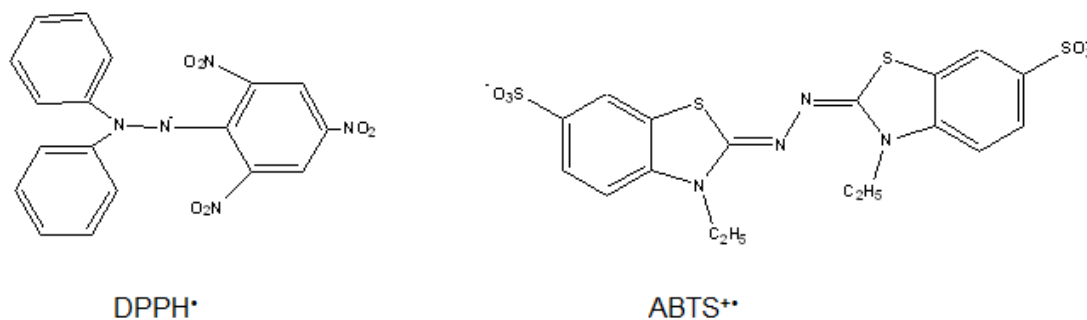
O método de captura do $ABTS^{+•}$ é um método que utiliza um radical modelo, assim como o método de captura do $DPPH^{•}$. Desta forma, ficou evidenciado que, entre os extratos obtidos, o que utiliza etanol 70% como solvente extrator é o que apresenta maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e, também, maior atividade antioxidante.

Chiari (2011) avaliou o potencial antioxidante de extrato hidroetanólico 70% de frutas de *Psidium guajava* L. frente ao $ABTS^{+•}$ sendo obtido CE_{50} de 114,4 $\mu\text{g/mL}$ (CHIARI, 2011). Este valor é aproximadamente 4,3 vezes maior do que o necessário para obtenção da mesma atividade com o E_{70} de folhas de *Morus nigra* (CE_{50} , 26,35 $\mu\text{g/mL}$).

Lordêllo (2015) avaliou o extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Mentha piperita*, *Mentha rotundifolia* e *Mentha vilosa* quanto ao potencial antioxidante frente ao $ABTS^{+•}$, sendo observado CE_{50} de 30 $\mu\text{g/mL}$ para *M. piperita* e 40 $\mu\text{g/mL}$ para *M. rotundifolia* e *M. vilosa* (LORDÊLLO, 2015). Ambos os valores de CE_{50} para os extratos de *Mentha* avaliados são superiores ao obtido para o E_{70} de folhas de *Morus nigra*.

Ambos os métodos (captura do $DPPH^{•}$ e captura do $ABTS^{+•}$) são baseados em reações de oxido-redução, analisadas espectrofotometricamente, sendo a principal diferença entre eles o potencial redox que faz com que a coloração dos radicais seja diferente. Este fato também está ligado à diferença entre as estruturas químicas (Figura 25) (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Figura 25. Estrutura química do DPPH[•] e do ABTS^{•+}.



(Fonte: Almeida, 2013)

Nem sempre os resultados verificados entre os métodos que utilizam diferentes radicais são os mesmos, o que deixa cada vez mais evidente que a estrutura química do radical e da substância antioxidante pode estar diretamente relacionada ao mecanismo de ação antioxidante, devido ao impedimento estérico que, tanto a estrutura do radical quanto a estrutura da substância antioxidante, podem proporcionar facilitando ou dificultando a reação entre eles (PRIOR e CAO, 1999; ARNAO, 2000; OKONOGI *et al.*, 2007; ALMEIDA, 2013). A carga de cada radical também pode estar relacionada com a diferença entre os valores de CE₅₀ para cada um dos ensaios realizados, pois o DPPH[•] é uma estrutura eletricamente neutra, enquanto o ABTS^{•+} apresenta carga positiva podendo facilitar a reação com substâncias que tenham afinidade elétrica pelo radical.

O elétron desemparelhado do ABTS^{•+} está nas extremidades da molécula em conjugação com o anel aromático, sendo possível observar esta conjugação em ambos os lados da molécula, enquanto, no DPPH[•], o elétron não pareado está no átomo de nitrogênio do grupo azo, no centro da molécula, sendo mais difícil para as moléculas com estruturas químicas maiores reagirem com o DPPH[•] do que com o ABTS^{•+}, devido ao impedimento estérico (OKONOGI *et al.*, 2007; ALMEIDA, 2013) e, por isso, é esperado que os valores de CE₅₀ obtidos pelo método de captura do DPPH[•] sejam maiores do que os obtidos pelo método de captura do ABTS^{•+}, conforme observado nos ensaios realizados (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação dos valores de CE_{50} entre o método de captura do DPPH[•] e o método de captura do ABTS^{•+}.

	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) DPPH [•]	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ABTS ^{•+}
ácido ascórbico	3,69	1,99
ácido gálico	0,853	0,675
trolox	4,83	3,15
E₅₀	96,67	36,78
E₇₀	47,99	26,35
E₉₀	59,43	32,71
E_{Aq}	89,91	30,70

A diferença entre os valores de CE_{50} é maior quando se trata dos extratos em relação aos padrões no uso de diferentes radicais. Isto pode ser explicado porque os padrões são substâncias puras e não apresentam estrutura química complexa quando comparados a outros compostos fenólicos e flavonoides, que estão presentes nos extratos.

4.5.3. Método de captura de ânion radical superóxido (atividade como da SOD)

O ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o primeiro radical livre, da sequência das espécies reativas de oxigênio, formado através de processos metabólicos, na membrana interna da mitocôndria, pela aquisição de um elétron e, é a partir dele, que podem ser geradas outras espécies reativas; por exemplo, por promover a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , através da reação de Haber-Weiss, ocasionam a formação do radical hidroxila que é mais reativo em relação ao ânion radical superóxido (BARREIROS *et al.*, 2006; VALDIVIA *et al.*, 2009).

O aumento de espécies reativas de oxigênio pode promover aumento de eventos patogênicos à saúde humana, pois podem ocasionar danos celulares e teciduais. Além disso, os danos causados pelo ânion radical superóxido podem estar associados ao aumento de doenças neurodegenerativas, cânceres e inflamações (VALDIVIA *et al.*, 2009).

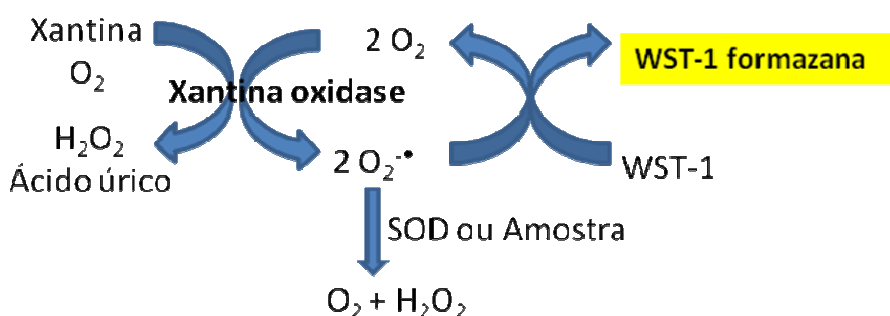
O organismo humano contém uma família de enzimas da qual a superóxido dismutase (SOD) faz parte. A SOD é responsável por catalisar a reação de

conversão do ânion superóxido a H_2O_2 e O_2 , uma vez que a reação de decomposição, que ocorre naturalmente, é de segunda ordem e necessita da colisão entre duas moléculas do radical. Desta forma, sem a presença da SOD é preciso uma maior concentração do $\text{O}_2^{\cdot-}$ para ocorrer a conversão espontânea. A SOD atua mesmo em baixas concentrações, favorecendo a dismutação do radical ânion superóxido (TAINER *et al.*, 1983; BARREIROS *et al.*, 2006).

Este teste tem como princípio verificar se a substância ou extrato avaliado é capaz de apresentar atividade antioxidante semelhante à enzima superóxido dismutase (SOD) que transforma o ânion radical superóxido em O_2 e H_2O_2 que por sua vez é transformado em O_2 e água pela enzima catalase (BARREIROS *et al.*, 2006; HALLIWELL, 2007; FUKAI e USHIO-FUKAI, 2011; BORTOLINI, 2012), impedindo a ação do ânion radical superóxido, no organismo.

Neste ensaio, a xantina oxidase age sobre a xantina, que transforma o oxigênio molecular em $\text{O}_2^{\cdot-}$. O radical formado, em meio aquoso, reage com o sal de tetrazólio (corante WST-1) formando um cromóforo, a formazana, solúvel em água e de cor amarela (Figura 26). Na presença dos extratos E_{50} , E_{70} , E_{90} e E_{Aq} ou dos padrões ácido ascórbico, ácido gálico e trolox, é possível avaliar a capacidade de atuar como a SOD e capturar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, não ocorre a formação da formazana, sendo observado um decréscimo na absorbância.

Figura 26. Representação esquemática da reação onde o antioxidante atua como a SOD.



O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados estão representados nas Figuras 27 a 33.

Figura 27. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido ascórbico (SOD-like activity).

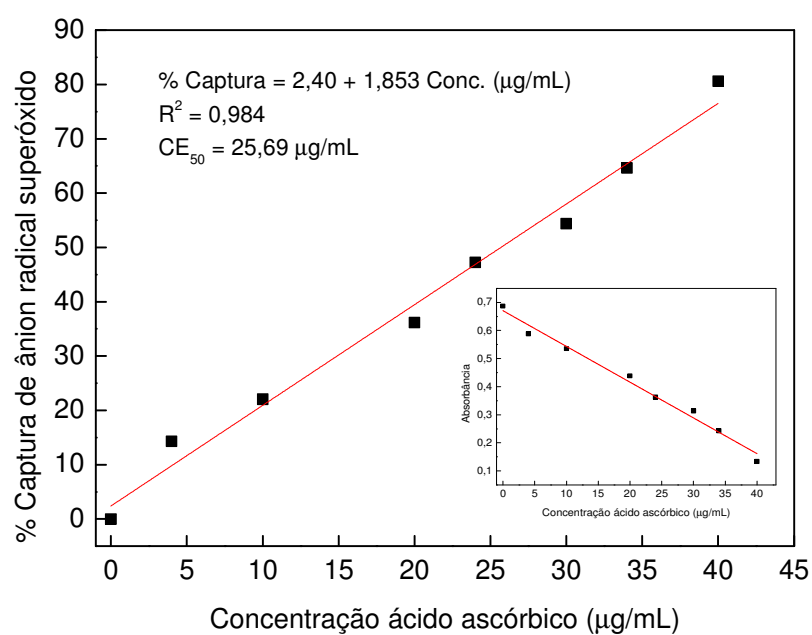


Figura 28. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido gálico (SOD-like activity).

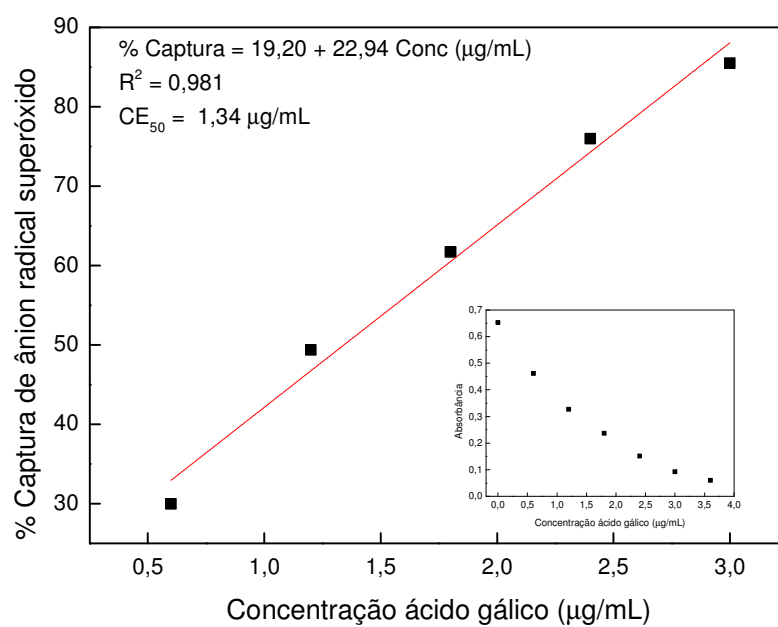


Figura 29. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo trolox (SOD-like activity).

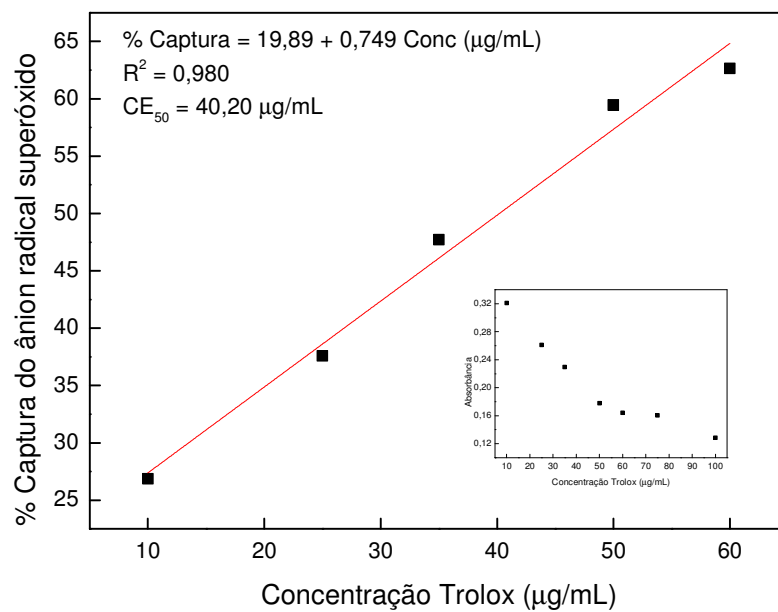


Figura 30. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo E_{50} (SOD-like activity).

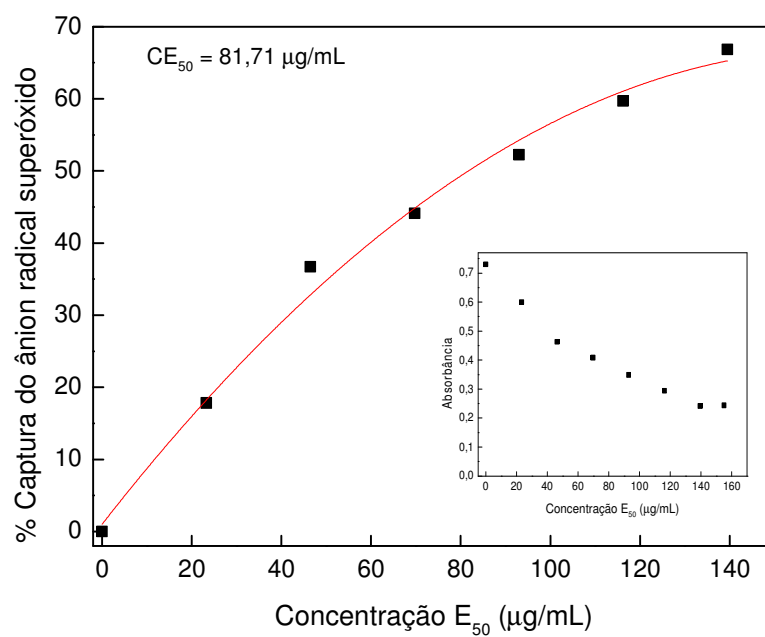


Figura 31. Perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pelo E_{70} (SOD-like activity).

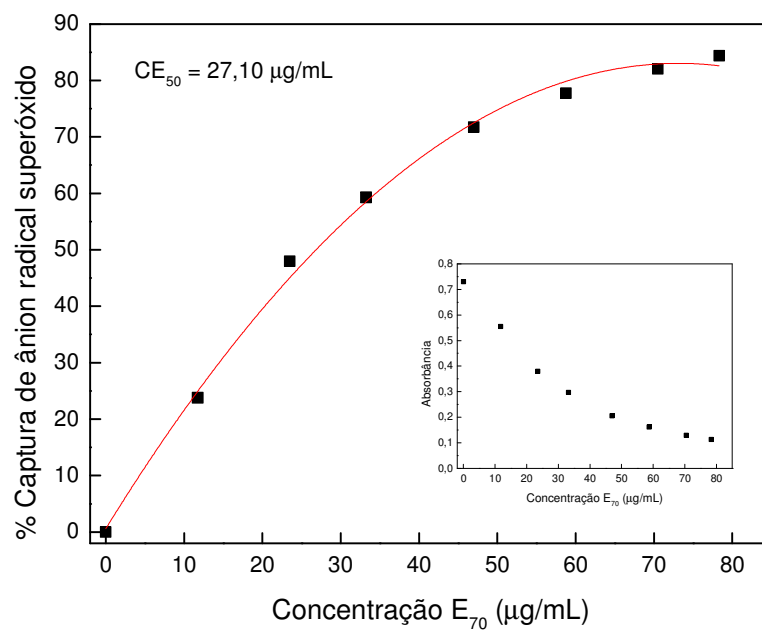


Figura 32. Perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pelo E_{90} (SOD-like activity).

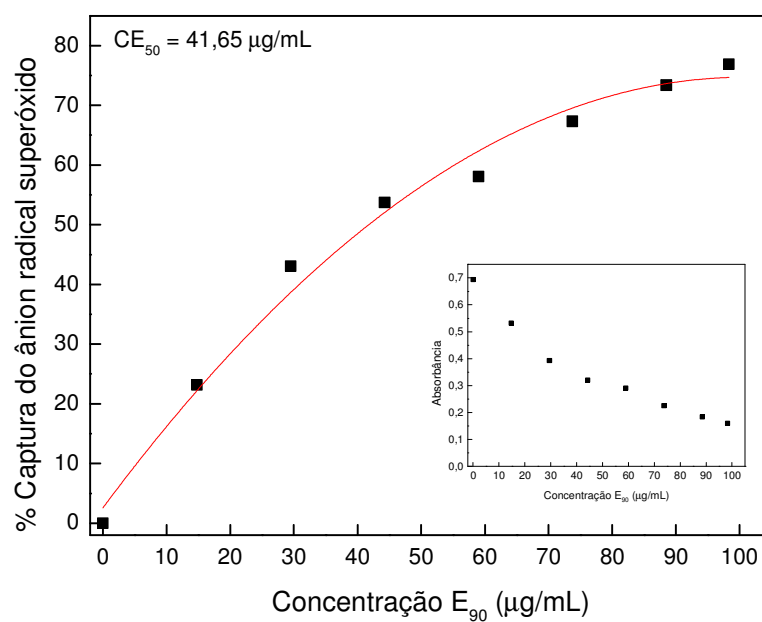
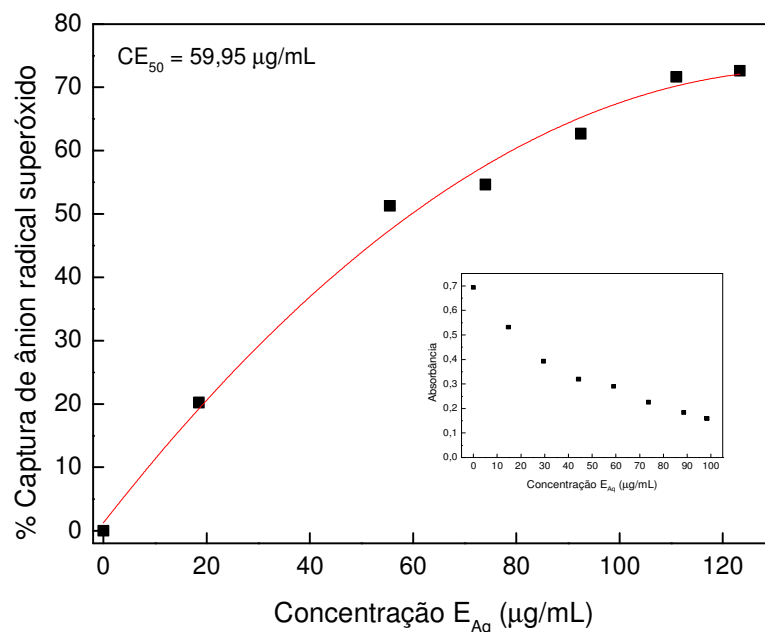


Figura 33. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo E_{Aq} (SOD-like activity).



Com a análise das Figuras 27 a 33, foi possível verificar a proporcionalidade entre a concentração e porcentagem de captura do $O_2^{\cdot-}$ conforme aumentava a concentração dos padrões; no entanto, para os extratos, foi observada uma curva polinomial. A partir destes resultados foi possível calcular o valor de CE₅₀ para cada substância analisada (Tabela 6). A Figura 34 apresenta os perfis de captura do ânion radical superóxido dos padrões e dos extratos para facilitar a comparação dos resultados.

Figura 34. Gráfico comparativo dos perfis captura do $O_2^{\cdot -}$ pelos padrões e extratos (SOD-like activity).

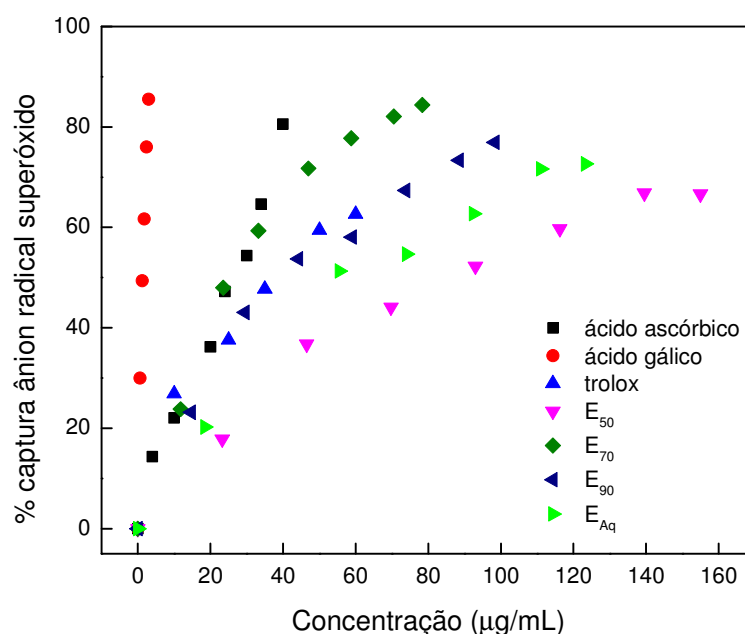


Tabela 6. Valores de CE_{50} para os extratos e padrões pelo método de captura do $O_2^{\cdot -}$ (SOD-like activity).

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média)
ácido ascórbico	25,69 ^a
ácido gálico	1,34 ^b
trolox	40,20 ^c
E_{50}	81,71 ^d
E_{70}	27,10 ^a
E_{90}	41,65 ^c
E_{Aq}	59,95 ^e

a, b, c, d, e: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Analisando a Tabela 6 e a Figura 34, foi possível notar que, frente ao radical ânion superóxido, o extrato que apresentou melhor atividade antioxidante foi o E_{70} , estando de acordo com os resultados anteriores. Além disso, o padrão com maior potencial antioxidante foi o ácido gálico.

O ensaio com o ânion radical superóxido, gerado a partir da reação da enzima xantina oxidase e oxigênio molecular, foi o último ensaio utilizado como triagem para os extratos. Uma vez que os outros testes aplicados na triagem foram realizados com radicais modelo, a opção foi a avaliação com um radical

biológico, afim de melhor a correlação *in vitro x in vivo*, na escolha do extrato com maior potencial antioxidante.

Os resultados obtidos foram bastante interessantes, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre o potencial antioxidante do ácido ascórbico e do E₇₀, fato que sugere uma atividade significativa ao extrato, já que o ácido ascórbico é considerado um potente antioxidante, sendo utilizado inclusive por via oral e tópica como tal.

Também é possível dizer que o E₇₀ é capaz de atuar frente a radicais modelo e frente ao ânion radical superóxido, que é um radical endógeno, sendo vantajoso o uso deste extrato devido a sua composição complexa que pode apresentar outros efeitos benéficos, além da atividade antioxidante. Além disso, o extrato E₇₀ apresentou capacidade antioxidante superior a do trolox, visto que é necessária uma concentração 1,5 vezes maior de Trolox para ter o mesmo potencial antioxidante que o E₇₀.

Chiari (2014) avaliou o potencial antioxidante de extrato hidroetanólico 70% de frutas de *Psidium guajava* frente ao radical ânion superóxido formado pela via da xantina oxidase, sendo o valor de CE₅₀ de 190,4 µg/mL (CHIARI-ANDRÉO, 2014). Comparando com o resultado de CE₅₀ obtido para o E₇₀ de folhar de *Morus nigra* (27,10 µg/mL) o potencial antioxidante frente ao radical ânion superóxido é aproximadamente 7 vezes maior do que do extrato de *Psidium guajava*.

Com os resultados de atividade antioxidante, utilizando os radicais modelo DPPH e ABTS e o radical ânion superóxido, foi possível concluir que dentre os quatro extratos avaliados o E₇₀ foi o que apresentou melhor atividade antioxidante, por isso, a partir deste momento, os demais experimentos foram conduzidos apenas com este extrato.

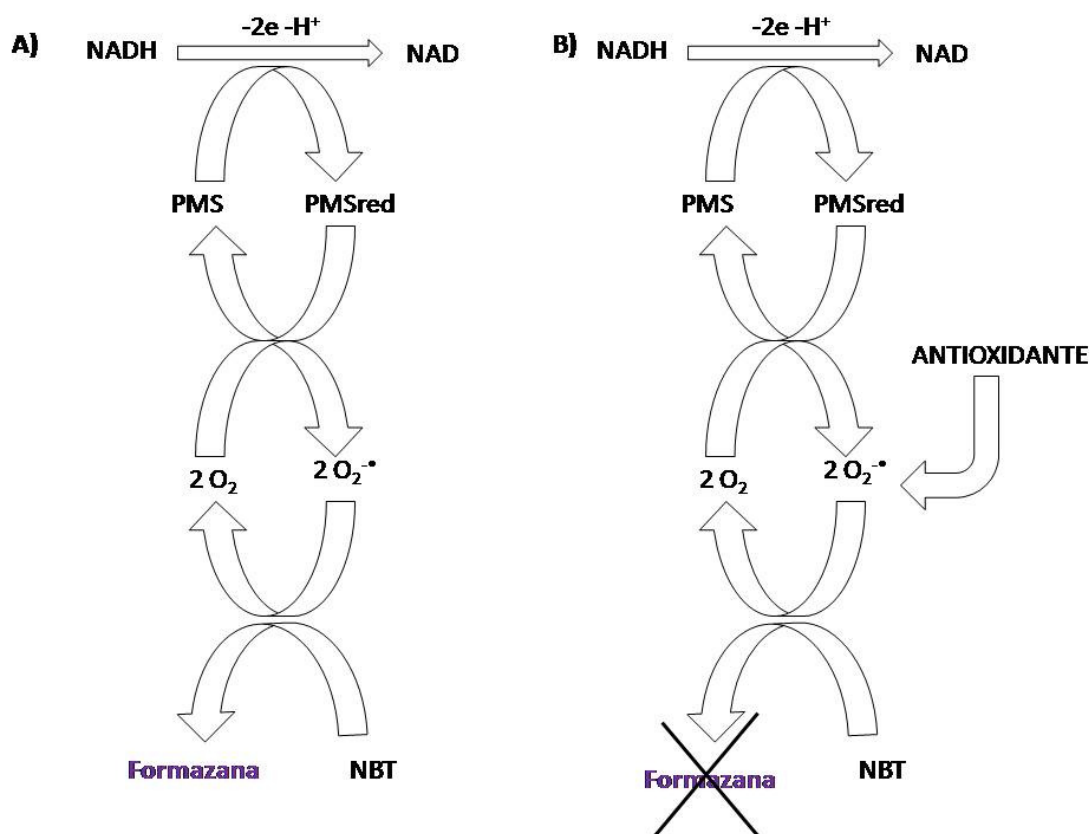
4.5.4. Método de captura do ânion radical superóxido

Além do sequestro de O₂^{•-} que avalia a atividade como a SOD existe outra metodologia que pode ser empregada com a finalidade de verificar sequestro de ânion radical superóxido. Neste caso, é verificada a capacidade da substância em sequestrar o O₂^{•-}, gerado em solução, pela reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

(NADH). Nesta reação, o $O_2^{\bullet -}$ formado reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT) que é, então, reduzido, gerando formazana, cuja intensidade da densidade óptica é proporcional à concentração de radical formado. Quando uma substância antioxidante capaz de sequestrar o $O_2^{\bullet -}$ está presente na mistura reacional, a quantidade de formazana formada é menor ou até mesmo inexistente, pois o $O_2^{\bullet -}$ é sequestrado pela substância, não estando disponível para reação. Desta forma, quanto mais potencial antioxidante tiver a substância avaliada, mais baixa é a intensidade de cor formada (KAKKAR *et al.*, 1984).

A Figura 35 representa a formação do ânion radical superóxido e sua reação com o NBT na ausência e presença de antioxidante.

Figura 35. Representação esquemática da formação do $O_2^{\bullet -}$ *in vitro* e a reação com NBT na ausência (A) e presença de antioxidantes (B).



*PMSred: PMS reduzido

Neste ensaio foi avaliado o potencial de captura do $O_2^{\cdot-}$ para o E_{70} e para os padrões ácido ascórbico, ácido gálico e trolox. As Figuras 36 a 39 apresentam os resultados obtidos.

Figura 36. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo ácido ascórbico.

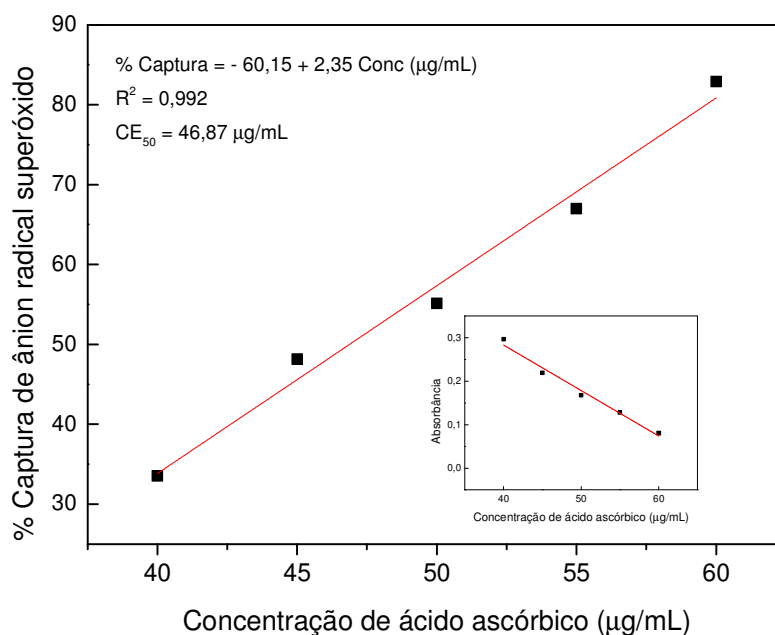


Figura 37. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo ácido gálico.

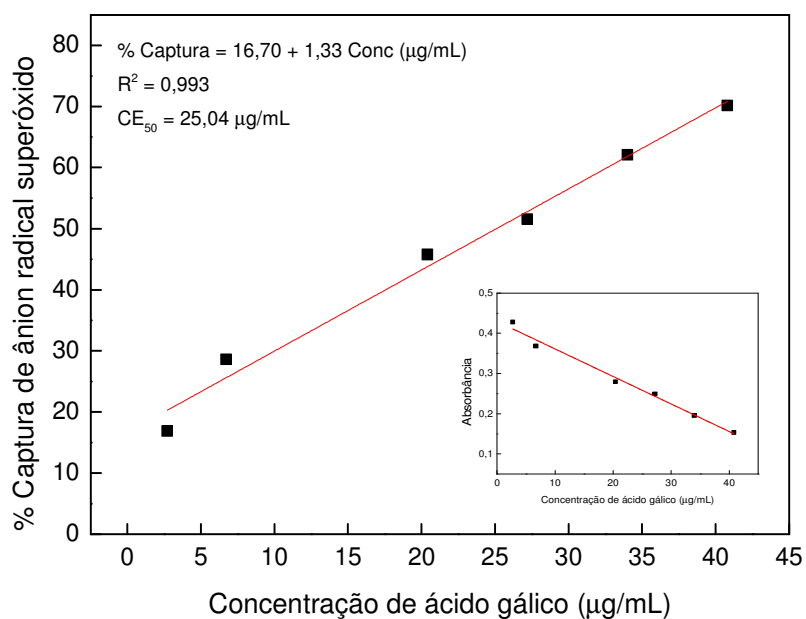


Figura 38. Perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pelo trolox.

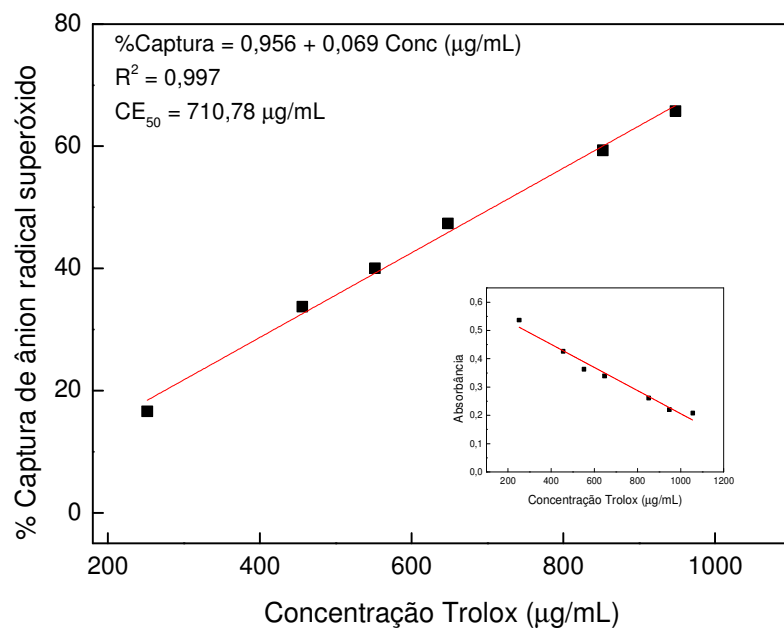
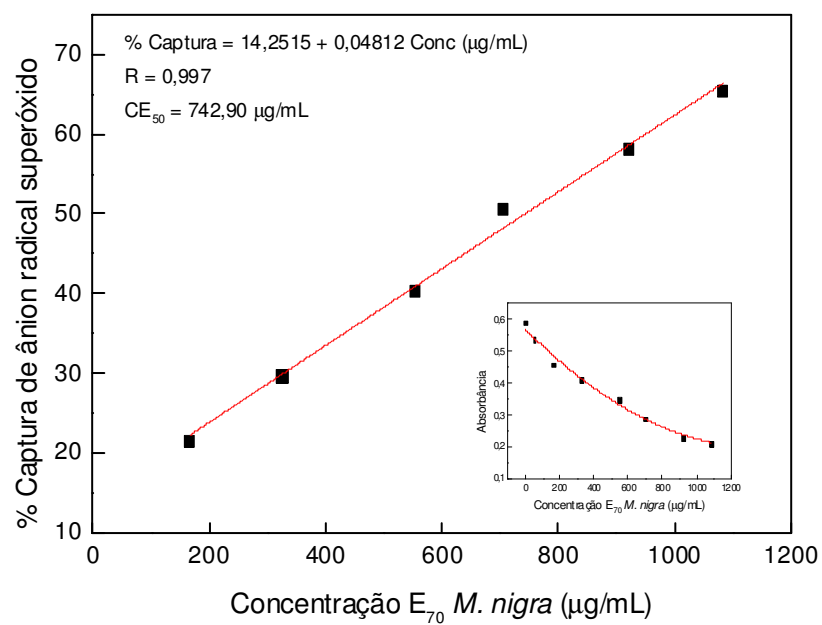


Figura 39. Perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pelo E_{70} .



A partir dos resultados obtidos, Figuras 36 a 39 foi possível realizar a regressão linear e, com a equação que descreve o comportamento dos pontos experimentais, calcular os valores de CE_{50} (Tabela 7).

Figura 40. Gráfico comparativo dos perfis captura do $O_2^{\cdot-}$ pelos padrões e E_{70} .

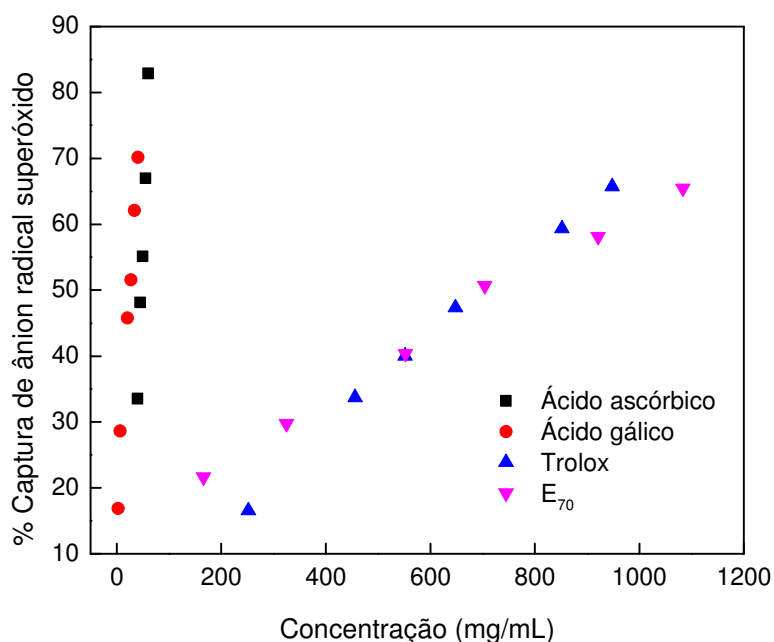


Tabela 7. Valores de CE_{50} para os extratos e padrões pelo método de captura do $O_2^{\cdot-}$.

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média)
ácido ascórbico	46,87 ^a
ácido gálico	25,04 ^b
trolox	700,57 ^c
E_{70}	715,20 ^c

a, b, c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Analisando os dados apresentados na Tabela 7 e Figura 40 foi possível verificar que a quantidade de E_{70} necessária para capturar 50% dos radicais foi aproximadamente, 15 vezes maior que a de ácido ascórbico e 30 vezes maior que a de ácido gálico; no entanto, o potencial antioxidante do E_{70} e do trolox podem ser considerados iguais, estatisticamente. Este fato revela que, apesar de ser necessária uma concentração elevada de E_{70} para capturar o $O_2^{\cdot-}$ esta

concentração é equivalente a um padrão, indicando que o extrato pode ser utilizado para sequestrar este tipo de radical.

Sharma e colaboradores (2011) avaliaram o extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Euphoria neriifolia* Linn. frente ao $O_2^{\cdot-}$ obtido por reação não enzimática, sendo o valor de CE_{50} de 998,80 $\mu\text{g/mL}$ (SHARMA *et al.*, 2011). Comparando com o CE_{50} obtido para o E_{70} de folhas de *Morus nigra* (700,57 $\mu\text{g/mL}$), é possível dizer que a atividade do E_{70} de *Morus nigra* é aproximadamente 1,4 vezes maior do que o extrato das folhas de *E. neriifolia*.

Deuschle e colaboradores avaliaram a atividade antioxidante frente ao extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Calendula officinalis* L. frente ao $O_2^{\cdot-}$ obtido por reação não enzimática. Foram avaliadas concentrações deste extrato até 200 $\mu\text{g/mL}$ e o máximo de captura obtido foi de 7,0% (DEUSCHLE *et al.*, 2015). Para o E_{70} de folhas de *Morus nigra* para a concentração de 170 $\mu\text{g/mL}$ foi observado 21% de inibição, sendo 3 vezes maior que a inibição observada para 200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *Calendula officinalis*.

4.5.5. Ensaio do clareamento da crocina

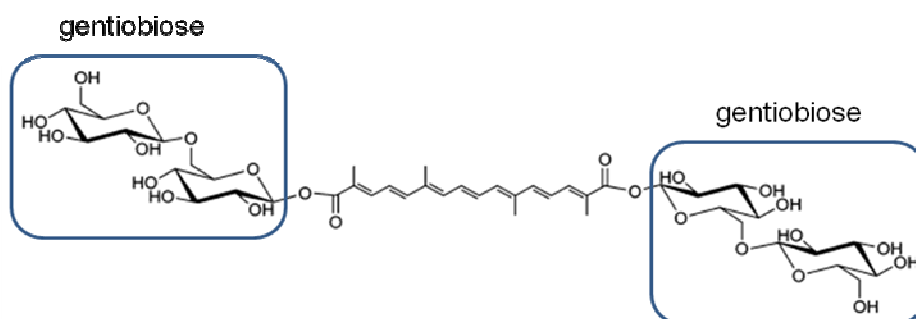
O ensaio do clareamento da crocina é realizado para simular o processo de lipoperoxidação, no qual ocorre a oxidação de cadeias de ácidos graxos polinsaturadas, inclusive dos que compõem a membrana celular e de organelas, devido à ação de radicais livres sobre estas membranas. Este ataque à membrana celular pode promover alterações de funções celulares e, até mesmo, a lise celular. Por isso, é importante a realização deste ensaio no qual a crocina sofre a lipoperoxidação, formando o radical peroxila ($ROO^{\cdot}$) e o potencial antioxidante de substâncias capazes de impedir esta reação é avaliado.

Considerando os fatos expostos, o ensaio do clareamento da crocina é importante para substâncias com possível ação antioxidante, principalmente para uso cosmético, uma vez que são produtos de uso tópico, portanto aplicados diretamente sobre a pele, tendo contato quase que exclusivamente com as células epiteliais como queratinócitos, melanócitos, dentre outras.

Desta maneira, a capacidade antioxidante das substâncias é avaliada pela proteção do clareamento (*bleaching*) da crocina na presença de uma

substância que gera radicais livres *in vitro* que são capazes de atacar a estrutura da crocina (Figura 41).

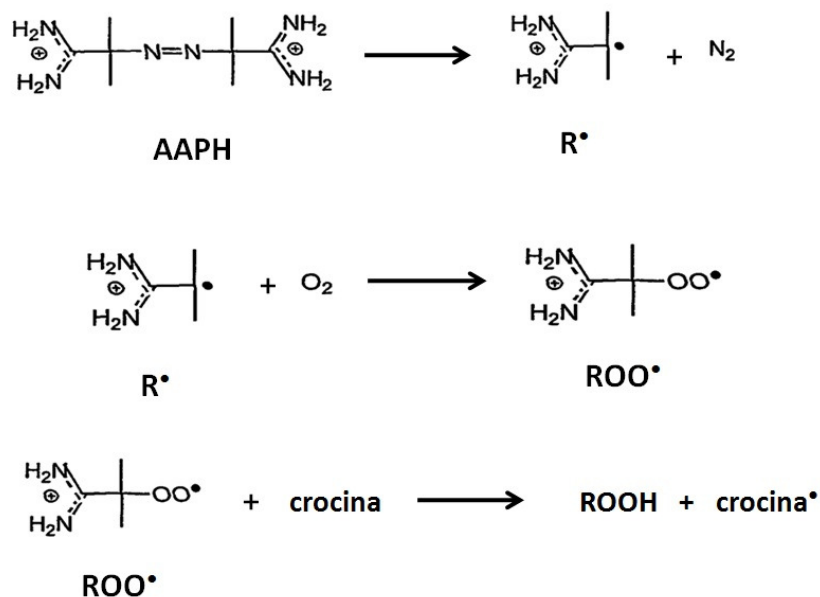
Figura 41. Estrutura química da crocina.



(Fonte: (PAPANDREOU *et al.*, 2006)).

Neste ensaio, a absorvância da crocina foi monitorada em 443 nm, por 10 minutos, em um procedimento de competição cinética. A reação tem início ao adicionar o azocomposto dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH) que, a $40 \pm 2^\circ \text{C}$, com velocidade constante e em meio aerado, sofre termólise, ocasionando a formação de um radical livre, que reage com o oxigênio do meio e gera o radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), sendo capaz de atacar a estrutura da crocina, ao retirar um átomo de hidrogênio, levando ao rompimento do sistema de duplas ligações conjugadas e, conseqüentemente, à diminuição da absorção em 443 nm (Figura 42) (TUBARO *et al.*, 1998).

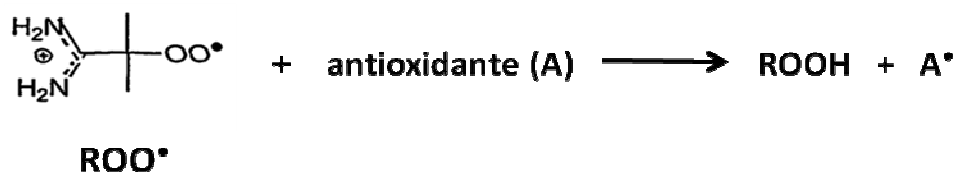
Figura 42. Representação esquemática da reação de formação de radical peroxila e ataque à estrutura da crocina.



Fonte: Adaptado de Assis et al., 2015.

Ao serem adicionadas substâncias antioxidantes, o decréscimo da absorção da crocina é mais lento, uma vez que os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais $\text{ROO}^\bullet$ e, desta forma, ocorre a inibição da oxidação da crocina, devido à captura das espécies radiculares, pelos antioxidantes (Figura 43).

Figura 43. Esquema representativo da reação do radical peroxila com a substância antioxidante.



Por se tratar de um ensaio cinético, o clareamento da crocina ocasionado pela reação com o radical $\text{ROO}^\bullet$ (V_0) diminui na presença de substâncias antioxidantes, uma vez que o antioxidante compete com a crocina pelo radical $\text{ROO}^\bullet$ e gera uma nova velocidade de *bleaching* (V) (Equação 6):

$$V = V_0 \times \frac{k_c [\text{crocina}]}{k_c [\text{crocina}] + k_a [\text{antioxidante}]} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: $V_0 = k_1 [\text{ROO}^\bullet] [\text{crocina}]$; $k_c = k_1 [\text{ROO}^\bullet]$; $k_a = k_2 [\text{ROO}^\bullet]$; k_1 = constante de velocidade da reação entre crocina e $\text{ROO}^\bullet$; k_2 = constante de velocidade da reação entre antioxidante e $\text{ROO}^\bullet$.

Quando há um antioxidante no meio, a velocidade de *bleaching* da crocina diminui e um novo valor de V é obtido, sendo avaliado conforme a Equação 7.

$$\frac{V_0}{V} = \frac{k_c [\text{crocina}] + k_a [\text{antioxidante}]}{k_c [\text{crocina}]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[\text{antioxidante}]}{[\text{crocina}]} \quad (\text{Equação 7})$$

A relação k_a/k_c indica a capacidade de interação relativa do antioxidante com o $\text{ROO}^\bullet$ e é calculada a partir da inclinação da regressão linear do gráfico de V_0/V versus $[\text{antioxidante}]/[\text{crocina}]$

Neste ensaio, foi avaliada a velocidade de clareamento da crocina sem adição de antioxidantes e, posteriormente, com adição de padrões antioxidantes, ácido ascórbico, ácido gálico e trolox e, da amostra, extrato E_{70} , em diferentes concentrações. O resultado está representado nas Figuras 44 a 47, onde V_0 representa a velocidade na ausência de ácido ascórbico, V representa a velocidade na presença da amostra e $[\text{crocina}]$ representa a concentração de crocina utilizada, que foi constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$). As concentrações de ácido ascórbico, ácido gálico, trolox e E_{70} foram variadas de acordo com as concentrações descritas na figura *inset* em $\mu\text{g/mL}$.

Figura 44. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com ácido ascórbico. O gráfico *inset* apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) do ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

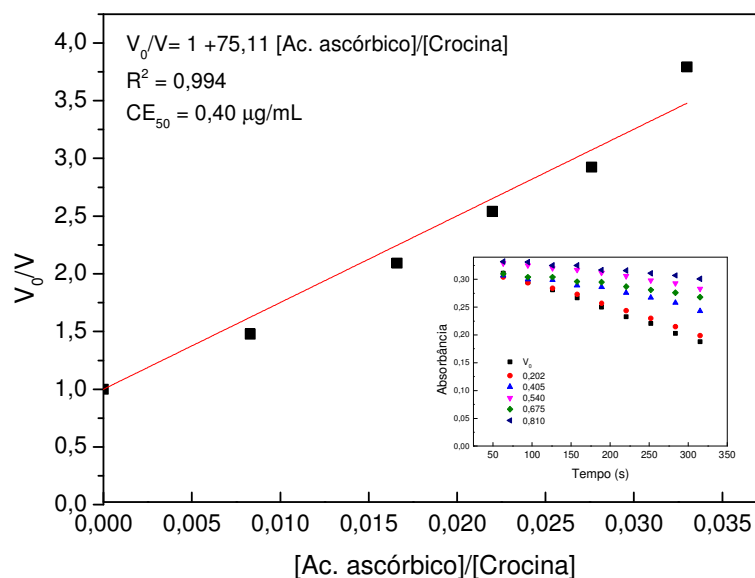


Figura 45. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com ácido gálico. O gráfico *inset* apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) do ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

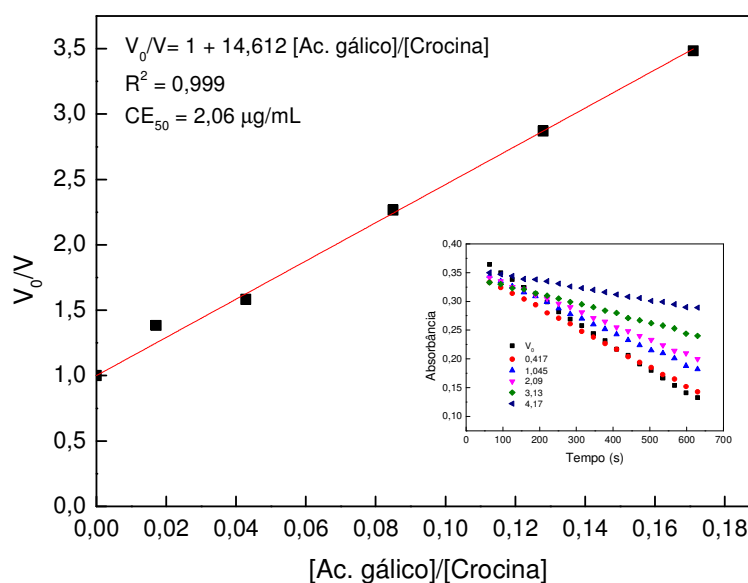


Figura 46. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com trolox. O gráfico *inset* apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) do trolox ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

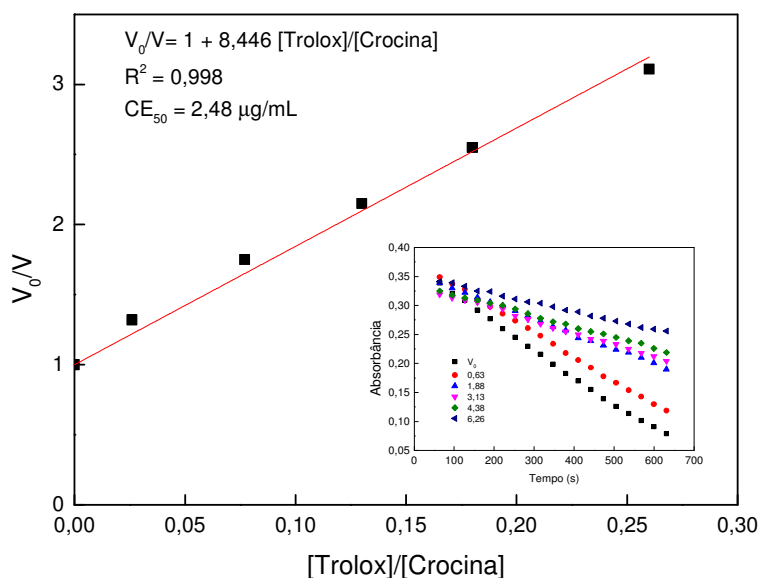
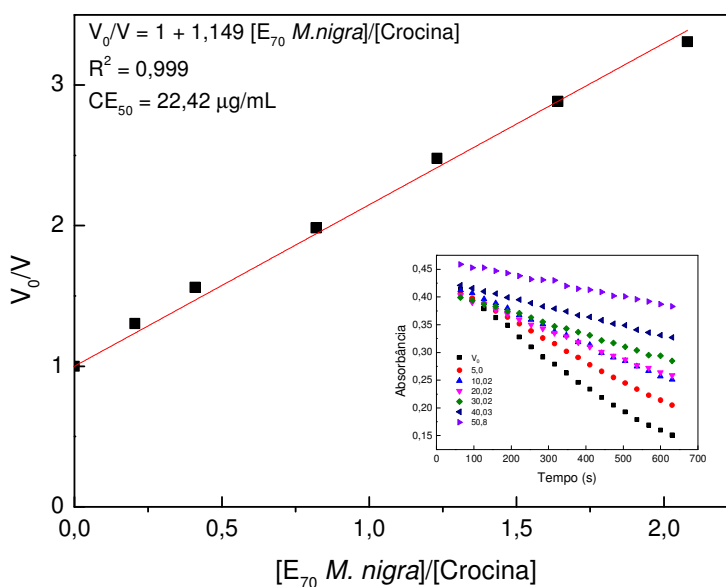


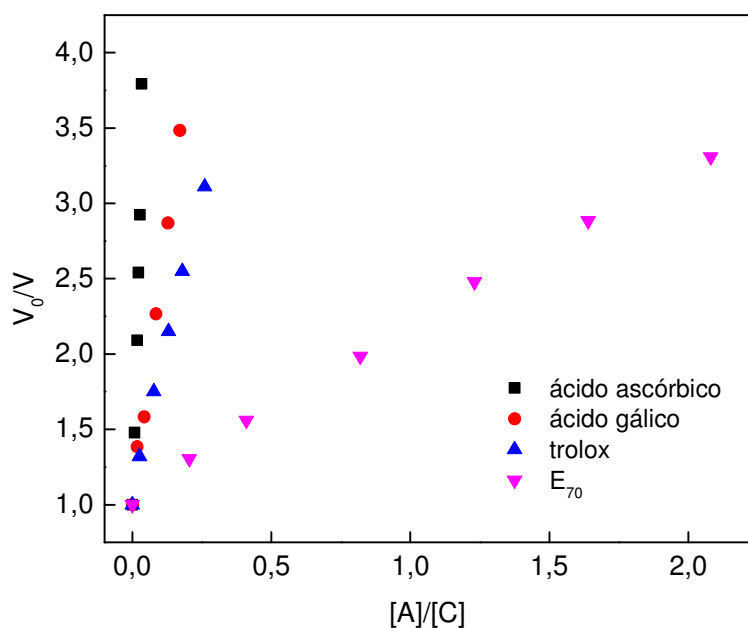
Figura 47. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina com E_{70} . O gráfico *inset* apresenta os valores de absorbância da crocina em 443 nm na ausência (V_0) e na presença (V) de E_{70} ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.



A partir dos gráficos de V_0/V versus $[\text{Antioxidante}]/[\text{Crocina}]$ (Figuras 44 a 47) foi possível realizar a regressão linear e, de acordo com o coeficiente angular observado, determinar a eficiência antioxidante das substâncias analisadas, sendo que, quanto maior o coeficiente angular, maior a atividade antioxidante da substância (Tabela 8) (ASSIS *et al.*, 2015).

A Figura 48 apresenta o gráfico V_0/V versus $[A]/[C]$, onde $[A]$ é a concentração dos padrões ou do E_{70} e $[C]$ é a concentração de crocina. Analisando a Figuras 48 é possível observar que o E_{70} apresenta menor inclinação em relação aos padrões indicando que o extrato apresenta menor atividade antioxidante que os padrões.

Figura 48. Gráfico representativo entre as razões das velocidades e das concentrações no ensaio de clareamento da crocina para os padrões e E_{70} .



Além disso, para cada concentração dos padrões e do extrato avaliadas, foi calculada a porcentagem de inibição do radical peroxila, sendo obtida uma curva e, a partir da equação gerada pela regressão linear, foi calculado o valor de CE_{50} (extrato e padrões) (Tabela 8). Dessa forma, o CE_{50} representa a capacidade da substância antioxidante em reagir com os radicais peroxila.

Tabela 8. Equação da reta e valores de CE_{50} para os extratos e padrões pelo método de clareamento da crocina.

Amostras	Equação da reta	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média)
ácido ascórbico	$V_0/V = 1 + 75,11 [AA]/[CR]$	0,40 ^a
ácido gálico	$V_0/V = 1 + 14,612 [AG]/[CR]$	2,06 ^b
trolox	$V_0/V = 1 + 8,446 [TR]/[CR]$	2,48 ^b
E_{70}	$V_0/V = 1 + 1,149 [E_{70}]/[CR]$	22,42 ^c

AA: ácido ascórbico; AG: ácido gálico; TR: Trolox; E_{70} : extrato E_{70} ; CR: crocina. a, b, c, d, e, f, g: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 8, foi verificado que o E_{70} , apesar de apresentar um valor elevado de CE_{50} , em relação aos padrões, é capaz de interagir com o radical peroxila, indisponibilizando-o para atacar a estrutura da crocina. Desta forma, é possível afirmar que o E_{70} tem a capacidade de evitar ou diminuir a lipoperoxidação das membranas celulares, sendo importante o seu uso, para minimizar os efeitos ocasionados devido a este processo. Portanto, este extrato pode ser considerado um ativo cosmético protetor de ataque à membrana celular.

Pelos valores de CE_{50} foi verificado que o ácido ascórbico apresenta maior potencial antioxidante neste ensaio, sendo, portanto, o que apresenta maior interação com o radical $ROO^{\bullet}$, possuindo atividade aproximadamente 56 vezes mais potente que o E_{70} , enquanto que o ácido gálico e o trolox apresentam atividade antioxidante frente ao radical $ROO^{\bullet}$ aproximadamente 10 vezes maior que o E_{70} . Também é possível classificar a ação antioxidante do E_{70} em relação aos padrões e, quanto mais próximos de 1,00, maior é o grau de equivalência (Tabela 9) (ASSIS *et al.*, 2015).

Tabela 9. Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO[•] do E₇₀ em equivalentes aos padrões.

Padrões ou Amostra	Equivalentes ao ácido ascórbico*	Equivalentes ao ácido gálico*	Equivalentes ao Trolox*
ácido ascórbico	1,00		
ácido gálico		1,00	
trolox			1,00
extrato E ₇₀	0,015	0,078	0,130

*A equivalência foi obtida pelo quociente entre o coeficiente angular (Tabela 8) (k_a/k_c) (E₇₀/padrão).

Analisando a Tabela 9, foi possível confirmar que o ácido ascórbico apresenta maior potencial antioxidante entre os padrões estudados e que o seu grau de equivalência com o E₇₀ é o menor de todos. No entanto, a concentração de E₇₀ necessária para reagir com 50% dos radicais peroxila não é uma concentração elevada comparando com os valores obtidos com os demais radicais avaliados neste trabalho. Portanto, o E₇₀ pode ser utilizado para neutralização deste tipo de radical.

Prieto e Vázquez (2014) avaliaram três extratos de sementes de *Coffea arabica*, sendo aquoso, hexânico e metanólico frente a capacidade de proteção da crocina perante ao descoramento devido a ação dos radicais peroxila. Os autores observaram que os extratos, aquoso e metanólico, apresentaram CE₅₀ de 100 µg/mL, enquanto o extrato hexânico não mostrou atividade devido ao seu caráter hidrofílico (PRIETO e VÁZQUEZ, 2014). Este resultado representa que o E₇₀ de folhas de *Morus nigra* (CE₅₀ 22,42 µg/mL) tem a capacidade 4,5 vezes maior em reagir com os radicais peroxila e proteger a crocina do seu ataque.

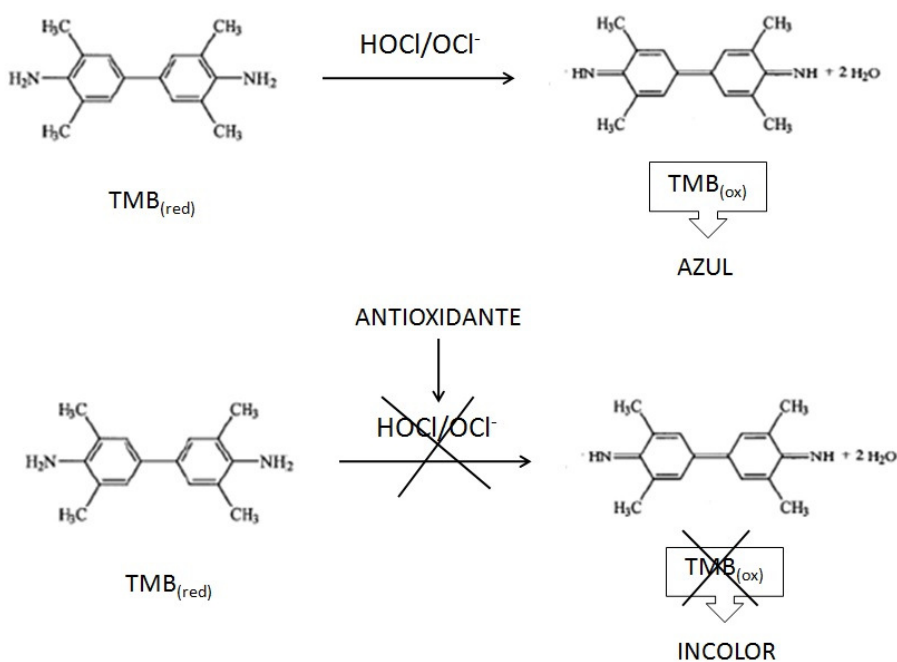
4.5.6. Capacidade de captura do HOCl/OCI⁻

O ácido hipocloroso (HOCl) não apresenta uma via de degradação catalítica diferentemente do radical ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, que são degradados por via catalítica através da SOD e da catalase, respectivamente. Desta forma, a presença do HOCl no organismo pode ser prejudicial, uma vez que, além de atacar o tecido bacteriano atuando

como bactericida, pode atacar, também, o tecido de mamíferos (EATON, 1991; LAPENNA e CUCCURULLO, 1996). Apesar de ser uma espécie reativa não radicalar, é um potente oxidante. Apresenta forte atividade antimicrobiana e, devido a sua reatividade elevada e a sua propensão a permear membranas, pode oxidar uma grande variedade de biomoléculas, ocasionando danos celulares (CHING *et al.*, 1994; WHITEMAN *et al.*, 2005; BARREIROS *et al.*, 2006).

Neste ensaio, foi utilizado o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que é oxidado pelo HOCl gerando um cromóforo azul, com máximo de absorção em 652 nm. Na presença de substâncias antioxidantes, capazes de interagir com o HOCl, o cromóforo não é formado. Este método é bastante sensível para determinar a capacidade de captura do HOCl/OCl⁻ pela amostra (Figura 49) (CHING *et al.*, 1994; ASSIS *et al.*, 2015).

Figura 49. Representação esquemática da reação de oxidação do TMB e da captura de HOCl/OCl⁻ por um antioxidante.



Considerando as informações apresentadas, é importante em produtos cosméticos com ação antioxidante a presença de substâncias capazes de neutralizar o HOCl e seu ânion (OCl⁻). Por este motivo, foi realizada a determinação do potencial antioxidante do E₇₀ e dos padrões, ácido ascórbico, ácido gálico e trolox frente ao HOCl/OCl⁻ (Figuras 50 a 53).

Figura 50. Perfil de captura do HOCl/OCl⁻ pelo ácido ascórbico.

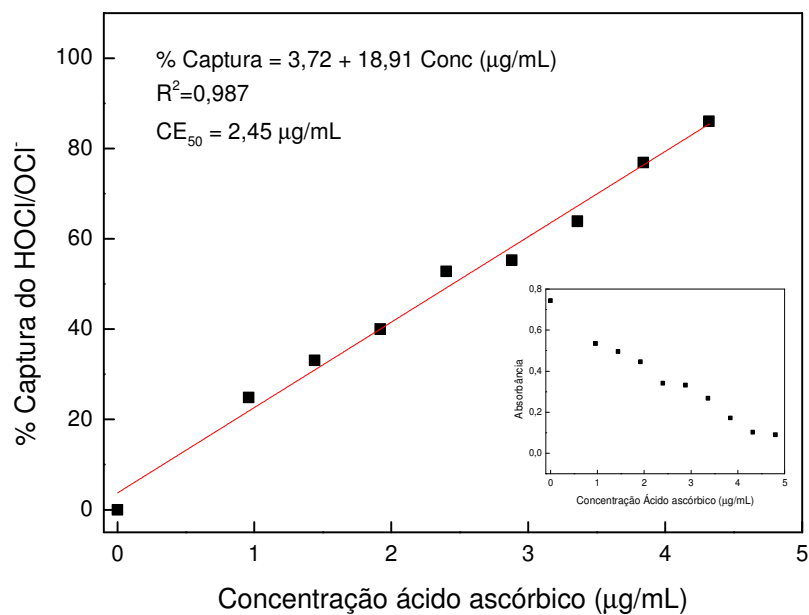


Figura 51. Perfil de captura do HOCl/OCl⁻ pelo ácido gálico.

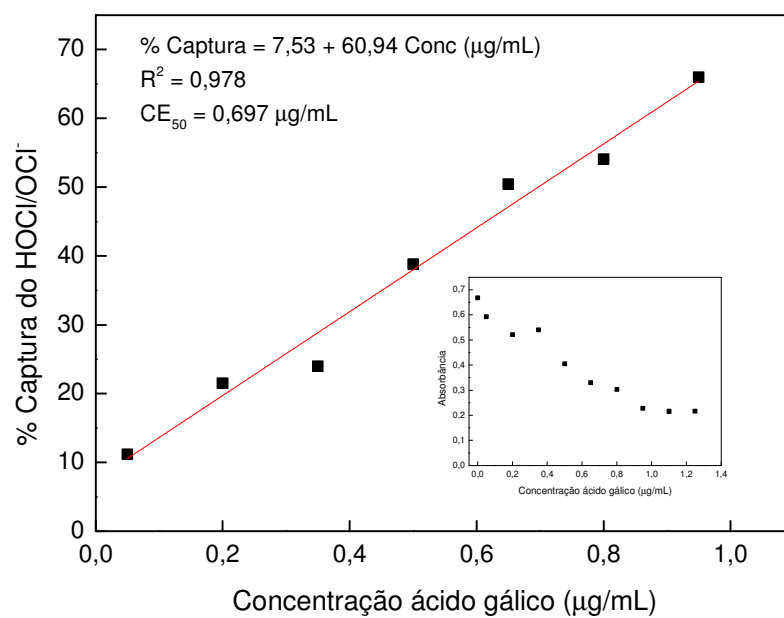


Figura 52. Perfil de inibição do radical HOCl/OCl⁻ pelo trolox.

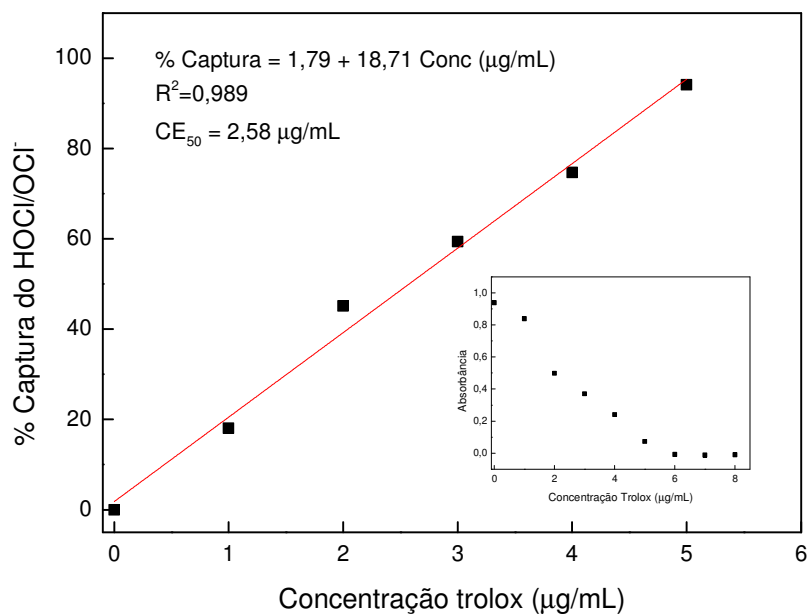
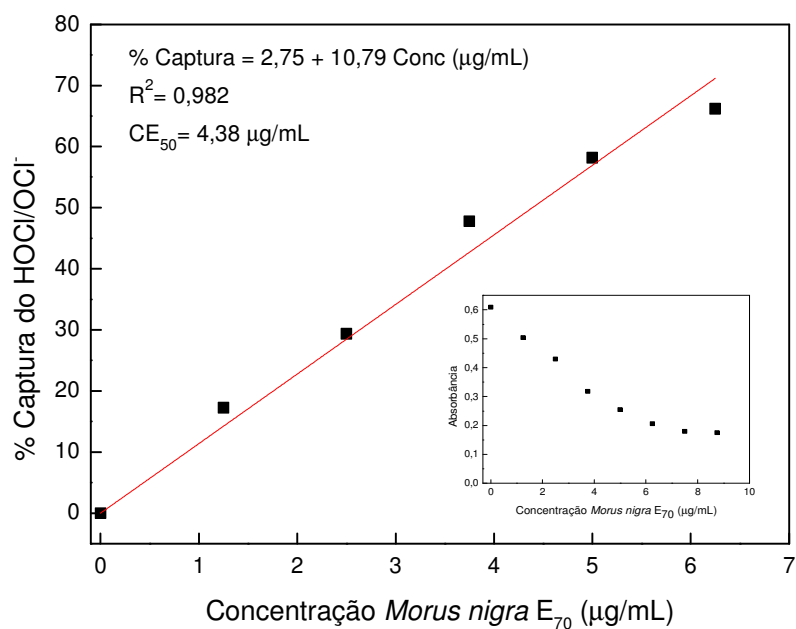


Figura 53. Perfil de captura do HOCl/OCl⁻ pelo E₇₀.



A partir das concentrações avaliadas para construção dos gráficos apresentados nas Figuras 50 a 53 foi possível a realização da regressão linear

e, com as equações das retas obtidas, calcular os valores de CE_{50} para os padrões e E_{70} (Tabela 10). A Figura 54 apresenta um gráfico comparativo entre os padrões e amostra quanto a capacidade de captura do $HOCl/OCl^-$.

Figura 54. Gráfico comparativo dos perfis captura do $HOCl/OCl^-$ pelos padrões e E_{70} .

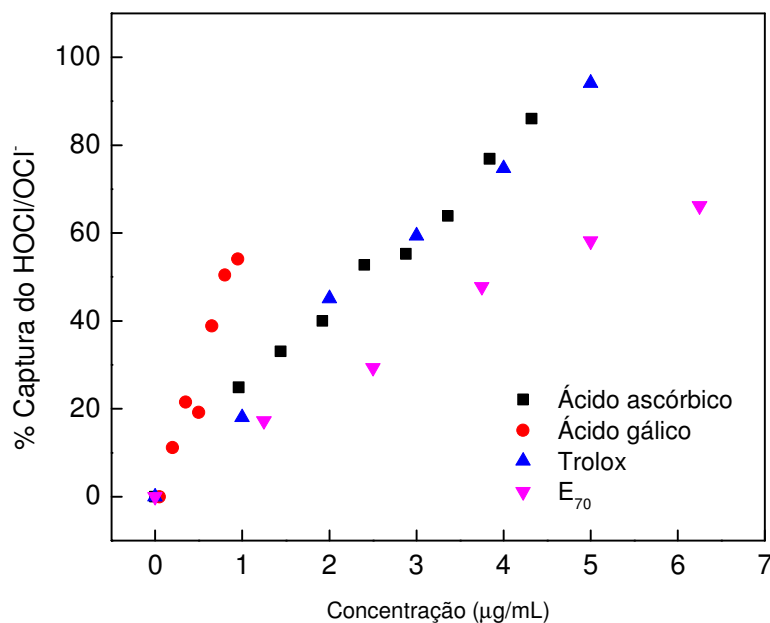


Tabela 10. Valores de CE_{50} para os extratos e padrões pelo método de captura do $HOCl/OCl^-$.

Amostras	CE_{50} (µg/mL) (média)
ácido ascórbico	2,45 ^a
ácido gálico	0,697 ^b
Trolox	2,58 ^a
E_{70}	4,38 ^c

a, b, c, d: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

O valor de CE_{50} obtido para o E_{70} foi aproximadamente 1,7 vezes maior do que o necessário de ácido ascórbico e trolox para obtenção da mesma atividade. Este fato é bastante interessante, visto que a quantidade de extrato necessária é a menor quando comparada aos demais radicais livres utilizados neste estudo. Além disso, o $HOCl/OCl^-$ não apresenta uma via catalítica de

degradação sendo extremamente importante ação de antioxidantes exógenos para sua eliminação.

Analisando a Figura 54 e a Tabela 10 é possível observar que a concentração de E_{70} e ácido ascórbico necessárias para inibir 50% dos radicais é estatisticamente igual. Apesar disso, o ácido ascórbico apresenta uma maior instabilidade necessitando utilizar formas estabilizadas para poder manter a efetividade ou, então, formas farmacêuticas diferenciadas (AUSTRIA *et al.*, 1997; GALLARATE *et al.*, 1999), fato não necessário para o E_{70} , além dos benefícios que podem ser apresentados devido à atuação sinérgica das substâncias do extrato, proporcionando até mesmo o desenvolvimento de um produto cosmético multifuncional.

Além disso, o HOCl/OCl⁻ é gerado em resposta a processos inflamatórios e são liberados pelos fagossomos como sistema de defesa contra microrganismos. É de extrema importância que este radical seja sequestrado, pois, se estiver em excesso, pode extravasar para os tecidos, causando danos teciduais e, também, pode reagir dando origem a outros radicais como hidroxila e oxigênio singlete (BARREIROS *et al.*, 2006; DE PINHO *et al.*, 2010).

Por estes motivos, a capacidade do E_{70} em sequestrar os radicais HOCl/OCl⁻ é extremamente importante, visto que, além de atuar como um potente antioxidante prevenindo o envelhecimento cutâneo, atua como sequestrante de HOCl/OCl⁻, minimizando os danos teciduais, ocasionados por processos inflamatórios e ataques de microrganismos.

Ruby e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antioxidante frente ao HOCl para extratos hidroetanólicos 70% de folhas de *Bergenia ligulata* (Wall) Eng. , *B. ciliata* (Royale) e *B. stracheyi* Engl. e obtiveram 87,79 µg/mL, 80,06 µg/mL e 76,86 µg/mL como valores de CE₅₀, respectivamente (RUBY *et al.*, 2015). Estes valores representam de 18 a 20 vezes mais do que o CE₅₀ obtido para o E_{70} de folhas de *Morus nigra*.

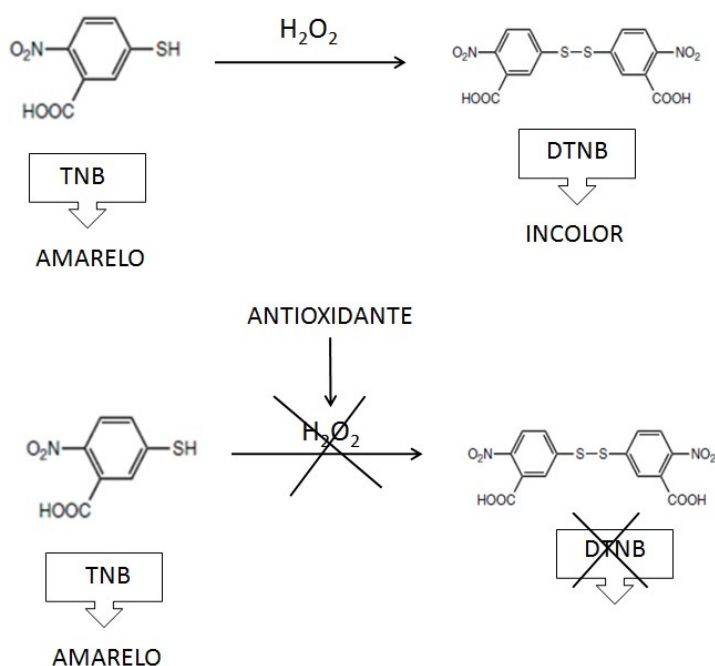
4.5.7. Capacidade de captura sobre o H₂O₂

O peróxido de hidrogênio, apesar de não apresentar elétrons livres, o que caracteriza um radical livre, é precursor de um elevado número de espécies reativas de oxigênio, além de ser capaz de transpor membranas e

assim gerar os radicais no interior das células (BARREIROS *et al.*, 2006). Por esse motivo, é importante a avaliação da captura de H_2O_2 por substâncias antioxidantes.

Neste ensaio, a capacidade de captura do H_2O_2 foi avaliada utilizando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) que, na presença de H_2O_2 , é oxidado a ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), ocasionando a diminuição da absorbância em 412 nm. Com a adição de substâncias com capacidade antioxidante que capturem o H_2O_2 , não haverá sua disponibilidade para provocar a oxidação do TNB e, portanto, não será observado o decréscimo de absorção (Figura 55) (CHING *et al.*, 1994).

Figura 55 Representação esquemática da reação entre H_2O_2 e TNB e da captura do H_2O_2 por substâncias antioxidantes.



A atividade sobre a captura de H_2O_2 foi avaliada utilizando a catalase, o ácido ascórbico, o ácido gálico e trolox como padrões, uma vez que a catalase é a enzima presente na via catalítica de degradação de peróxido endógeno, além do extrato E_{70} . As Figuras 56 e 57 apresentam os resultados obtidos para a catalase e ácido ascórbico, respectivamente.

Figura 56. Perfil de captura de peróxido de hidrogênio por ação da catalase.

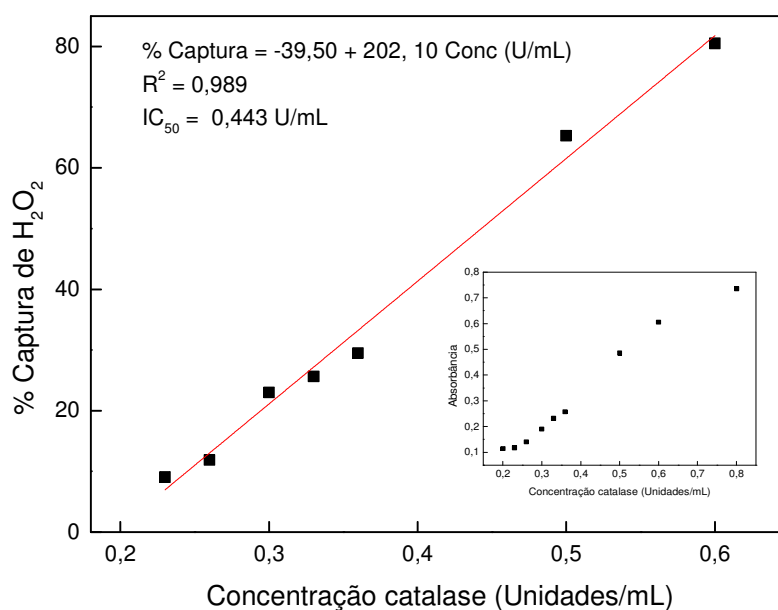
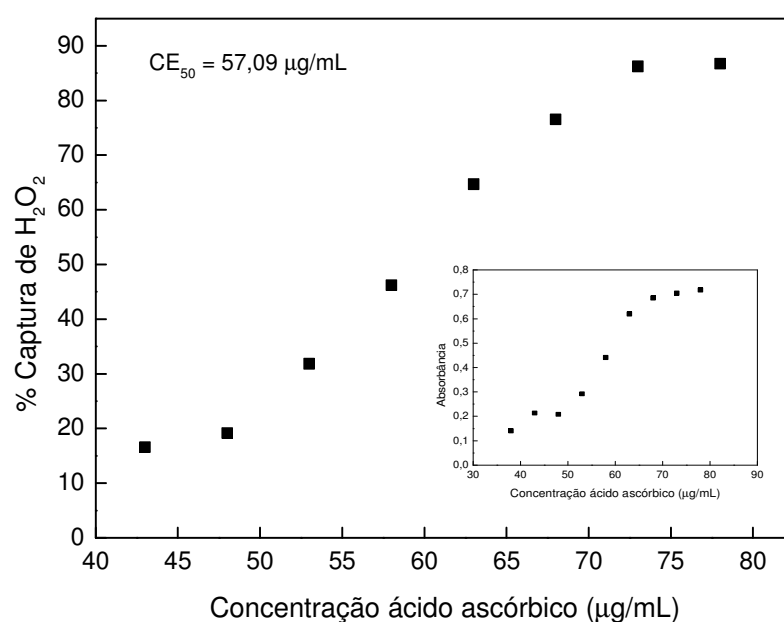


Figura 57. Perfil de captura do peróxido de hidrogênio pelo ácido ascórbico.



A partir dos gráficos apresentados nas Figuras 56 e 57, foi calculado o valor de CE_{50} (Tabela 11) para a catalase e ácido ascórbico, utilizando a porção linear da curva para o cálculo.

Tabela 11. Valores de CE₅₀ para os padrões pelo método de captura de H₂O₂.

Amostras	CE ₅₀ (média)
Catalase	0,443 U/mL
ácido ascórbico	57,09 µg/mL

Para o ácido gálico, trolox e E₇₀, as concentrações máximas testadas foram de 850 µg/mL, 625 µg/mL e 2600 µg/mL, respectivamente. Até estas concentrações, não foi verificada atividade de captura do H₂O₂, sendo estes valores muito superiores aos CE₅₀ obtidos para outros ensaios, podendo inferir que estas substâncias e o E₇₀ não podem ser considerados antioxidantes contra o peróxido de hidrogênio.

4.6. Avaliação da citotoxicidade do extrato em células HepG2, HaCat e HDFa

A avaliação do potencial citotóxico do E₇₀ foi avaliada pelo método do 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), que tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir o MTT, formando cristais insolúveis de formazana, de coloração violeta.

Os ensaios de citotoxicidade do extrato E₇₀ foi realizada em células HepG2, células de hepatoma humano capazes de metabolizar as substâncias presentes no extrato e verificar se os metabólitos formados apresentam toxicidade a esta linhagem celular (CHIARI, Bruna Galdorfini, MARTINI, Paula C, *et al.*, 2012); HaCat, queratinócitos humanos inativos, ou seja, não metabolizadores e, portanto, é possível avaliar a toxicidade do extrato em células que são as maiores componentes da epiderme e HDFa, fibroblastos humanos que representam as células presentes em maior proporção na derme.

Durante a avaliação da citotoxicidade do extrato E₇₀, foi necessária a determinação da quantidade deste extrato para causar letalidade em 50% das células (CE₅₀), portanto, as concentrações avaliadas para cada linhagem celular foram diferentes (Figuras 52 a 54).

Figura 58. Perfil dose-resposta de citotoxicidade para células HepG2 após tratamento com extrato E₇₀.

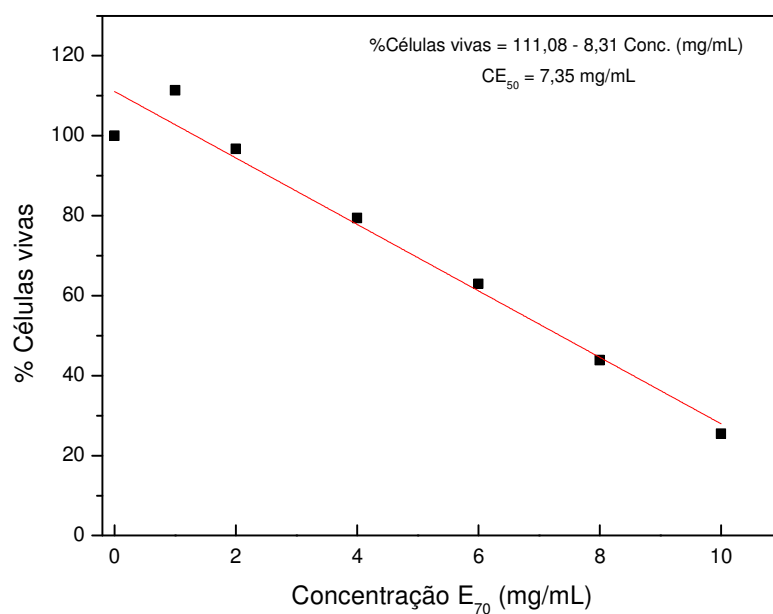


Figura 59. Perfil dose-resposta de citotoxicidade para células HaCat após tratamento com extrato E₇₀.

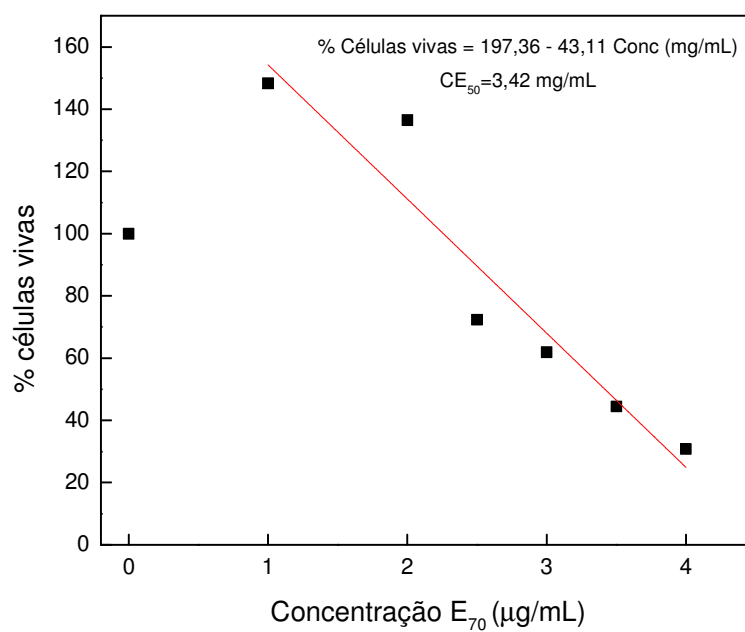
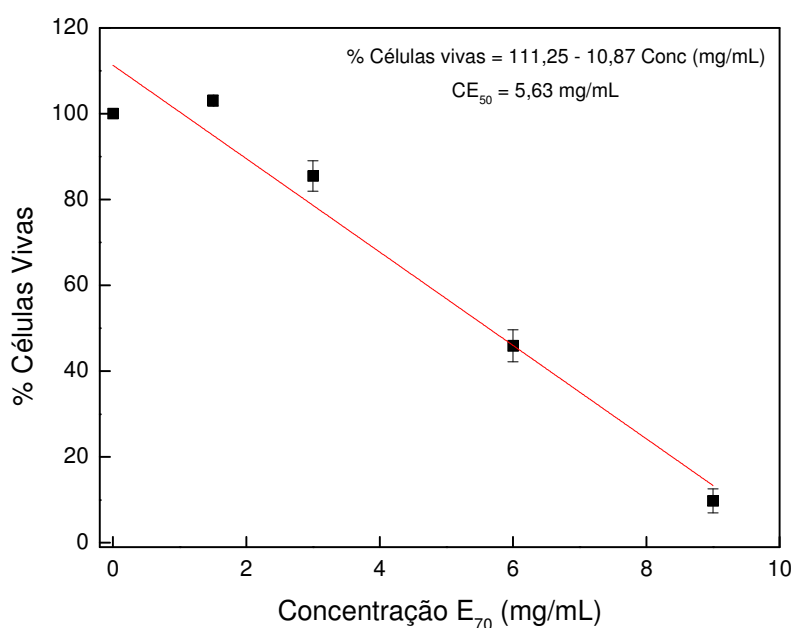


Figura 60. Perfil dose-resposta de citotoxicidade para células HDFa após tratamento com extrato E₇₀.



A partir dos resultados obtidos foi possível realizar a regressão linear das curvas e calcular os valores de CE₅₀ para cada linhagem celular (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de CE₅₀ para citotoxicidade do E₇₀ nas diferentes linhagens celulares.

Linhagem celular	CE ₅₀ mg/mL (média)
HepG2	7,35 ^a
HaCat	3,42 ^b
HDFa	5,63 ^c

a, b, c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Analisando os resultados obtidos, foi possível verificar que as concentrações necessárias para atingir o CE₅₀ foram muito maiores do que as necessárias para obtenção de atividade antioxidante para o extrato, uma vez que, para a maioria dos ensaios realizados, o valor de CE₅₀ para atividade antioxidante foi menor que 50 µg/mL; portanto, em relação a HaCat, que foi a linhagem que apresentou menor concentração para a citotoxicidade, a

quantidade de extrato necessária para atividade antioxidante é mais que 68 vezes menor que a concentração citotóxica.

Além disso, apesar da variação das concentrações citotóxicas nas diferentes linhagens celulares até aproximadamente 2,5 mg/mL, a viabilidade celular é de 80% em todas as linhagens avaliadas; portanto, o extrato pode ser considerado seguro, do ponto de vista citotóxico, para utilização em cosméticos com atividade antioxidante.

Romão (2016) avaliou a citotoxicidade de extrato hidroetanólico 70% de *Cordia verbenacea* em linhagens celulares HepG2 e HaCat. Não foi observada toxicidade para HepG2 em concentrações de até 500 µg/mL, no entanto, para HaCat foi determinado um CE₅₀ de 163,8 µg/mL. Este resultado demonstra que o extrato hidroetanólico 70% de *C. verbenacea* é aproximadamente 21 vezes mais citotóxico para células HaCat do que o extrato E₇₀ de folhas de *Morus nigra* (CE₅₀ 3420 µg/mL)(ROMÃO, 2016).

4.7. Avaliação do potencial quimioprotetor do E₇₀ em células HepG2 e HaCat

A avaliação do efeito quimioprotetor do E₇₀ foi realizada para verificar se este extrato tem a capacidade de proteger as células HepG2 e HaCat de danos oxidativos gerados pelo H₂O₂. O procedimento realizado foi o mesmo utilizado para a avaliação da citotoxicidade com emprego do corante vital MTT (YANG *et al.*, 1999; KANNO *et al.*, 2003; BENEDI *et al.*, 2004).

O peróxido de hidrogênio é uma substância conhecida por causar danos oxidativos em células humanas, por isso, foi realizada a avaliação do potencial quimioprotetor do extrato E₇₀ frente a danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio.

Estudos que avaliam este efeito em células HepG2 e HaCat foram previamente descritos (YANG *et al.*, 1999; KANNO *et al.*, 2003; BENEDI *et al.*, 2004; CHIARI-ANDRÉO, 2014).

Estas linhagens celulares foram escolhidas pelos mesmos motivos citados nos ensaios de citotoxicidade. Além disso, os queratinócitos são as primeiras células atingidas pela radiação ultravioleta, sendo extremamente

importante que o extrato E₇₀, quando utilizado em um fitocosmético, seja capaz de prevenir danos oxidativos nesta linhagem celular.

Para avaliação do efeito quimioprotetor produzido pelo extrato E₇₀, contra danos oxidativos promovidos pelo peróxido de hidrogênio, foi necessária a determinação da citotoxicidade do peróxido de hidrogênio nestas linhagens celulares. Segundo dados descritos na literatura (CHIARI-ANDRÉO, 2014), os valores de CE₅₀ do peróxido de hidrogênio para as células HepG2 e HaCat, são aproximadamente 2,5 mM e 5,0 mM, respectivamente e, por isso, estas concentrações foram utilizadas para indução dos danos oxidativos.

A avaliação do efeito quimioprotetor foi realizada de duas diferentes maneiras, sendo uma denominada pré-tratamento, em que as células foram submetidas por 24 horas ao tratamento com diferentes concentrações de extrato E₇₀ e, após decorrido este tempo, o tratamento foi retirado e foi adicionado o peróxido de hidrogênio na concentração já mencionada. A outra maneira, denominada co-tratamento, consistiu em tratamento concomitante com o extrato E₇₀ e o peróxido de hidrogênio, nas concentrações mencionadas, por um período de 24 horas. O que poderia ser denominado pós-tratamento não foi realizado, uma vez que não seria possível reverter à morte celular com a adição de extrato E₇₀.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 61 a 64.

Figura 61. Pré-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato E₇₀ e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM.

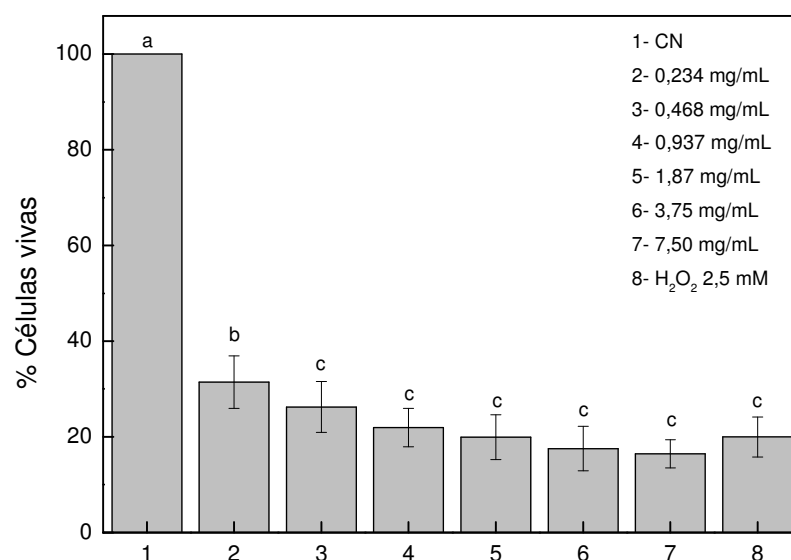


Figura 62. Pré-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato E₇₀ e peróxido de hidrogênio a 5 mM.

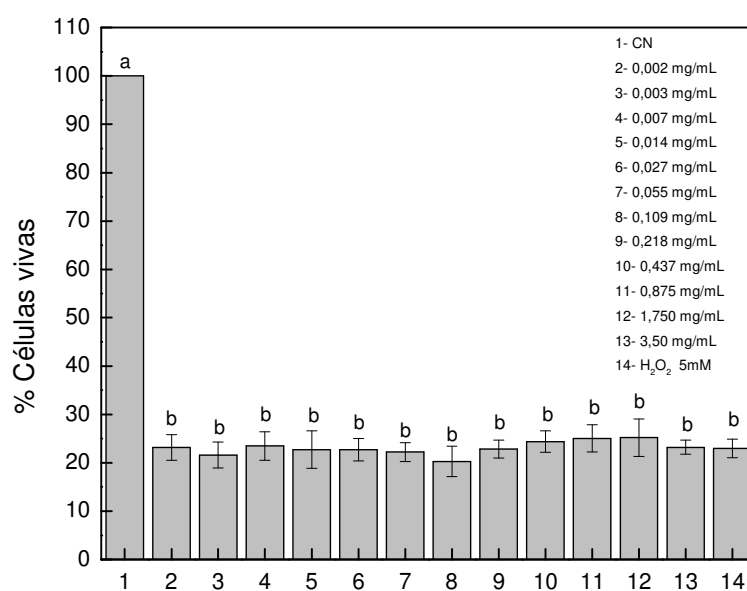


Figura 63. Co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato E₇₀ e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM.

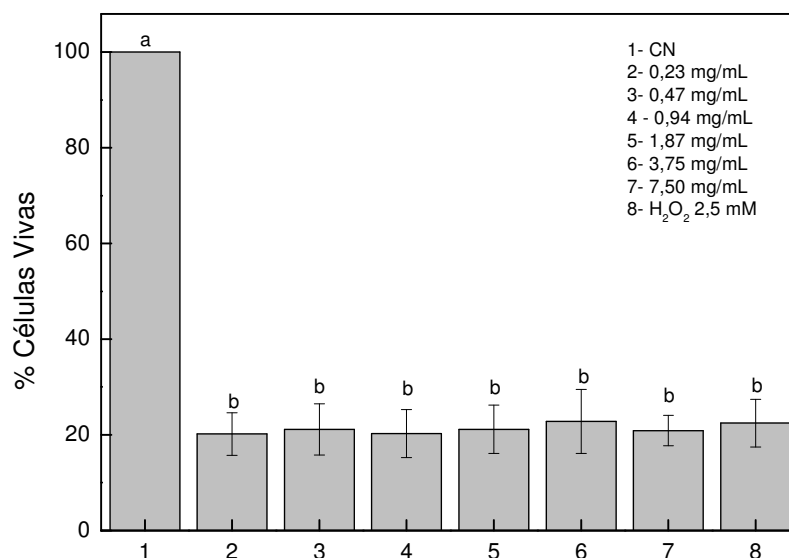
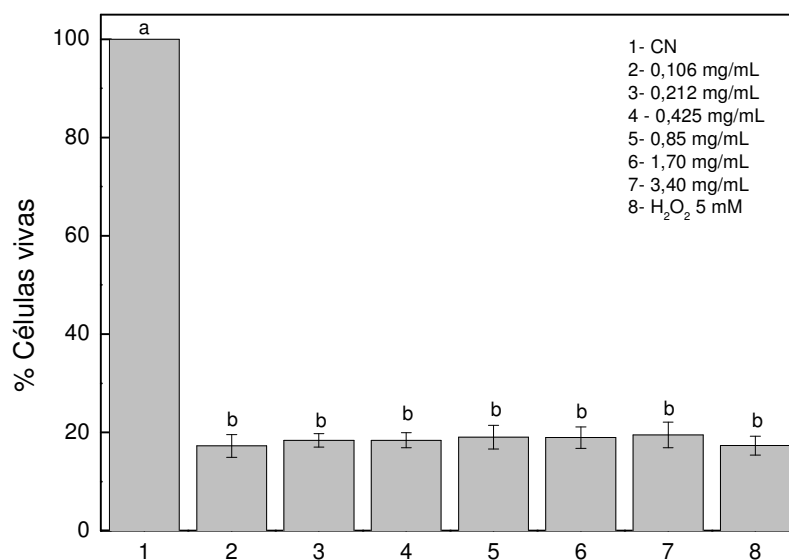


Figura 64. Co-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato E₇₀ e peróxido de hidrogênio a 5 mM.



Analisando as Figuras 61 a 64, foi possível verificar que não houve variação significativa entre as células tratadas com o E₇₀ e o tratamento

realizado com peróxido de hidrogênio (controle positivo). A comparação estatística foi realizada entre os tratamentos com extrato E₇₀ e o controle positivo, não realizando comparação entre cada tratamento.

As concentrações máximas de extrato E₇₀ testadas foram correspondentes às concentrações de CE₅₀ no ensaio de citotoxicidade. No pré-tratamento das células HepG2 com o extrato E₇₀, a menor concentração testada (234 µg/mL), foi verificada diferença estatisticamente significativa; no entanto, este valor não é elevado o suficiente para dizer que o extrato promove efeito quimioprotetor. Devido a esta observação, para as células HaCat foram testadas em concentrações mais baixas; porém não foi verificado efeito quimioprotetor.

Estes resultados eram esperados, uma vez que no ensaio de atividade antioxidante de captura de peróxido de hidrogênio o extrato em concentrações de até 2,60 mg/mL não apresentou atividade. No entanto, estes resultados negativos não impossibilitam o uso do extrato em formulações cosméticas cuja finalidade pretendida seja a prevenção do envelhecimento cutâneo, visto que apresenta atividade antioxidante frente a outras espécies reativas radicalares e não radicalares endógenas.

Como forma de verificar a quimioprevenção poderiam ser testados outros agressores às células como, por exemplo, o ácido hipocloroso, visto que houve efetividade do extrato frente à captura desta espécie.

4.8. Avaliação da biossíntese de colágeno em células HDFa

A biossíntese de colágeno ocorre na derme, mais precisamente nos fibroblastos e, sua principal função, é oferecer sustentação e elasticidade à pele, características que se apresentam diminuídas em peles fotoenvelhecidas ou danificadas, por exemplo, pelo sol.

Segundo dados da literatura (YAMAUCHI *et al.*, 1988; MENTER *et al.*, 2003; CHIARI-ANDRÉO, 2014), a radiação solar estimula a degradação de colágeno, uma vez que inibe a proliferação normal de fibroblastos, podendo caracterizar o envelhecimento precoce, devido à exposição à radiação ultravioleta B.

Por este motivo, foram utilizados fibroblastos humanos (HDFa) para determinar se o extrato E₇₀ seria capaz de provocar estímulo aos fibroblastos, para aumentar a produção de colágeno, visando à melhoria da aparência da pele, após utilização de um fitocosmético contendo este extrato como substância ativa.

Primeiramente, foi obtida uma curva analítica de colágeno tipo I (550 nm), a fim de poder utilizá-la para quantificação do colágeno produzido pelos fibroblastos (Figura 65).

O tratamento dos fibroblastos com o extrato E₇₀ foi realizado em concentração até 6 mg/mL que é superior ao CE₅₀ da determinação da citotoxicidade. Concentrações maiores não foram avaliadas, pois o extrato seria tóxico, observando uma diminuição da produção de colágeno devido à morte celular. O resultado está representado na Figura 66.

Figura 65. Curva analítica de colágeno tipo I.

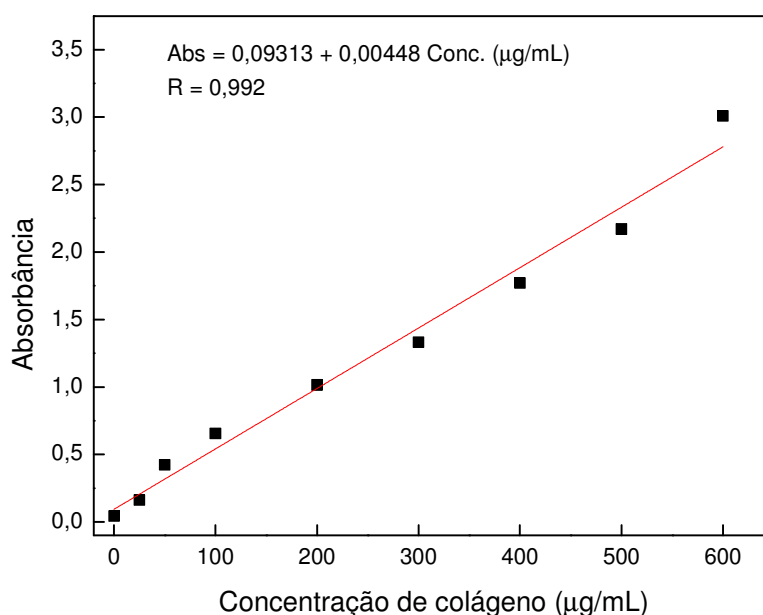
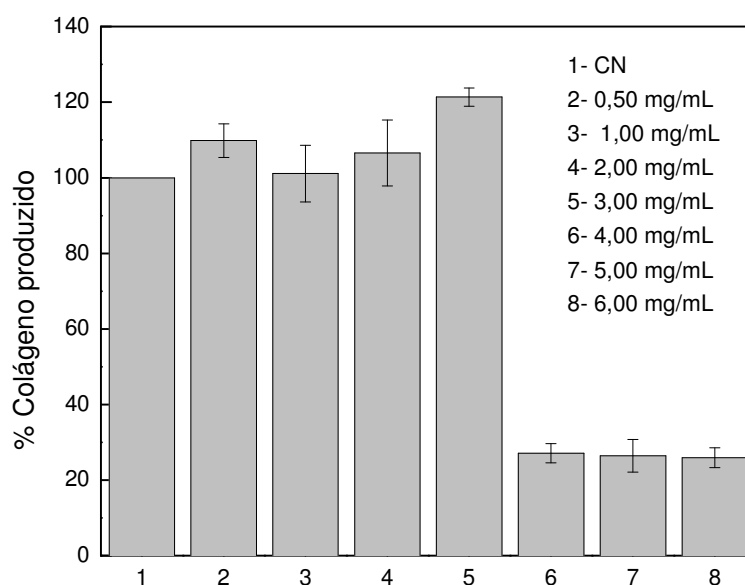


Figura 66. Porcentagem de produção de colágeno por HDFa após tratamento com extrato E₇₀.



Analisando a Figura 66, foi possível notar que em concentrações superiores a 3,00 mg/mL a produção de colágeno caiu em relação ao controle. Este fato pode ter ocorrido devido à morte celular por toxicidade do extrato acima desta concentração. Além da porcentagem da produção de colágeno, foi calculada a concentração de colágeno produzida (Figura 67 e Tabela 13) para concentrações de extrato até 3,00 mg/mL.

Figura 67. Produção de colágeno promovida pelo tratamento de células HDFa com extrato E₇₀.

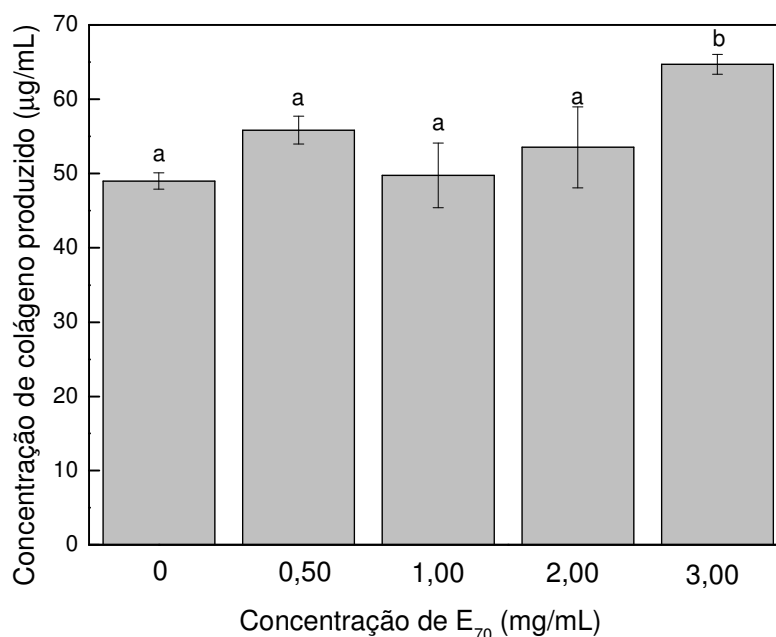


Tabela 13. Concentração de colágeno produzido por HDFa após tratamento com diferentes concentrações de extrato E₇₀.

Concentração de E ₇₀ (mg/mL)	Concentração de colágeno produzido µg/mL (média ± DP)
0	49,00 ± 1,01 ^a
0,50	55,84 ± 1,87 ^a
1,00	49,75 ± 4,34 ^a
2,00	53,54 ± 5,45 ^a
3,00	64,70 ± 1,33 ^b

a, b: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Analisando a Figura 67 e a Tabela 13 foi verificado que a concentração de 3,00 mg/mL apresentou 20% de aumento da produção de colágeno quando comparado ao controle. O aumento foi observado em concentrações elevadas, não sendo possível utilizar como apelo de *marketing* do produto contendo extrato E₇₀ que estimula a biossíntese de colágeno; porém, o acúmulo desta substância na pele, devido a aplicações continuadas do produto (CEFALI *et al.*, 2015), pode contribuir para uma melhora em sua elasticidade.

4.9. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação do extrato hidroetanólico 70

O método foi validado de acordo com a Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2003).

Outros métodos, como o ensaio do clareamento da crocina, captura do HOCl/OCl⁻ poderiam ter sido validados para quantificação do E₇₀, uma vez que o extrato apresentou efetividade na captura destes radicais. Porém, a escolha pelo método de captura do ABTS^{•+} ocorreu devido ao seu *status* de radical modelo e seu custo ser mais baixo para testes de rotina em laboratório.

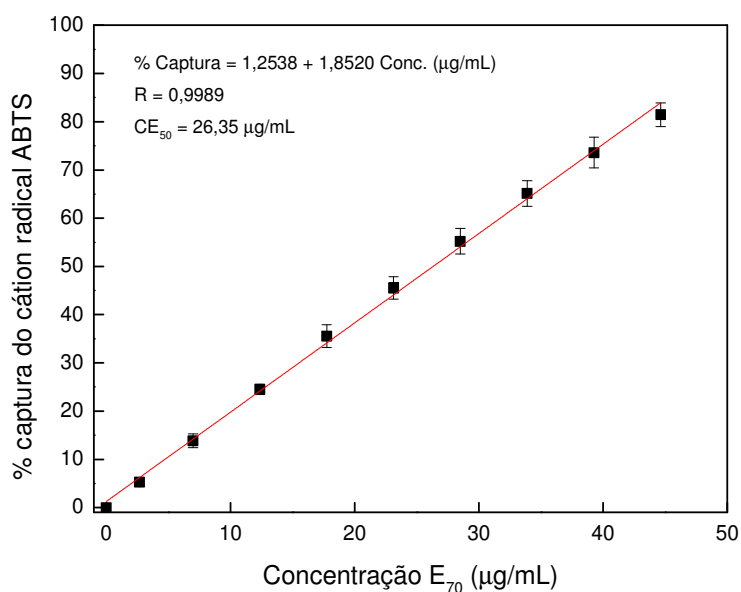
A validação deve garantir a confiabilidade dos resultados; assim, a validação da metodologia para o extrato E₇₀ de *Morus nigra*, pelo método de captura do ABTS^{•+}, teve, como finalidade, demonstrar que essa metodologia é adequada para sua quantificação em solução ou em formulações cosméticas durante a avaliação da estabilidade.

4.9.1. Linearidade

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

Desta forma foi construída a média de três curvas analíticas da porcentagem de captura do ABTS^{•+} pela concentração de extrato E₇₀ de *Morus nigra* e, por regressão linear, foi obtida a equação da reta conforme mostrado na Figura 68.

Figura 68. Média dos valores das curvas para avaliação da linearidade do método.



A partir deste momento, a equação da reta obtida na curva de linearidade foi utilizada para quantificação do extrato E₇₀ de *Morus nigra* nos demais ensaios realizados para completar a validação do método. Caso não houvesse consistência nos resultados, a curva de linearidade não teria sido considerada válida e modificações deveriam ter sido realizadas no processo de validação (BRASIL, 2003).

4.9.2. Precisão

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

A precisão de um método analítico informa se os valores obtidos para um mesmo teste estão sendo reproduzidos e pode ser avaliada em três níveis: repetitividade (precisão intracorrida), precisão intermediária (precisão intercorrida) e reprodutibilidade (precisão interlaboratorial). A reprodutibilidade nem sempre precisa ser avaliada; a robustez seja avaliada e o método for

considerado robusto, este tipo de precisão pode ser descartada (BRASIL, 2003).

Neste trabalho, a precisão foi avaliada de duas maneiras: a repetitividade ou precisão intra-corridas e a precisão intermediária ou precisão inter-corridas. As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados obtidos para avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método.

Tabela 14. Avaliação da repetitividade do método analítico de inibição do radical ABTS 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)			
C1	12,37	13,06	13,06	12,98	12,46	0,55	4,41
C2		11,94	11,57	12,24			
C1	23,13	24,63	24,56	24,88	23,45	1,16	4,95
C2		22,52	21,64	22,76			
C1	44,65	45,44	43,41	42,69	43,09	1,38	3,20
C2		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.

Tabela 15. Avaliação da precisão intermediária 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)			
C1	12,37	13,06	13,06	12,98	12,82	0,34	2,67
C2		12,19	12,98	13,06			
C1	28,51	29,78	30,71	30,63	29,80	0,69	2,32
C2		29,44	29,84	29,69			
C1	39,27	40,86	40,46	40,62	39,99	0,61	1,53
C2		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.

O método foi considerado preciso, pois os valores de desvio padrão relativo (DPR) não ultrapassaram 5%, condição exigida para que o método seja considerado preciso (BRASIL, 2003).

4.9.3. Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada utilizando três concentrações conhecidas correspondentes aos valores baixo, médio e alto da curva de linearidade (concentrações teóricas).

Os valores obtidos de porcentagem de inibição foram substituídos na equação da linearidade para que fosse calculado o valor experimental das concentrações das amostras avaliadas. A partir destes resultados, foi possível calcular a exatidão de cada concentração testada. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 16. 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 porque os valores encontrados estão no intervalo considerado pela ANVISA entre 95 e 105% de exatidão (BRASIL, 2003).

4.9.4. Especificidade e seletividade

Para determinação da especificidade e seletividade do método foram avaliadas soluções, com três diferentes concentrações (baixa, média e alta da curva de linearidade) contaminadas com creme base em uma quantidade que não causasse turvação da amostra. A partir dos valores de porcentagem de inibição obtidos, foram calculadas as concentrações experimentais e comparadas com o valor teórico pelo cálculo do desvio padrão relativo. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 17. Avaliação da especificidade e seletividade 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)	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.

4.9.5. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é uma estimativa da menor quantidade de analito possível de ser detectada, pelo método proposto e, o limite de quantificação é a menor concentração capaz de ser quantificada com precisão e exatidão, utilizando o método proposto. Os valores (Tabela 18) foram calculados conforme descrito na Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 18. Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método analítico para determinação de extrato de *Morus nigra*.

Curva analítica 1	Intercepto com eixo Y	1,6458
Curva analítica 2		0,7303
Curva analítica 3		1,3853
Desvio Padrão do intercepto		0,4717
Inclinação da curva		1,852
Limite de detecção (µg/mL)		0,764
Limite de quantificação (µg/mL)		2,546

O valor obtido foi de 0,76 µg/mL para limite de detecção e de 2,55 µg/mL para o limite de quantificação. Neste caso, o limite de quantificação obtido é aproximadamente 10 vezes menor que o valor obtido para o CE₅₀; desta forma, o E₇₀ pode ser quantificado com exatidão e precisão conferindo confiabilidade nos resultados de estabilidade que utilizam este método para quantificação do extrato.

4.9.6. Robustez

A robustez de um método analítico mede sua capacidade de manter a confiabilidade, quando exposto a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Nesse trabalho, foi mudado o fornecedor de solvente etanol, em relação ao utilizado para obtenção da curva analítica e realização de todos os outros ensaios para validação do método. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 19. Avaliação da robustez 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)	Média	Desvio	DPR %
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

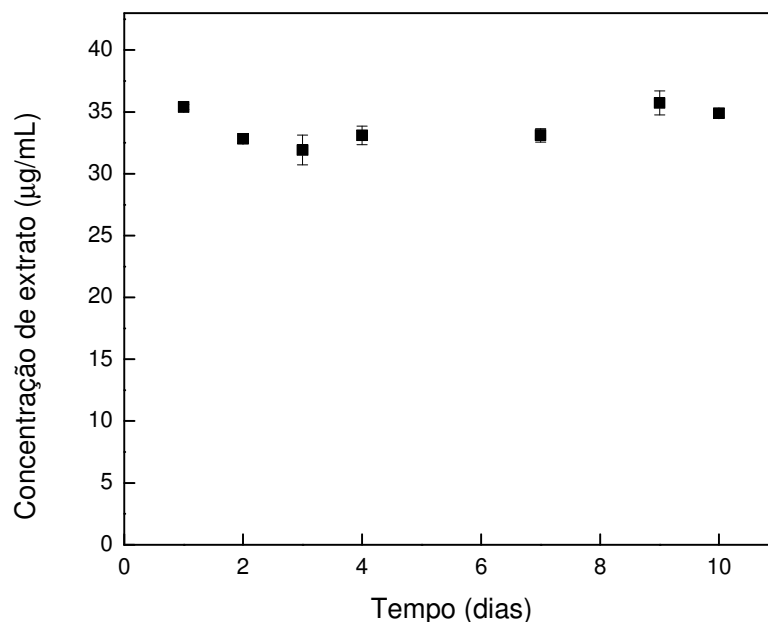
CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; DPR: Desvio Padrão Relativo.

O resultado obtido corrobora com dados da literatura (BRASIL, 2003; ALMEIDA, M. G. J. *et al.*, 2013), uma vez que o DPR não ultrapassou 5% considerando o método robusto.

4.10. Avaliação da estabilidade da solução aquosa do extrato E₇₀

A avaliação da estabilidade do extrato E₇₀ em solução aquosa foi realizada para verificar se a solução preparada com o ativo poderia ser

Figura 70. Concentração do E₇₀ na solução aquosa avaliada por 10 dias.



Após os 10 dias de análise, foi possível observar que a solução do extrato permaneceu estável nas condições determinadas para avaliação, uma vez que não sofreu variação superior a 10% na concentração obtida; portanto, a solução não precisa ser preparada no momento do uso, desde que seja mantida em geladeira, podendo ser utilizada em até 10 dias, sendo necessário um período maior de avaliação para saber por quanto tempo a concentração se mantém.

4.11. Preparo da formulação e incorporação do E₇₀

Neste trabalho, foi desenvolvida uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) com ingredientes que proporcionassem sensorial agradável e viscosidade adequada para aplicação facial. Para isso, foram utilizadas matérias primas disponíveis em nosso laboratório para o desenvolvimento da formulação e, dentre elas, o *Sodium polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6*

(Rapithix A-60) que é um homopolímero aniônico pré-neutralizado, desenvolvido principalmente para uso em emulsão a frio, pois não necessita de aquecimento para o preparo da formulação gera economia para a empresa fabricante, uma vez que diminui o custo de processo, além de contribuir para o desenvolvimento sustentável.

A utilização deste produto permitiu atingir a viscosidade e o sensorial desejados à formulação cosmética desenvolvida.

O extrato E₇₀ foi incorporado à formulação na concentração de 0,5% o que corresponde a 5000 µg de extrato em 1g de creme. Foi possível a incorporação desta concentração de E₇₀, pois esta quantidade, ao ser disponibilizada para a pele, após liberação do produto, é superior a quantidade necessária para captura das espécies reativas avaliadas (193 vezes maior que a quantidade necessária para capturar 50% de HOCl/OCl⁻) e, além disso, é segura perante os ensaios de citotoxicidade realizados.

A emulsão preparada foi do tipo O/A e os componentes utilizados tinham como objetivo garantir viscosidade adequada e um sensorial agradável não muito oleoso, visto que a finalidade do produto final era para área facial. A composição percentual está descrita na Tabela 20.

Tabela 20. Composição percentual da formulação.

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

O *Dicaprylyl carbonate* foi usado como emoliente da emulsão O/A.

Foi utilizado, também, o *Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer (and) Dimethicone (and) Laureth-23 (and) Laureth-4* que contribuiu sensorialmente devido a rápida secagem conferindo à formulação

toque aveludado e ausência de pegajosidade, corroborando com os dados da literatura (CORNING, 2014).

O *Sodium polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6* é um homopolímero aniônico pré-neutralizado, desenvolvido principalmente para uso em emulsão a frio. Este produto conferiu uma resposta emulsionante e aumento de viscosidade para a emulsão O/A. Além disso, garantiu um sensorial sedoso e suave à formulação cosmética, conforme indicação do fabricante (DEG, 2014).

O conservante microbiológico de amplo espectro utilizado foi *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben* (MAPRIC, 2014).

E o *Disodium EDTA* ajuda na potencialização do sistema conservante da formulação assim como quelante de metais.

A esta formulação base (FB) foi incorporado o extrato E₇₀ na concentração de 0,5% sendo obtida a formulação denominada fitocosmético (Fito).

4.12. Caracterização reológica das formulações

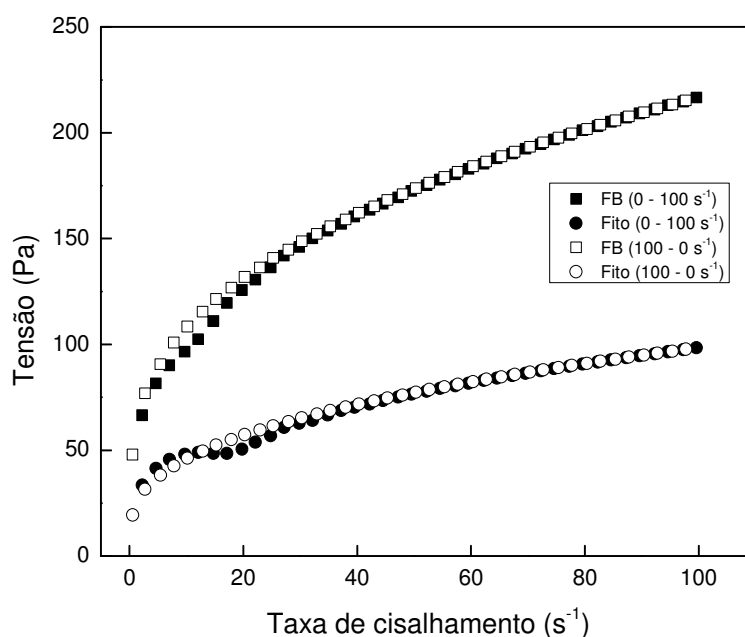
A caracterização reológica de formulações cosméticas é de extrema importância, pois as informações obtidas, além de auxiliar na qualidade do produto formulado, podem auxiliar, também, em informações sobre sua eficácia e estabilidade, fatores importantes para o desenvolvimento de produtos. Além do mais, as propriedades avaliadas podem fornecer dados sobre a fabricação, estocagem e aplicação dos produtos cosméticos (GALLEGOS e FRANCO, 1999; ALMEIDA e BAHIA, 2003; GREGOLIN *et al.*, 2010; CHIARI, Bruna Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012).

Para produtos cosméticos, outras características importantes relacionadas ao comportamento reológico são dados sobre espalhabilidade da formulação e liberação do ativo cosmético (CHIARI, Bruna Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foi avaliado o comportamento reológico da formulação base (FB) e do fitocosmético, através da realização de análise de curva de fluxo, varredura de tensão e frequência e fluência e relaxação.

Com avaliação do comportamento de fluxo é possível verificar se o material é um fluido Newtoniano; ou seja, apresenta viscosidade constante independente de variação de temperatura ou do tempo, sendo representado por uma curva de fluxo com proporcionalidade entre a taxa de cisalhamento e a tensão. Por outro lado, os fluidos podem ser caracterizados como não-Newtonianos, sendo ausente a proporcionalidade entre taxa de cisalhamento e tensão (ABDEL-RAHEM *et al.*, 2005; CHIARI, Bruna Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012). A Figura 71 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de curva de fluxo para a FB e Fito.

Figura 71. Curva de fluxo da formulação base e fitocosmético.



Analisando a Figura 71, foi possível notar que tanto a formulação base quanto o fitocosmético apresentaram características de fluidos não-Newtonianos, uma vez que não foi observada proporcionalidade entre taxa de cisalhamento e tensão (ALEXANDROU *et al.*, 2001; DOGAN *et al.*, 2008).

Além disso, também foi possível observar que ambas as formulações necessitaram de uma força inicial para que o material escoasse. Desta forma, o material pode ser descrito pelo modelo de Herschel-Bulkley, o qual é descrito por necessitar de uma tensão de cisalhamento para que ocorra o escoamento

(CHIARI, Bruna Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012; GÜNEYISI *et al.*, 2016). Para FB essa tensão foi de aproximadamente 66 Pa, enquanto para o Fito a tensão de cisalhamento inicial foi de aproximadamente 33 Pa.

A incorporação do extrato na formulação foi realizada separando uma pequena porção da água da formulação para solubilização do extrato e posterior incorporação. Desta forma, não houve adição de água além da quantidade prevista no q.s.p. da formulação base.

A viscosidade das formulações teve um decréscimo de acordo com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo que a viscosidade mínima aparente (valor obtido quando a taxa de cisalhamento é 100 s^{-1}) foi menor para o fitocosmético do que para a formulação base, podendo inferir que o extrato E₇₀ promove diminuição da viscosidade da formulação base (Tabela 21).

Tabela 21. Valores de viscosidade mínima aparente para formulação base e fitocosmético.

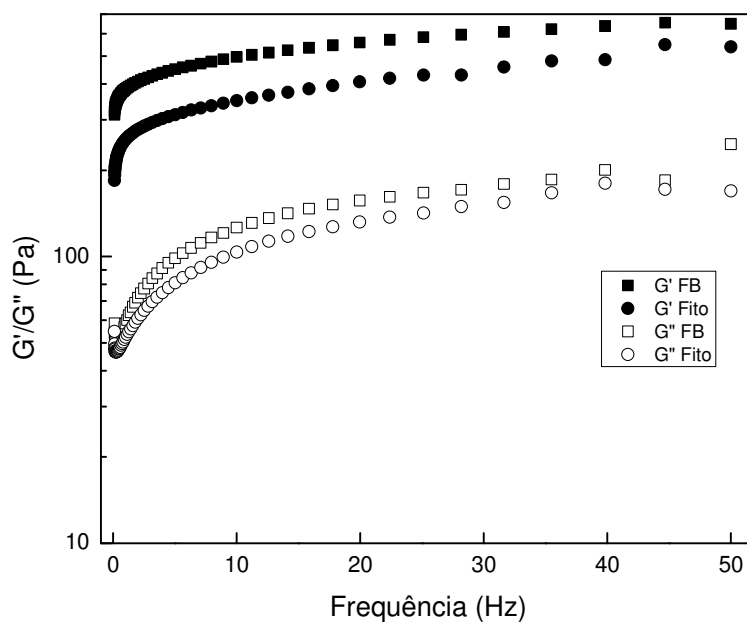
Formulação	Viscosidade (Pa.s) $\pm$ DP
Formulação Base	2,173 $\pm$ 0,045 ^a
Fitocosmético	0,987 $\pm$ 0,153 ^b

DP: desvio padrão; a, b: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

A variação de viscosidade observada entre a FB e o Fito ocorreu devido à adição do E₇₀ à formulação, uma vez que não houve adição de água suplementar para a incorporação do extrato; portanto, é possível dizer que o E₇₀ contribui para a diminuição de viscosidade da formulação. Este fato pode estar relacionado ao valor de pH do extrato quando em solução, uma vez que a matéria prima utilizada como emulsionante e doador de consistência (*Sodium polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6*) é um homopolímero pré-neutralizado e pode sofrer alterações, em sua viscosidade, de acordo com o pH final da formulação, que neste caso foi de 6,4.

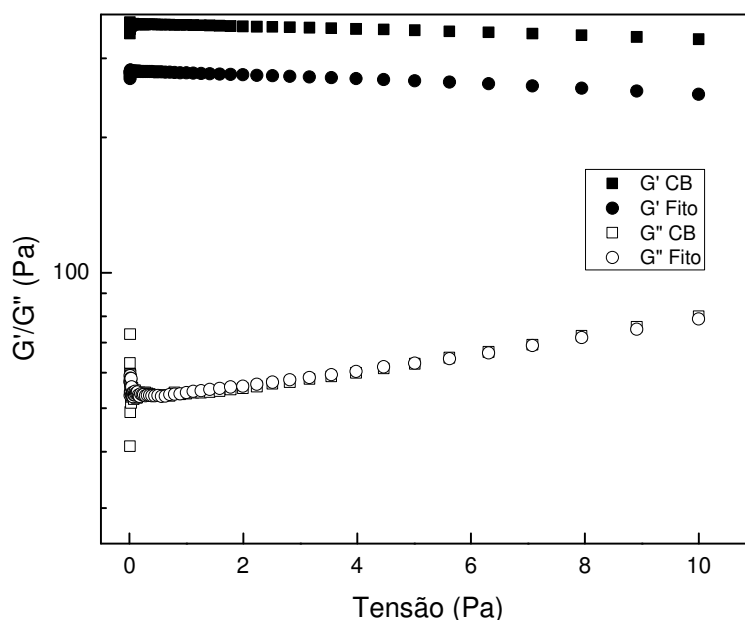
O ensaio de varredura de frequência foi realizado de 0,1 a 50 Hz com tensão constante de 1,0 Pa, a fim de determinar a faixa de viscoelasticidade linear (Figura 72).

Figura 72. Varredura de frequência da formulação base e fitocosmético.



A partir da Figura 66 foi possível observar que até aproximadamente 20 Hz houve variação nos valores de G' e G'' , sendo mantida mais próxima de um *plateau* após os 20Hz; portanto, para o ensaio de varredura de tensão foi utilizada a frequência de 20Hz variando a tensão de 0 a 10 Pa (Figura 73).

Figura 73. Varredura de tensão para a formulação base e fitocosmético.

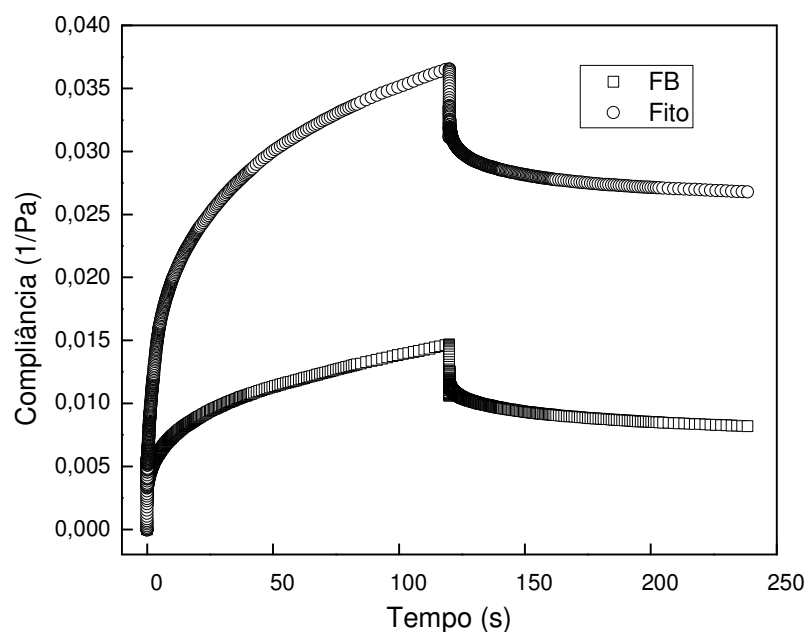


Analisando a Figura 73 foi possível notar que aproximadamente de 0,5 a 2,0 Pa a formulação apresenta região de viscoelasticidade linear e, após 2 Pa, a estrutura demonstra alterações, com o aumento da tensão; portanto, a tensão de 1,0 Pa será utilizada para o ensaio oscilatório de fluência e relaxação.

Além disso, após os ensaios de varredura de frequência e varredura de tensão, foi possível observar que ambas as formulações são viscoelásticas com valor de G' (módulo elástico) superior ao G'' (módulo viscoso), conferindo à formulação um caráter mais elástico. Apesar destas características, a formulação base tem uma diferença entre valores de G' e G'' maior do que para o fitocosmético, demonstrando que este pode apresentar uma menor estabilidade quando comparado à formulação base (CHIARI, Bruna Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012).

O ensaio de fluência e relaxação foi realizado a 1,0 Pa, a fim de verificar o comportamento durante a aplicação da tensão e como o material se comporta após cessar a força aplicada (Figura 74).

Figura 74. Fluência e relaxação para formulação base e fitocosmético.



Observando a Figura 74, foi possível verificar que o fitocosmético apresenta maior deformação que a formulação base com a aplicação da mesma força; além disso, após cessar a força, a recuperação da formulação base, em porcentagem, foi maior do que aquela para o fitocosmético (Tabela 22). A deformação da amostra é apresentada como valor de complância (J), que nada mais é do que a relação entre a tensão e a força aplicada, sendo expressa em 1/Pa (CHIARI, Bruna Galdorfini, ALMEIDA, Maria Gabriela José de, *et al.*, 2012). Quanto maior o valor de complância, mais o material é capaz de escoar.

Tabela 22. Valor de compliância máxima (J_{max}) e porcentagem de recuperação da formulação base e fitocosmético no ensaio de fluência e relaxação.

Formulação	J_{max} (1/Pa)	% Recuperação
Formulação Base	0,01461 $\pm$ 0,00030	44,03 $\pm$ 7,83
Fitocosmético	0,036487 $\pm$ 0,00053	26,58 $\pm$ 4,11

O valor máximo de compliância para o Fitocosmético foi maior do que o observado para a Formulação Base e sua porcentagem de recuperação foi menor, nas mesmas condições de análise. Este fato está em concordância com o resultado verificado para a viscosidade, uma vez que o Fitocosmético é menos viscoso, sendo capaz de escoar com maior facilidade; porém, não consegue recuperar sua estrutura com facilidade.

Os resultados obtidos durante a caracterização reológica estão em concordância entre si, mostrando que os parâmetros utilizados estão coerentes. Com a avaliação do comportamento reológico da Formulação Base e do Fitocosmético foi possível observar que o Fito é menos viscoso do que FB e, também, menos elástico, o que pode ser comprovado pela recuperação menor da estrutura observada no ensaio de fluência e relaxação. Estas diferenças entre as formulações ocorrem devido à adição do extrato E₇₀, uma vez que é o único componente que diferencia o fitocosmético da formulação base; contudo, não há nenhum fator que dificulte a utilização do fitocosmético, como uma formulação de uso facial ou, mesmo, corporal.

5. Considerações finais

A realização deste trabalho permitiu a obtenção de quatro extratos de folhas de *Morus nigra* com características diferentes quanto à composição, uma vez que as polaridades dos solventes extratores são diferentes entre si. Este fato proporcionou a observação de diferença entre o teor de compostos fenólicos e flavonóides, sendo que o etanol a 70% possibilitou maior extração destes compostos, provavelmente devido à proximidade dos valores de polaridade entre as substâncias presentes nas folhas e os solventes utilizados na extração.

Além disso, foi verificado que, apesar da diferença de composição, os quatro extratos apresentaram atividade antioxidante frente a diferentes espécies reativas radicalares e não radicalares e o E₇₀ apresentou maior potencial antioxidante do que os demais extratos avaliados, frente aos radicais modelo: DPPH[•], ABTS^{•+} e frente ao ânion radical superóxido que é de ocorrência biológica.

Com os ensaios de avaliação da atividade antioxidante, foi possível concluir que o E₇₀ apresenta maior afinidade para neutralização do ácido hipocloroso, em relação as outras radicais analisados, sendo necessários apenas 1,7 vezes mais extrato do que ácido ascórbico ou trolox para sequestrar esta espécie reativa. Apesar de apresentar atividade frente a diferentes espécies reativas, o E₇₀ não foi capaz de capturar o peróxido de hidrogênio, mesmo quando utilizado em concentrações elevadas (2,6 mg/mL).

O E₇₀ foi considerado seguro após avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares HepG2, HaCat e HDFa, uma vez que, para todas as linhagens celulares avaliadas, 80% das células permaneceram vivas com a concentração de 2,5 mg/mL. Esta concentração é considerada segura, pois é aproximadamente 70 vezes maior do que a quantidade necessária para capturar 50% do DPPH[•], sendo aproximadamente 780 vezes maior do que a quantidade necessária para capturar 50% do ácido hipocloroso.

Não foi verificado efeito quimioprotetor no co-tratamento em células HepG2 e HaCat e, no pré-tratamento, apenas uma concentração de extrato mostrou ser promissora para quimioproteção, frente à linhagem HepG2; porém, a proteção não apresentou valor significativo. Este fato era esperado, uma vez

que nos ensaios de captura do peróxido, não foi verificada atividade para o extrato. Foi verificado aumento da produção de colágeno para células HDFa tratadas com 3,0 mg/mL de E₇₀; porém o aumento não foi relevante a ponto de poder ser utilizado como apelo de *marketing* para o produto, mas seu uso constante pode promover tais benefícios à pele.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, sendo desenvolvida uma formulação cosmética com incorporação de 0,5% do E₇₀ para utilização facial com a finalidade de prevenção do envelhecimento precoce.

6. Conclusão

Com base em todos os resultados apresentados foi possível concluir que o extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* L. obtido neste trabalho apresentou eficácia para a captura de espécies reativas biológicas, tais como ânion radical superóxido e ácido hipocloroso, além de ser capaz de impedir ou retardar o acontecimento de lipoperoxidação em membranas biológicas.

O extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* L. é seguro, em relação à citotoxicidade em linhagens celulares HepG2, HaCat e HDFa.

Além disso, em relação ao estímulo à biossíntese de colágeno, não foi verificado um aumento expressivo; porém, com o uso contínuo, este benefício poderá ser evidenciado.

Desta forma, o extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Morus nigra* L. é um forte candidato a ativo cosmetodermatológico antienvelhecimento.

7. Referências Bibliográficas

- ABDEL-RAHEM, R.; GRADZIELSKI, M.; HOFFMANN, H. A novel viscoelastic system from a cationic surfactant and a hydrophobic counterion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, n. 2, p. 570-582, 2005.
- ACHARYA, J. et al. Red-Cell Lipid-Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Iron-Deficiency. **European Journal of Haematology**, v. 47, n. 4, p. 287-291, 1991.
- ALEXANDROU, A. N.; MCGILVREAY, T. M.; BURGOS, G. Steady Herschel-Bulkley fluid flow in three-dimensional expansions. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 100, n. 1-3, p. 77-96, 2001.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. . **Cosmetic Toiletries (Ed. Port.)**, v. 15, p. 96 - 100, 2003.
- ALMEIDA, M. G. J. **Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum***. Departamento de Fármacos e Medicamentos Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Ararquara-SP, 2013.
- ALMEIDA, M. G. J. et al. Validation of an Alternative Analytical Method for the Quantification of Antioxidant Activity in Plant Extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 1, p. 90-95, 2013.
- ALMEIDA, M. G. J. et al. **Determinação da atividade antioxidante do extrato de *Ascophyllum nodosum* para incorporação em base cosmética**. . 26º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. São Paulo - SP. online 2012.
- ALMEIDA, M. G. J. D. et al. Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 1, p. 90-95, 2013.
- ALVES, C. Q. et al. Methods for Determination of in Vitro Antioxidant Activity for Extracts and Organic Compounds. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.
- ARUOMA, O. I. et al. Damage to the Bases in DNA Induced by Hydrogen-Peroxide and Ferric Ion Chelates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 34, p. 20509-20512, 1989.

ASSIS, R. P. et al. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species in vitro model systems as a possibility of support the renal function management. **Bmc Nephrology**, v. 16, 2015.

AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 6, p. 795-801, 1997.

BAGATIN, E. Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmecêuticos. **Revista Brasileira de Medicina**, 2009.

BARATA, L. Empirismo e Ciência: Fonte de novo fitomedicamentos. **Revista Ciência e Cultura**, v. 57, n. 4, p. 4-5, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; AREAS, J. A. G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BENEDI, J. et al. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. **Life Sciences**, v. 75, n. 10, p. 1263-1276, 2004.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse Oxidativo, Lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 6, p. 1340-1344, 2006.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional.** . Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2006.

BORS, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the Bleaching of the Carotenoid Crocin - a Rapid Test for Quantifying Antioxidant Activity. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 796, n. 3, p. 312-319, 1984.

BORTOLINI, G. V. **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGENOTÓXICA E ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE VITIS LABRUSCA (VARIEDADE ISABEL) ORGÂNICA E CONVENCIONAL EM CÉLULAS DE MAMÍFERO V79.** Dissertação de Mestrado Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2012.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. 2003.

_____. **Política Nacional de Medicina Natural e Prática Complementares (PMNPC)**. SAÚDE, M. D. Brasília 2005.

BRESTEL, E. P. Co-Oxidation of Luminol by Hypochlorite and Hydrogen-Peroxide Implications for Neutrophil Chemi-Luminescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 126, n. 1, p. 482-488, 1985.

BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.

CAO, H. et al. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 719, n. 1-3, p. 177-183, 2005.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CEFALI, L. C. et al. Development and evaluation of an emulsion containing lycopene for combating acceleration of skin aging. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 579-590, 2015.

CHAN, K. C. et al. Mulberry Leaf Extract Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Migration Involving a Block of Small GTPase and Akt/NF-kappa B Signals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9147-9153, 2009.

CHEN, F. et al. A novel method for speech acquisition and enhancement by 94 GHz millimeter-wave sensor. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, n. 1, 2016.

CHENG, Z. Y. et al. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 4067-4073, 2002.

CHENG, Z. Y. et al. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorganic Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 149-162, 2003.

CHIARI-ANDRÉO, B. G. **Modelos *in vitro* e *in vivo* aplicados à avaliação de toxicidade e eficácia de fitocosmético**. Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara - SP 2014.

CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Mestrado). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Araraquara-SP, 2011.

CHIARI, B. G. et al. Cosmetics' quality control. In: OPEN, I. (Ed.). **Latest research into quality control**: InTech Open, 2012. cap. 16, p.337-364.

CHIARI, B. G. et al. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v. 2, n. 2, p. 8-14, 2012.

CHIARI, B. G. et al. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 331-336, 2012.

CHIARI, B. G. et al. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 389-393, 2014.

CHING, T. L.; DEJONG, J.; BAST, A. A Method for Screening Hypochlorous Acid Scavengers by Inhibition of the Oxidation of 5-Thio-2-Nitrobenzoic Acid - Application Antiasthmatic Drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 377-381, 1994.

CHIRINOS, R. et al. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 2, p. 217-225, 2007.

CIESLIK, E.; GREDA, A.; ADAMUS, W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 135-142, 2006.

COHEN, M. V. Free-Radicals in Ischemic and Reperfusion Myocardial Injury - Is This the Time for Clinical-Trials. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 11, p. 918-931, 1989.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 395-403, 2006.

CORNING, D. DC 7-3101 Elastomer Blend HIP Emulsion. 2014. Disponível em:
<<http://www.dowcorning.com/applications/search/default.aspx?R=1756EN>>.
Acesso em: 10 de setembro de 2014.

DE PINHO, R. A. et al. Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 515-521+549-555, 2010.

DEG. Rapihix A-60 - Informe técnico., 2014. Disponível em:
<http://www.fagron.com.br/Literaturas/LITERATURAS%20COSMETICAS/RAPITHIX_A%2060.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2014.

DEUSCHLE, V. C. K. N. et al. Phytochemical evaluation and in vitro antioxidant and photo-protective capacity of *Calendula officinalis* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 4, p. 693-701, 2015.

DOGAN, M.; YILMAZ, Z.; ALKAN, M. Characterization and Rheological Properties of Kaolinite-Silicon Oil Pastes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 21, p. 8218-8227, 2008.

DWECK, A. C. Formulating with Natural Ingridients. **Cosmetic & Toiletries**, v. 116, n. 5, p. 57-60, 2001.

EATON, J. W. Catalases and Peroxidases and Glutathione and Hydrogen-Peroxide - Mysteries of the Bestiary. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, n. 1, p. 3-4, 1991.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

_____. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 1, p. 41-46, 2008.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 19, n. 2, p. 56-72, 2003.

FERRARI, M. et al. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 626-630, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

FREITAS, P. C. D. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphr umbellata* (L) Miq e *Pipper regnelli* (Miq) CDC**. Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. Cosméticos: a química da beleza. 2011.

GALLARATE, M. et al. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, n. 2, p. 233-241, 1999.

GALLEGOS, C.; FRANCO, J. M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, n. 4, p. 288-293, 1999.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GREGOLIN, M. T. et al. Rheological Characterization of Hydrophilic Gels. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 820-825, 2010.

GUARATINI, T. et al. Natural Products Derived Sunscreen: Market Perspectives and Interactions between Business and Research Institutes. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

GÜNEYISI, E. et al. Evaluation of the rheological behavior of fresh self-compacting rubberized concrete by using the Herschel–Bulkley and modified Bingham models. **Archives of Civil and Mechanical Engineering**, v. 16, n. 1, p. 9-19, 2016.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central-Nervous-System. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Disease - an Overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. G., J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th. New York, United States: 2007.

HASHIM, P. et al. Triterpene Composition and Bioactivities of Centella asiatica. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1310-1322, 2011.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, 2008.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte Antioxidants and Membrane Vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, n. 5, p. 401-404, 1986.

HERNANDEZ, A. M.; PIETRO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica, Ciudad de La Habana**, v. 18, n. 1, p. 12-14, 1999.

HERSHKO, C. Mechanism of Iron Toxicity and Its Possible Role in Red-Cell Membrane Damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HO, Y. C.; YU, H. T.; SU, N. W. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assays for Determining Flavonoid Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2674-2681, 2012.

HRAZDINA, G.; BORZELL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on Stability of Anthocyanidin-3,5-Diglucosides. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 4, p. 201-&, 1970.

HUANG, H. P. et al. Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9286-9293, 2008.

IHA, S. M. et al. Phytochemical study of guava (*Psidium guajava* L.) with potential antioxidant activity aiming at developing a phytocosmetic formulation. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

IQBAL, S. et al. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6651-6664, 2012.

ISAAC, V. L. B. et al. Effect of Various Thickening Agents on the Rheological Properties of Oil-in-Water Emulsions Containing Nonionic Emulsifier. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 6, p. 880-885, 2013.

ISAAC, V. L. B. et al. Determination of the Real Influence of the Addition of Four Thickening Agents in Creams Using Rheological Measurements. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 532-538, 2013.

KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A Modified Spectrophotometric Assay of Superoxide-Dismutase. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 21, n. 2, p. 130-132, 1984.

KANG, K. A. et al. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 3, p. 609-620, 2006.

KANNO, S. et al. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 2, p. 166-170, 2003.

KAVALCIOGLU, N. et al. Biological Activities of Bellis perennis Volatiles and Extracts. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 1, p. 147-150, 2010.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: An update picture. **General Pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.

LIN, J. Y.; TANG, C. Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 140-147, 2007.

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.

LORDÊLLO, D. M. S. **Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de Mentha piperita e estudo comparativo de atividades antioxidantes em espécies de mentas.** Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Lavras, Lavras 2015.

LUCIO, M. et al. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro. **Food Biophysics**, v. 4, n. 4, p. 312-320, 2009.

MAGALHÃES, B. H.; CAMARGO, M. F.; HIGUCHI, C. T. Indicação de uso de espécies vegetais para o tratamento da celulite com fins cosméticos. **Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 8, n. 3, p. 62-82 2013.

MAPRIC. 2014. Disponível em: <http://www.mapric.com.br/anexos/Boletim223_28052013-11h45.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2014. .

MENTER, J. M. et al. Effect of UV on the susceptibility of acid-soluble Skh-1 hairless mouse collagen to collagenase. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 19, n. 1, p. 28-34, 2003.

NADERI, G. A. et al. Antioxidant activity of three extracts of Morus nigra. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 5, p. 365-369, 2004.

NAKAMURA, Y. et al. Dihydrochalcones: Evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3309-3312, 2003.

NIKOLIC, K. M. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 774, n. 1-3, p. 95-105, 2006.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid-Substituted Phenolic-Compounds of Moraceous Plants. **Natural Product Reports**, v. 11, n. 2, p. 205-218, 1994.

OKONOGI, S. et al. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 839-846, 2007.

OU, T. T. et al. Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 15, p. 2740-2748, 2011.

PADILHA, M. M. et al. Pharmacobotanical study of the leaves of blackberry, *Morus nigra*, Moraceae. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 621-626, 2010.

PADILHA, M. M. et al. Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1496-1500, 2010.

PANNALA, A. S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001.

PAPANDREOU, M. A. et al. Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8762-8768, 2006.

PARK, E. et al. Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF-kappa B. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 178-186, 2013.

PEREZ-GREGORIO, M. R. et al. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **Lwt-Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1793-1801, 2011.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele**. São Paulo: Organização Andrei Editora LTDA, 1998.

PINTO, A. C. et al. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Quimica Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PRIETO, M. A.; VÁZQUEZ, J. A. In vitro determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their

synergistic and antagonistic effects. **Food Research International**, v. 62, p. 1183-1196, 2014.

PRIOR, R. L.; CAO, G. H. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 11-12, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

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

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, S. M. R. et al. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROMÃO, G. B. **ESTUDO IN VITRO DA AÇÃO DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Cordia verbenacea* DC. EM ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA.** Dissertação de Mestrado Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" -Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2016.

RUBY, K. et al. In-vitro antioxidant and hemorrhoidal potential of hydroethanolic leaf extracts of *Bergenia ciliata*, *Bergenia ligulata* and *Bergenia stracheyi* **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 5, n. 5, p. 34-46, 2015.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total e frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado Técnico (on line)**, v. 128, p. 1-4, 2007.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia.** Colégio Técnico Industrial de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, 2013.

SCOTT, M. D. et al. Erythrocyte Defense against Hydrogen-Peroxide - Preeminent Importance of Catalase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 43, n. 2, p. 153- 166, 2007.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-Dependent Protection against Oxidative Injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SHARMA, P. V.; PALIWAL, R.; SHARMA, S. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant potential of hydro-ethanolic extract of *Euphorbia neriifolia* Linn. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 124-132, 2011.

SILVA, E. M. **O uso de zooterápicos por comunidades dos cariris velho**. Trabalho de Conclusão de Curso Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, São João do Tigre -PB, 2014.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2011.

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

SOTO, M. L.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of Natural Phenolic from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, v. 2, n. 3, p. 259-276, 2015.

SOUZA, F. P.; CAMPOS, G. R.; PACKER, J. F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. - Acerola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 69-77, 2013.

TAINER, J. A. et al. Structure and Mechanism of Copper, Zinc Superoxide-Dismutase. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 284-287, 1983.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TUBARO, F. et al. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 7-8, p. 1228-1234, 1998.

VALDIVIA, A. et al. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 195-208, 2009.

VANACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, S. C. H. et al. Survey of herbal compounding pharmacies handled in Dourados-MS. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Blackberry (*Rubus* sp.): Extraction process optimization and determination of phenolic compounds antioxidants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.

VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

WHITEMAN, M. et al. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 4, p. 794-798, 2005.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173-1183, 2001.

WULF, H. C. et al. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v. 35, n. 3, p. 185-191, 2004.

YAAR, M. Mechanisms of aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1429-1432, 2002.

YAMAUCHI, M.; WOODLEY, D. T.; MECHANIC, G. L. Aging and Cross-Linking of Skin Collagen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 152, n. 2, p. 898-903, 1988.

YANG, C. F.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG(2) cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273-279, 1999.

ZGLICZYN.JM et al. Chloramines as Intermediates of Oxidation Reaction of Amino Acids by Myeloperoxidase. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 235, n. 3, p. 419-&, 1971.

ZHANG, Y. et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2004.