

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/08/2018.

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

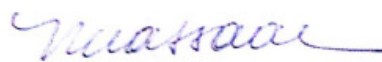
MARIA GABRIELA JOSÉ DE ALMEIDA CINCOTTO

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

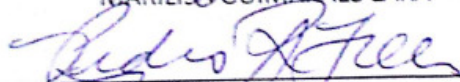
BANCA EXAMINADORA



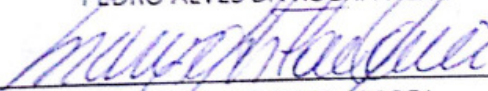
VERA LUCIA BORGES ISAAC



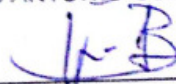
MARILISE GUIMARÃES LARA



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 ($O_2^{\cdot-}$)

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 ($OH^{\cdot}$)

O radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), 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 $OH^{\cdot}$ 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).

Analisando 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.

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 cosmeceuticos. **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 Mediciniais**, 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.