

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Bruna Santa Rosa da Silva

**Avaliação da segurança e eficácia *in vitro* do extrato hidroalcoólico liofilizado
da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*)**

Araraquara

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Bruna Santa Rosa da Silva

**Avaliação da segurança e eficácia *in vitro* do extrato hidroalcoólico liofilizado
da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara

2021

S696a

Silva, Bruna Santa Rosa da.
Avaliação da segurança e eficácia in vitro do extrato hidroalcólico
liofilizado da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) / Bruna Santa Rosa da
Silva. – Araraquara: [S.n.], 2021.
105 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. Jaboticaba. 2. Atividade antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Atividade
antimicrobiana. 5. Produção de colágeno. 6. Cicatrização. I. Isaac, Vera Lucia
Borges, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da segurança e eficácia *in vitro* do extrato hidroalcoólico liofilizado da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*)

AUTORA: BRUNA SANTA ROSA DA SILVA

ORIENTADORA: VERA LUCIA BORGES ISAAC

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARIA JOSÉ VIEIRA FONSECA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 25 de março de 2021

Dedicatória

A Deus, por sempre me orientar nas minhas tomadas de decisão.

*À minha mãe, Cida, pelo esforço e dedicação para
me guiar nesta caminhada, além de compreensão
em todos os momentos e por me ensinar a nunca
desistir dos meus sonhos.*

*Dedico este trabalho à minha avó materna, vó Nica,
“In Memoriam”, pois sem ela este trabalho e, muitos
dos meus sonhos, não se realizariam.*

*Ao Bruno, meu namorado, por ter
acompanhado cada passo desta nova
jornada, com todo amor e muita paciência.*

Agradecimentos

À Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos, correções e pela sua paciência. Por sua disposição em ajudar, pelo aprendizado e por ter compartilhado comigo todas as dificuldades desde meu primeiro ano na faculdade.

Às professoras Dr^a Regina Maria Barreto Cicarelli e Dr^a Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues por terem disponibilizado equipamentos e material de fundamental importância nesse trabalho.

Ao professor Dr. Marcos Antonio Corrêa pelas valiosas dicas.

À Eduarda Soler por me acompanhar e colaborar nos dias de experimento.

Ao Sítio do Belo pelo fornecimento das cascas da jabuticaba.

À GELITA, em especial, a Marcia Costola do Prado pela doação do colágeno Verisol®, muito importante para realização de alguns ensaios.

À técnica do laboratório de Cosmetologia, Ilza Yogui, por sempre estar disposta a ajudar durante o dia a dia no laboratório.

A todos os alunos do Laboratório de Cosmetologia pelos conhecimentos e prontidão em ajudar.

A todos os funcionários da faculdade sempre disponíveis.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“Tudo vem dos sonhos. Primeiro sonhamos, depois fazemos”.

Monteiro Lobato

Resumo

A busca pela diminuição dos danos causados pelo envelhecimento extrínseco, ou seja, aquele causado por agentes externos, como a radiação ultravioleta, tem sido alvo de estudo. Atualmente, consumidores buscam produtos que, além da função antienvelhecimento, sejam multifuncionais e que supram todas as suas necessidades. Novas moléculas, ativos, misturas e sinergias têm buscado satisfazer um mercado cada dia mais informado. Não só a redução do envelhecimento precoce, mas, também, a solução deste problema com o uso de ativos considerados naturais e pouco agressivos. Além disso, é sabido que a busca pela segurança e eficácia deixou de ser um luxo, para se tornar parte fundamental e conduzida por leis, como a RDC 07 de 2015, por exemplo. A jabuticaba possui estudos amplos na área alimentícia, e vem sendo estudada devido seu elevado valor nutritivo e composição rica, em cosmetologia. Sua aplicabilidade tem se mostrado assertiva. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a segurança e eficácia *in vitro* do uso do extrato da casca da jabuticaba, que poderá ser indicada como um novo ativo antienvelhecimento, antisséptico e multifuncional. Para isso, o trabalho foi realizado em fases: obtenção do extrato das cascas da jabuticaba e sua avaliação em parâmetros como solubilidade, varredura espectrofotométrica e quantificação de biomarcadores. Depois disso, foram avaliados o potencial de irritação cutânea e citotoxicidade *in vitro* (potencial de irritação epidérmica, dérmica e hepatotoxicidade). Assim, foi obtida uma faixa considerada segura de uso do extrato, sem causar danos às células da pele e fígado, caso os ativos do extrato penetre a barreira cutânea e adentrem na corrente sanguínea. Com valores seguros estabelecidos, foi avaliado o potencial de atividade antimicrobiana em microrganismos comensais e patogênicos, além da capacidade de indução da produção de colágeno e cicatrização em células HDFa. O extrato da casca da jabuticaba mostrou-se muito próspero para uso em fitocosméticos, atuando com vários efeitos benéficos, como elevada atividade antioxidante e elevada concentração de antocianinas, citotoxicidade com IC50 superiores a 6,0 mg/mL, capacidade antimicrobiana em todas as cepas testadas, além de efeito de indução na produção de colágeno *in vitro*.

Palavras-Chave: jabuticaba, atividade antioxidante, citotoxicidade, atividade antimicrobiana, produção de colágeno, cicatrização.

Abstract

The search for the reduction of damage caused by extrinsic aging, that is, this phenomenon by external agents, such as ultraviolet radiation, has been the subject of study. Currently, consumers are looking for products that, in addition to the anti-aging function, are multifunctional and meet all their needs. New molecules, assets, mixtures and synergies have sought to satisfy a market more and more. Not only the reduction of premature aging, but also the solution of this problem with the use of assets considered natural and not very aggressive. In addition, it is known that the search for safety and efficacy provided to be a luxury, to become a fundamental part and guided by laws, such as RDC 07 of 2015, for example. Jabuticaba has extensive studies in the food area, and has been studied due to its high nutritional value and rich composition, in cosmetology. Its applicability has to be declared assertive. This work has the objective of evaluating an in vitro safety and efficacy of the use of jabuticaba bark extract, which can be chosen as a new anti-aging, antiseptic and multifunctional active. For this, the work was carried out in phases: obtaining the extract of the jabuticaba bark and its evaluation in parameters such as solubility, spectrophotometric scanning and quantification of biomarkers. After that, the skin irritation potential and in vitro cytotoxicity (potential for epidermal, dermal irritation and hepatotoxicity) were taken. Thus, it was obtained a band considered safe to use the extract, without causing damage to the skin and liver cells, if the extract's assets penetrate the skin barrier and enter the bloodstream. With safe values, the potential for antimicrobial activity in commensal and pathogenic microorganisms was evaluated, in addition to the ability to induce collagen production and healing in HDFa cells. The extract of the bark of the jabuticaba proved to be very successful for use in phytocosmetics, acting with several beneficial effects, such as high antioxidant activity and high concentration of anthocyanins, cytotoxicity with IC₅₀ above 6.0 mg / mL, antimicrobial capacity in all strains tested, in addition to the induction effect on collagen production in vitro.

Keywords: jabuticaba, antioxidante activity, cytotoxicity, antimicrobial activity, collagen production, healing.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Layout da análise por varredura espectrofotométrica, em placa de 96 poços.....página 33
- Figura 2.** Cascas da jabuticaba secas e em processo de maceração.....página 44
- Figura 3.** Extrato da casca da jabuticaba liofilizado.....página 44
- Figura 4.** Análise da solubilidade do extrato liofilizado da casca de jabuticaba com diferentes tipos de solventes.....página 46
- Figura 5.** Placa de 96 poços contendo a diluição seriada, do extrato liofilizado da casca da jabuticaba, para análise espectrofotométrica de varredura (UVA e UVB).....página 47
- Figura 6.** Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba nas concentrações 100 – 12,5 mg/mL em diluição seriada.....página 48
- Figura 7.** Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba nas concentrações 6,25 – 0,78 mg/mL em diluição seriada.....página 49
- Figura 8.** Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba nas concentrações 0,39 – 0,05 mg/mL em diluição seriada.....página 50
- Figura 9.** Espectro de varredura do extrato de jabuticaba (100 mg/mL).....página 51
- Figura 10.** Curva analítica do radical DPPH°.....página 55
- Figura 11.** Absorbâncias estabilizadas do extrato em conjunto com o radical DPPH°.....página 56
- Figura 12.** Curva analítica do Trolox.....página 57
- Figura 13.** Diluição seriada do extrato de jabuticaba que reagiu com o radical ABTS^{o+}.....página 58
- Figura 14.** Curva de reação das diluições do extrato liofilizado da casca de jabuticaba com o radical ABTS^{o+}.....página 58
- Figura 15.** Viabilidade celular da linhagem HepG2 em diferentes concentrações de extrato da casca da jabuticaba utilizando o corante MTT.....página 64
- Figura 16.** Viabilidade celular da linhagem HepG2 em diferentes concentrações de extrato da casca da jabuticaba utilizando o corante NRU.....página 66

Figura 17. Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana das cepas bacterianas.....	página 70
Figura 18. Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana da <i>C. albicans</i>	página 71
Figura 19. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas <i>E. coli</i>	página 73
Figura 20. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas <i>P. auruginosa</i>	página 74
Figura 21. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas <i>S. aureus</i>	página 76
Figura 22. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas <i>S. epidermidis</i>	página 77
Figura 23. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas <i>C. albicans</i>	página 78
Figura 24. Porcentagem de produção de colágeno utilizando diferentes concentrações do extrato da casca da jabuticaba comparando com o controle negativo (CN).....	página 80
Figura 25. Concentração de colágeno produzido (mg/mL) utilizando diferentes concentrações do extrato da casca da jabuticaba comparando com o controle negativo (CN).....	página 81
Figura 26. Avaliação do processo de cicatrização pela largura do arranhão de diferentes concentrações de tratamento em função do tempo.....	página 83
Figura 27. Porcentagem de células vivas em relação à concentração dos tratamentos utilizados no ensaio de avaliação do potencial de cicatrização utilizando células HDFa.....	página 84
Figura 28. Perfil de cicatrização do controle negativo (A – tempo 0 hora e B – tempo 48 horas) e do extrato da casca da jabuticaba com concentração de 2,5 mg/mL (C- tempo 0 hora e D – tempo 48 horas).....	página 85

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Avaliação da solubilidade do extrato liofilizado de jabuticaba.....página 45
- Tabela 2.** Doseamento de AA em solução a 1% (massa teórica= 0,10007g).....página 53
- Tabela 3.** Doseamento de AA presente na solução contendo extrato da casca da jabuticaba liofilizado.....página 54
- Tabela 4.** Avaliação do potencial de irritação cutânea (Concentração do extrato X Transmitância).....página 61
- Tabela 5.** Análise comparativa de IC 50 das linhagens celulares e corantes (valores expressos em mg/mL).....página 68

Lista de Quadros

- Quadro 1.** Fases do processo de cicatrização.....página 25
- Quadro 2.** Descrição da solubilidade de acordo com a quantidade de partes de solvente adicionados à amostra.....página 32
- Quadro 3.** Tipos de solventes avaliados quanto ao parâmetro solubilidade.....página 32

Lista de Abreviaturas

AA – ácido ascórbico

ATP – adenosina trifosfato

°C – graus Celsius

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERO – Espécies reativas de oxigênio

g – grama

GL – Gay Lussac

HaCat – queratinócitos humanos imortalizados

HDFa – fibroblastos da derme humana

HepG2 – células de hepatoma humano

IC 50 – concentração inibitória de 50%

KI – iodeto de potássio

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

N – normalidade

nm – nanometro

pH – potencial hidrogeniônico

RNA – ácido ribonucleico

SOD – superóxido desmutase

UV – ultravioleta

UVA – ultravioleta A

UVB – ultravioleta B

μL – microlitro

μM – micromolar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Aspectos mercadológicos da Indústria Cosmética	19
2.2. Jabuticaba	20
2.3. Pele	21
2.4. Princípios fisiológicos e funções da pele	23
2.4.1. Função barreira da pele	23
2.4.2. Suor e sebo	23
2.4.3. Proteção UV	24
2.4.4. Cicatrização	24
2.4.5. Envelhecimento da pele	26
2.5. Avaliação da segurança em cosméticos	28
2.6. Atividade antimicrobiana em cosméticos	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Obtenção do extrato	31
4.2. Análise de solubilidade	31
4.3. Avaliação do espectro de absorção ultravioleta (UV) – Varredura	32
4.4. Análise de marcadores	34
4.4.1. Cianidina-3-glicosídeo	34
4.4.2. Doseamento do ácido ascórbico (Vitamina C)	34
4.5. Determinação da atividade antioxidante total	35
4.5.1. Captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH ^o)	35
4.5.2. Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS ^{o+})	35
4.6. Irritação cutânea	36
4.7. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	36

4.7.1. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT).....	36
4.7.2. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante Vermelho Neutro (Neutral Red – NRU).....	38
4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	39
4.8.1. Preparo das soluções estoque antimicrobianas.....	39
4.8.2. Preparo da solução estoque do extrato de jabuticaba.....	39
4.8.3. Preparo das suspensões bacterianas e de leveduras.....	39
4.8.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	40
4.8.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	41
4.9. Análise da produção de colágeno em células HDFa.....	41
5.0. Avaliação do potencial de cicatrização em células HDFa.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Obtenção do extrato.....	44
5.2. Análise de solubilidade.....	45
5.3. Avaliação do espectro de absorção ultravioleta (UV) – Varredura.....	46
5.4. Análise de marcadores.....	52
5.4.1. Cianidina-3-glicosídeo.....	52
5.4.2. Doseamento do ácido ascórbico (Vitamina C).....	53
5.5. Determinação da atividade antioxidante total.....	54
5.5.1. Captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH°).....	54
5.5.2. Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS°+).....	57
5.5.3. Diferentes metodologias para quantificação da atividade antioxidante.....	59
5.6. Irritação cutânea.....	60
5.7. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	62
5.7.1. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT).....	62
5.7.1.1. Em células HepG2.....	63
5.7.1.2. Em células HaCat.....	64

5.7.1.3.	Em células HDFa.....	65
5.7.2.	Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante Vermelho Neutral (Neutral Red – NRU).....	65
5.7.2.1.	Em células HepG2.....	65
5.7.2.2.	Em células HaCat.....	66
5.7.2.3.	Em células HDFa.....	67
5.7.3.	Comparação entre corantes e linhagens celulares.....	67
5.8.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	69
5.8.1.	<i>Escherichia coli</i>	72
5.8.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
5.8.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	75
5.8.4.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	76
5.8.5.	<i>Candida albicans</i>	78
5.9.	Análise da produção de colágeno em células HDFa.....	79
5.10.	Avaliação do potencial de cicatrização em células HDFa.....	81
6.	CONCLUSÃO.....	87
7.	REFERÊNCIAS.....	88
	Apêndices.....	103

1. INTRODUÇÃO

O setor cosmético está em constante crescimento, mesmo diante de toda crise. Possui elevado poder de reinventar-se, adequando-se às necessidades transitórias dos consumidores. Nos dias atuais, vemos que, praticamente, toda a população, se não, de fato, toda ela, utiliza algum tipo de cosmético, diariamente, o que impulsiona a Indústria Cosmética a sempre elaborar pesquisas e aumentar seu portfólio de vendas.

Os consumidores buscam por produtos de origem mais natural possível, com os selos: livre de crueldade animal, veganos, produtos naturais, ativos “verdes”, ecológicos, entre outros. Assim, pesquisa por novos ativos de origem natural e também, oriundo da biodiversidade brasileira, cresce. Com o advento das redes sociais, ocorreu um “*boom*” de lançamentos de novos cosméticos, muitas vezes, apenas repaginados, mantendo as funções. Há sempre, o contato com alguma propaganda ou publicidade sobre algo, que impulsiona a comprar o produto da moda.

Entretanto, ao contrário do que é imaginado, cosméticos podem apresentar reações adversas ao usuário, resultantes do uso inadequado ou de características intrínsecas. Mesmo os cosméticos com ativos “naturais” ou também chamados fitocosméticos. O risco cosmético avalia a probabilidade de ocorrência de irritação, sensibilização, sensações de desconforto e até efeito sistêmico através da passagem, de algum componente da formulação, para a corrente sanguínea. A segurança do cosmético é de inteira responsabilidade do responsável que o coloca no mercado. Para tal segurança, são necessários: formular produtos com matérias-primas reconhecidamente seguras, avaliar a segurança dos ativos e dos produtos acabados, seguir a legislação vigente para a fabricação e o controle, além de fornecer informações ao consumidor sobre o uso adequado, entre outros parâmetros.

Por muito tempo, o modelo animal foi utilizado para a realização de testes visando à segurança de produtos cosméticos. Foi introduzido o conceito de substituição e/ou redução do uso de animais por ensaios *in vitro*, o que levou ao desenvolvimento de alternativas *in vitro*. A dificuldade encontrada nestes métodos deriva da necessidade de vários ensaios para poder oferecer, com propriedade

científica, resultados que se assemelham aos ensaios *in vivo*. Dentre os ensaios biológicos aplicados a cosméticos, podem ser destacados os de avaliação da irritação ocular e cutânea, além da toxicidade, em cultura celular. Com estes ensaios, é possível avaliar o índice ou relação de segurança esperado para o ativo.

Outro ponto importante da pesquisa por novos ativos cosméticos é a busca por multibenefícios. Neste ponto, os ativos naturais se destacam. Normalmente, ativos naturais podem apresentar vários benefícios, sendo decorrentes da sua composição rica e variada; porém, ativos de origem natural sofrem alterações de composição conforme intemperanças do clima, tipo de solo, temperatura, tempo de colheita, entre outros fatores, que merecem atenção por parte do pesquisador.

Observando estes aspectos, o enfoque deste trabalho foi avaliar os benefícios cosméticos que o extrato da casca da jabuticaba possui, sendo abordada a extração de ativos de cascas obtidas de resíduos industriais, avaliação de marcadores fitoquímicos padrões para a espécie, avaliação da citotoxicidade, atividade antimicrobiana, avaliação da produção de colágeno, entre outros ensaios *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos mercadológicos da Indústria Cosmética

O setor de cosméticos tem a necessidade de sempre apresentar novos produtos, sejam nas formulações, ativos, embalagens ou formas de aplicação. Este setor, muito rentável no Brasil, gera empregos, variando desde a mão de obra básica à especializada, sendo o 2º setor que mais investe em inovação e o 1º setor que mais investe em comunicação. A pesquisa aplicada neste segmento é feita de forma constante, tanto em laboratórios privados, quanto com parcerias em centros de pesquisa; entretanto, o panorama de exportações ainda é modesto, perto dos valores de importações, tendo uma diferença de quase 9% entre estes parâmetros (ABIHPEC, 2018).

A indústria cosmética, mesmo em um país em crise, cresce em torno de 10% ao ano; porém, os brasileiros ainda gastam, em média, 1,5% de seu orçamento em cosméticos. O alto crescimento do consumo de cosméticos era exemplificado pelo aumento da inserção da mulher no mercado e o melhor atendimento das necessidades desejadas pelo consumidor. Hoje, tem-se que evidenciar a influência do estresse e cansaço na busca por uma vida mais saudável que gerou uma alavanca no setor de Microempreendedores Individuais (MEI) no ramo da beleza, estética e saúde. Aumentou, também, a profissionalização de centros de estética, salões de beleza e artigos relacionados ao mundo *fitness*, aumentando, assim, o consumo e gerando mais oportunidades. O aumento da procura por cosméticos pelo público masculino e a fluidez de gênero nos cosméticos abrange, ainda mais, públicos-alvo que vêm se destacando nos últimos anos. A ampliação de domínios digitais, que exerce influência em nossa rotina, buscando sempre a personalização e praticidade vem, também, criando novas experiências de *Marketing* nos nichos de cuidados com a pele, cuidados com os cabelos e sustentabilidade (ABIHPEC, 2018).

Este mercado vantajoso obteve um aumento de pesquisas e lançamento de produtos com o rótulo “verde”; ou seja, oriundos da biodiversidade e, também, contendo ativos naturais, que cresce a uma taxa de quase 25%, enquanto que os produtos com base sintética crescem em torno de 10% (ABIHPEC, 2018). Este crescimento vai de encontro com o movimento atual da população que almeja cada dia mais, envelhecer com saúde, bem-estar e de maneira mais natural possível.

Com isso, o acesso a informações torna consumidores mais atentos ao consumo de seus produtos. Há projeções que atestam que o consumo por cosméticos contendo ativos mais naturais e oriundos da biodiversidade promoverá um remodelamento da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ZUCCO *et al.*, 2020).

2.2. Jabuticaba

A jabuticabeira é uma planta frutífera da biodiversidade brasileira. Produzem jabuticabas, frutos circulares, com coloração roxa escura quase preta, de uma a quatro sementes. Sua casca tem gosto adstringente, enquanto a polpa, muito doce. É encontrada nos estados do Sul e Sudeste, predominantemente. Pertence à família Myrtaceae e está dividida em nove espécies, sendo uma considerada extinta, cinco em sítios de pesquisa e três em cultivo. Estas últimas são: *Plinia trunciflora* (Berg) Mattos (jabuticaba-de-cabinho); *Plinia cauliflora* (DC.) Berg (jabuticaba paulista, ponhema ou assu) e *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg (jabuticaba sabará), a mais conhecida e cultivada no país, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais, que possuem alguns pomares comerciais. Foi primeiramente classificada como *Myrciaria* em 1985 e, depois, como *Plinia*, sendo, hoje em dia, considerados sinônimos (CITADIN *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2018).

As três espécies de jabuticaba cultivadas no Brasil apresentam características muito semelhantes, o que leva a certa dificuldade de identificação botânica. Sua alta taxa de perecibilidade têm sido um grande desafio de cunho industrial. A jabuticaba tem sido vendida *in natura*, em doces, como geleias e sorvetes; bebida, como licores e vinhos; farinha da casca, entre outras (DONADIO, 2000). Na medicina popular, é utilizada para tratar diarreia, distúrbios no trato geniturinário, gripe, dor de garganta, labirintite, entre outras doenças (BAILÃO *et al.*, 2015; CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI *et al.*, 2018).

A jabuticaba é rica em compostos bioativos, macronutrientes e micronutrientes. O fruto é rico em vitamina C, tocoferol, antocianinas, sendo a principal e em maior quantidade, cianidina-3-glicosídeo. Também apresenta grande quantidade de compostos fenólicos, flavonoides e taninos, entre eles, quercetina, ácido gálico e ácido elágico. Possui altos valores de carboidratos (frutose, sacarose),

fibras solúveis e insolúveis, minerais (potássio, magnésio, fosforo, cálcio) e carotenoides (ALASALVAR; SHAHIDI *et al.*, 2018; BARROS *et al.*, 2019; JUNIOR, DE SOUZA; DOS REIS, *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro* apontam para sua capacidade antimicrobiana, antiproliferativa e antioxidante, enquanto estudos em cobaias animal apontam para aumento da motilidade gastrointestinal, atividade antimicrobiana, efeitos positivos cardiovasculares e na redução do perfil glicêmico da diabetes (BARROS *et al.*, 2019; JUNIOR, DE SOUZA; DOS REIS *et al.*, 2019).

2.3. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. Tem a função de proteger contra agentes nocivos, como: microrganismos, radiação ultravioleta (UV), agentes alergênicos e irritantes. É dividida em duas camadas: epiderme e derme (WALTER *et al.*, 2010; HALL, 2017; LIN *et al.*, 2018).

A epiderme é formada por tecido epitelial do tipo estratificado pavimentoso queratinizado com espessura variável entre 0,07 mm a 1,6 mm. Não possui irrigação sanguínea, dependendo da nutrição da derme. O tipo celular mais abundante na epiderme é o queratinócito, responsável pela constante renovação da pele. Outros tipos celulares presentes na epiderme são: as células de Langerhans, pertencentes ao sistema imunológico; células de Merkel, que funcionam como receptores táteis; melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, pigmento responsável pela proteção do DNA nos núcleos celulares, além de dar cor à pele. A epiderme é subdividida em até cinco partes: camadas córnea, granulosa, espinhosa, basal e lúcida, esta última mais evidente nas palmas das mãos e planta dos pés. O ciclo de renovação ou mitótico da pele dura, em média, 28 dias (WALTER *et al.*, 2010; HALL, 2017).

A camada córnea corresponde à camada mais superficial da pele. Suas células são as mais diferenciadas, sendo achatadas e anucleadas. Nesta camada, os queratinócitos estão maturados e completam o processo de queratinização, descamando com frequência. Esta camada desempenha funções de barreira protetora, prevenindo a passagem de água e/ou outras substâncias. Em seguida,

temos a camada granulosa, formada por algumas fileiras de células achatadas, nucleadas e com o citoplasma repleto de grânulos basófilos de querato-hialina. Esses grânulos são convertidos em filagrina, uma proteína rica em histidina, que confere resistência a esta camada. Seguidamente, temos a camada espinhosa, que representa a camada mais espessa da epiderme. Nesta camada, os queratinócitos passam por diversas transformações morfológicas, moleculares e histoquímica, tendo a aparência de espinhos. A camada basal é a camada mais interna da epiderme. Essa camada dá origem ao estrato germinativo, possuindo dois tipos celulares, as células germinativas e os melanócitos (WALTER *et al.*, 2010; HALL, 2017; LIN *et al.*, 2018).

A epiderme e a derme são unidas pela junção dermoepidérmica, na qual a epiderme penetra na derme pelas cristas epidérmicas e a derme, pelas papilas dérmicas. Essa junção favorece a aderência e trocas metabólicas necessárias (WALTER *et al.*, 2010; HALL, 2017; LIN *et al.*, 2018).

A derme é formada por tecido conjuntivo propriamente dito, sendo constituída, principalmente, por fibroblastos (responsáveis pela produção de colágeno, elastina, componentes não fibrilares, glicoproteínas, proteoglicanas, entre outros), enzimas, matriz extracelular, células de defesa (macrófagos, linfócitos, entre outros.), vasos sanguíneos e linfáticos, estruturas nervosas e sensoriais e musculatura lisa. Além disso, a derme é subdividida em duas partes: a camada superficial, também chamada de papilar e a camada profunda ou reticular. A derme papilar é formada por tecido conjuntivo propriamente dito do tipo frouxo. Possui, em maior quantidade, matriz extracelular e, em menor, colágeno e elastina. Já a derme reticular, é a maior camada da derme, constituída de tecido conjuntivo propriamente dito do tipo denso não modelado, sendo rica em fibras de colágeno e elastina (HALL, 2017; LIN *et al.*, 2018).

O colágeno é uma glicoproteína, formada por glicina, prolina e hidroxiprolina. É a principal e mais abundante proteína do tecido conjuntivo, sendo subdividida em mais de 20 tipos. A pele possui os tipos I, III, IV e VII, sendo I e III os mais abundantes. A elastina confere duas funções de extrema importância à pele: elasticidade e compressibilidade. Outro componente importante da pele é a substância fundamental amorfa, responsável por promover resistência às forças de

compressão. É um complexo viscoso, altamente hidrofílico, constituído por glicosaminoglicanas, proteoglicanas, glicoproteínas, ácido hialurônico entre outros. Também possui tixotropia, ou seja, capacidade de passar do estado líquido para o gel e vice-versa (WALTER *et al.*, 2010; HALL, 2017; LIN *et al.*, 2018).

2.4. Princípios fisiológicos e funções da pele

2.4.1. Função barreira da pele

A principal função da pele é a proteção. Para isso, a pele forma uma barreira contra agentes externos, sendo impermeabilizada por uma combinação de lipídeos, água e sais. Alguns desses lipídeos são produzidos na camada granulosa ou secretados na forma de sebo pelas glândulas sebáceas. Outra função dessa barreira é a retenção de água, evitando o ressecamento da pele, pelo fator de hidratação natural (*Natural Moisturizing Factor – NMF*), que é constituído por aminoácidos, ácido láctico, ácidos orgânicos, peptídeos, açúcares, ureia, entre outros (HALL, 2017).

2.4.2. Suor e sebo

As glândulas sudoríparas e sebáceas são de grande importância na conservação da temperatura corpórea e na manutenção do estrato córneo. A secreção sudorípara ocorre por dois tipos de glândulas: a écrina, que produz o suor inodoro e a apócrina, que produz o suor levemente viscoso e rico em lipídeos. A secreção das glândulas sebáceas é o sebo, responsável pela lubrificação, garantindo a maciez da pele. A taxa de secreção, seja suor ou sebo, varia de indivíduo para indivíduo. O pH ácido da pele (em torno de 5,5) é resultado da mistura de substâncias, da camada córnea, suor e sebo. A variação do pH pode levar de irritação cutânea à descamação severa (WALTER *et al.*, 2010; HALL, 2017).

2.4.3. Proteção UV

Os melanócitos são células dendríticas que produzem a melanina. Existem dois tipos de melanina, a eumelanina, que confere a coloração castanha e a feomelanina, coloração avermelhado-amarelada. Este pigmento endógeno é capaz de absorver os raios UVA e UVB e transformar em calor, escurecendo a pele como meio de proteção. A melanina é produzida a partir da hidroxilação da tirosina nos melanossomas, que varia conforme a etnia e quantidade de exposição solar. A exposição contínua da pele à radiação UV tem efeito cumulativo e culmina na formação de hiperpigmentações (melanose solares, efélides, entre outros.) até o câncer de pele. Há outros mecanismos de proteção contra a radiação UV, como, por exemplo: espessamento da epiderme para absorver melhor os raios UVB e o ácido urocânico, presente no suor, que possui uma alta, porém transitória, absorção da radiação UVB (WALTER *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2018).

Além da proteção contra os raios UV que a pele oferece, ainda são necessários outros métodos de proteção solar. O meio mais comum de proteção solar é o uso de protetores solares. Além da utilização de filtros solares físicos e químicos em formulações cosméticas diversas, é possível adicionar ativos que potencializem a proteção solar. As plantas produzem metabólitos secundários capazes de absorver a radiação solar e reduzir o dano dos radicais livres. Alguns metabólitos com essa capacidade são os compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides. O uso de extratos de plantas tem o potencial sinérgico em protetores solares, auxiliando na fotoproteção e reduzindo o estresse oxidativos nas células devido à radiação (PETRUK *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019).

2.4.4. Cicatrização

A cicatrização é a capacidade regenerativa da pele. É uma resposta ordenada de reações fisiológicas e bioquímicas que interagem para a reestruturação do tecido. Há diversos fatores que influenciam uma efetiva cicatrização, como tipo de ferida, hidratação da pele, fatores de inflamação, predisposição genética a hipertrofias, entre outros (HALL, 2017). As fases do processo cicatricial estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Fases do processo de cicatrização. Fonte: adaptado de BORGES & SCORZA, 2016.

FASE DE CICATRIZAÇÃO	TEMPO DE DURAÇÃO	RESPOSTAS DO ORGANISMO
Coagulação	Nos primeiros 5 a 10 minutos após a lesão.	- Vasoconstrição. - Agregação plaquetária. - Tamponamento dos vasos seccionados.
Inflamação	Tem início com a coagulação e perdura por três dias.	- Liberação de mediadores bioquímicos: histamina, serotonina, leucotoxina, bradicinina. - Liberação de prostaglandinas: estimula mitoses, quimiotaxia do sistema imunológico para limpeza local. - Estimula fatores de crescimento: Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF); Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF); Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF); Fator de Crescimento Transformador Alfa (TGF-α).
Proliferação	Tem início no 3º dia após a injúria e perdura por até três semanas.	- Neovascularização ou angiogênese - Fibroplastia: fibroblastos produzem nova matriz extracelular, colágeno, elastina, substância fundamental. - Reepitelização: migração dos queratinócitos não danificados para as bordas da ferida.
Remodelamento	Concomitante à fase de proliferação.	- Contração da ferida de forma centrípeta, ou seja, de fora para dentro. - Maturação dos elementos celulares. - Estruturação da matriz extracelular.

Quando a pele não se regenera de forma eficaz, dá origem a cicatrizes inestéticas. São exemplos o quelóide, cicatriz hipertrófica e atrófica. A evolução normal das fases de cicatrização e um organismo saudável determinam o processo cicatricial ser bem sucedidos ou não. Fatores como: excesso de tensão, infecções, rejeições, más condições fisiológicas, patologias associadas, má condição nutricional, entre outros fatores, interferem na má qualidade da cicatrização (HALL, 2017).

Na medicina tradicional, por séculos foram utilizadas plantas para auxiliar no processo cicatricial. No Brasil, a babosa e calêndula são frequentemente estudadas por acelerar o processo cicatricial de forma (LORDANI *et al.*, 2018). Como é observado, o processo cicatricial é de extrema importância na proteção da pele, ou seja, para manter funções fisiológicas da pele e, também, na manutenção estética. A busca por substâncias que modulam a cicatrização de forma rápida e eficaz torna-se importante.

2.4.5. Envelhecimento da pele

O envelhecimento da pele é categorizado em: envelhecimento intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco é cronológico e inevitável. É caracterizado pela perda gradual da elasticidade, refinamento e ressecamento da pele. Há formação de linhas que começam a aparecer pela repetição de expressões e, com o tempo, se fixam como rugas na pele. O envelhecimento extrínseco é caracterizado pela exposição constante da pele aos fatores externos, como, tabagismo, exposição ao sol, má alimentação, poluição, entre outros. Resultando em rugas grosseiras, perda severa de elasticidade, hiperpigmentações e textura áspera (ZHANG; DUAN, 2018).

Entretanto, não ocorrem apenas às mudanças fenotípicas na pele, ocorrem também, alterações estruturais e funcionais, como as mudanças nos componentes da matriz extracelular, fibroblastos reduzem a produção de colágeno, elastina e proteoglicanas que são responsáveis pela resistência mecânica, elasticidade e hidratação da pele. A exposição constante à radiação UV, tabagismo e pesticidas, por exemplo, pode causar mudanças genotípicas e metabólicas (AHMED, 2020).

Somente em 1969, foi proposto que a exposição à radiação solar é o principal contribuinte para o envelhecimento extrínseco. A pele exposta ao sol espessa devido à falha na degradação das células mais superficiais da pele, os corneócitos. A expressão do marcador de diferenciação dos queratinócitos é reduzida. A expressão de proteína- β 1-integrina nas paredes celulares, considerada uma “célula-tronco” das células da pele que é responsável pela diferenciação dos queratinócitos é reduzida. A produção de colágeno e elastinas também é reduzida e, ainda, são produzidas mais enzimas de degradação dessas proteínas (ZHANG; DUAN, 2018; AHMED, 2020; GU *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo também é um dos maiores contribuintes para a aceleração do envelhecimento intrínseco e o fotoenvelhecimento. O estresse oxidativo é causado pelas reações indisciplinadas das espécies reativas de oxigênio (ERO's) com o organismo. As ERO's são naturalmente produzidas no organismo, geralmente, nas reações de produção de adenosina-trifosfato (ATP), porém também possuímos em nosso organismo mecanismo de redução do dano oxidativo, por exemplo, reações enzimáticas da superóxido-dismutase (SOD). O estresse oxidativo pode causar dano no DNA, encurtamento de telômeros, desregulação dos microRNA's mutações genéticas, entre outros danos (GU *et al.*, 2020).

Os antioxidantes são moléculas utilizadas para neutralizar as reações com as ERO's, entre elas podemos citar a vitamina C, vitamina E, coenzima Q-10 e os compostos fenólicos (GU *et al.*, 2020). Além de uma alimentação rica em antioxidantes, a suplementação via oral desses compostos é muito útil na redução dos danos oxidativos, assim, reduzindo os danos causados pelo envelhecimento do corpo como um todo, mas principalmente os sinais visíveis na pele (LERI *et al.*, 2020).

Outro meio de retardar os sinais do envelhecimento precoce na pele é utilizando cosméticos com ativos que tenham a função de antienvelhecimento. Logo, a busca por ativos que tenham atividade antioxidante e que estimulem a produção de colágeno, por exemplo, são relevantes, visto que são mecanismos de combate aos sinais do envelhecimento.

2.5. Avaliação da segurança em cosméticos (BRASIL, 2012)

Para o cosmético ir para o mercado deve-se passar por criteriosos ensaios a fim de avaliar a segurança e, em alguns casos, a eficácia. Uma empresa responsável, seja a fabricante, importadora ou o responsável pela colocação do cosmético no mercado, devem apresentar dados comprobatórios sobre os parâmetros de segurança, com o intuito de reduzir danos do cosmético ao usuário. No Brasil, há poucas décadas atrás a avaliação da segurança era testada em cobaias animais.

Para os ensaios para segurança *in vivo* são utilizados os modelos de toxicidade aguda oral, irritação/corrosividade ocular, irritação/corrosividade cutânea, avaliação da irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, teste de irritação das mucosas oral e vaginal/peniana, teste de comedogenicidade, entre outros.

Em 1959, Russell e Burch definiram o conceito, em seu livro (Princípios da técnica experimental humana), de refinamento, redução e substituição que levantam estratégias de pesquisas mais racionais quanto ao uso de animais. Nos anos 80 iniciou o movimento de desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para cosméticos. No Brasil, mais precisamente no Estado de São Paulo, é proibido realizar testes em animais para avaliar segurança e eficácia em cosméticos atualmente.

Para isso, são utilizados os ensaios para segurança cosmética *in vitro*. Entre eles se destacam: avaliação do potencial de irritação ocular pelo HET-CAM (Teste da membrana corioalantóide do ovo) e BCOP (Permeabilidade e opacidade da córnea bovina), citotoxicidade pelo método do corante vermelho neutro (NRU), citotoxicidade utilizando o corante MTT, avaliação do potencial fototóxico, avaliação da permeação e retenção cutânea utilizando pele da orelha do porco ou pele humana proveniente de cirurgias plásticas, entre outros.

O uso de metodologias *in vitro* vem sendo refinadas e a união de diversas técnicas norteiam os parâmetros de segurança de matérias primas, ativos e formulações.

2.6. Atividade antimicrobiana em cosméticos

O mercado consumidor vem se tornando muito exigente e mais atento a composição dos cosméticos utilizados. Buscam por composições mais seguras, eficazes e os mais naturais possíveis. O que se torna uma dificuldade para a indústria, principalmente na conservação dos cosméticos (PARKER; LUZ, 2007).

Os conservantes utilizados atualmente são sintéticos, como é o caso dos parabenos, e já não estão sendo bem vistos pelos consumidores, que reduzem o consumo de determinados cosméticos devido à presença destes conservantes, mesmo não apresentando uma elevada toxicidade em testes *in vitro* (CORRÊA, 2018).

Como alternativa aos conservantes sintéticos, tem-se pesquisado compostos oriundos dos metabólitos secundários de plantas, em ênfase aos compostos fenólicos que apresentam características antimicrobainas (SAKKAS *et al.*, 2017).

O uso de metabólitos de plantas como alternativa para conservar as formulações cosméticas é muito promissor, visto que possuem atividade antimicrobiana relevante e é bem aceito pelo mercado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança e eficácia *in vitro* do extrato da casca da jabuticaba, para uma possível empregabilidade como novo ativo cosmético.

3.2. Objetivos Específicos

- Obtenção do extrato da casca da jabuticaba a partir de resíduos de descarte industrial.
- Avaliar a solubilidade do extrato.
- Avaliar o espectro de absorção UV do extrato.
- Avaliar e quantificar os marcadores fitoquímicos do extrato.
- Avaliar a atividade antioxidante total do extrato utilizando o radical DPPH°.
- Avaliar a atividade antioxidante total do extrato utilizando o radical ABTS^{o+}.
- Avaliar o potencial de irritação cutânea do extrato.
- Avaliar a hepatotoxicidade em células HepG2 *in vitro* do extrato.
- Avaliar a citotoxicidade cutânea em células HaCat *in vitro* do extrato.
- Avaliar a dermatotoxicidade em células HDFa *in vitro* do extrato.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato.
- Avaliar a produção de colágeno em células HDFa.
- Avaliar o potencial de cicatrização em células HDFa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do Extrato

Foram adquiridos cinco quilos de resíduos, cascas e sementes, de jabuticaba Sabará congeladas, do Sítio do Belo (23° 27'53.94" SUL 45° 42'31.88" OESTE), localizado em Paraibuna, no estado de São Paulo, Brasil. As cascas foram selecionadas e separadas das sementes e colocadas para descongelar, em temperatura ambiente, sobre papel absorvente, por 24 horas. Para o extrato, foi utilizado álcool 70° GL, como solvente extrator na proporção 1:20 (m/v). A amostra foi macerada com o solvente, que foi deixado em contato com as cascas, por 24 horas. Foram realizadas quatro extrações, com duração de 24 horas cada, a fim de extrair o máximo de compostos-alvo do estudo. Em seguida, foi retirado o solvente por rotaevaporação (Marconi – MA120) e, logo após, liofilizado. O extrato foi mantido sob refrigeração até sua liofilização e, depois, sob congelamento, a 4°C, até seu uso.

4.2. Análise de Solubilidade

Para a análise solubilidade do extrato liofilizado de jabuticaba foram utilizados 10 mg do extrato e adicionados de 100 µL do solvente e repetindo a adição do solvente a fim de avaliar a solubilidade segundo os parâmetros da Farmacopeia Brasileira, 2010. A cada adição da quantidade de solvente estipulada, foi considerada uma parte seguindo a relação do Quadro 2. Foram utilizados os solventes presentes no Quadro 3.

Quadro 2. Descrição da solubilidade de acordo com a quantidade de partes de solvente adicionadas à amostra.

Solvente	Número de partes
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Acima de 10000 partes

Fonte: adaptado de Farmacopeia Brasileira, 2010.

Quadro 3. Tipos de solventes avaliados quanto ao parâmetro solubilidade.

Solvente	INCI name
Água destilada	Aqua
Etanol Absoluto	Alcohol
Glicerina	Glycerin
Miristato de Isopropila	Isopropyl Myristate
Propilenoglicol	Propylene Glycol

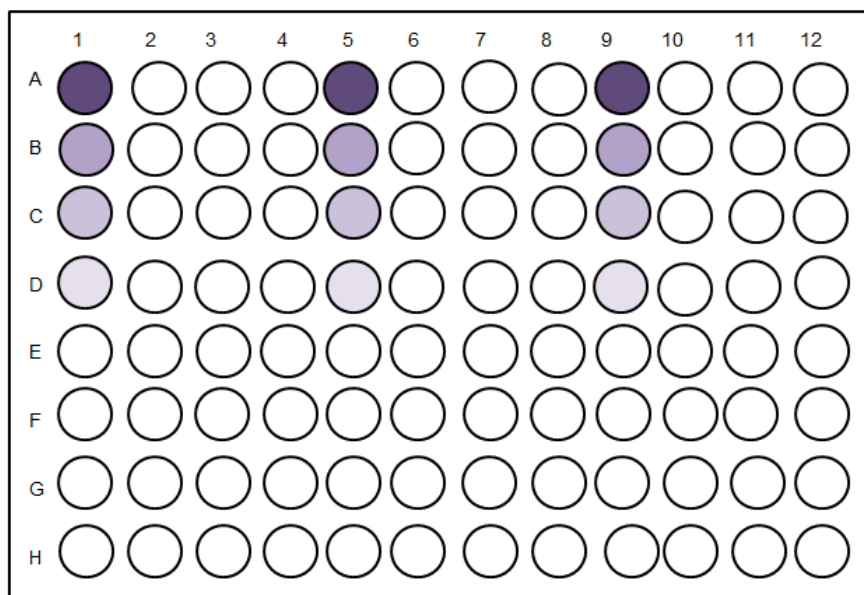
Fonte: adaptado de Farmacopeia Brasileira, 2010.

4.3. Avaliação do espectro de absorção no ultra-violeta (UV)

Para avaliar o potencial de absorção de radiação do extrato, no intervalo de comprimento de onda referente ao espectro UV, respectivamente referente à radiação UVB de 280-315 nm e a UVA de 315-400 nm, foram utilizadas 32 concentrações diferentes, em placa de 96 poços, sendo a maior concentração de 100 mg/mL. Foi realizada uma diluição seriada, sendo adicionados 200 µL da solução de 100 mg/mL no primeiro poço de cada replicata (A1, A5 e A9) e nos demais 100 µL de água destilada. Foram pipetados 100 µL do poço mais concentrado e adicionado ao próximo, homogeneizado e este passo foi repetido até

que todos os poços foram preenchidos (Figura 1). Foi realizada uma varredura no espectrofotômetro (SPECTROstar Nano – BMG Labtech), que consiste em avaliar a absorbância de determinadas concentrações de extrato em vários comprimentos de onda. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, em triplicata.

Figura 1. Layout da análise por varredura espectrofotométrica, em placa de 96 poços



Legenda: Poços A1, A5 e A9: 100 mg/mL; B1, B5 e B9: 50 mg/mL; C1, C5 e C9: 25 mg/mL; D1, D5 e D9: 12,5 mg/mL; E1, E5 e E9: 6,25 mg/mL; F1, F5 e F9: 3,12 mg/mL; G1, G5 e G9: 1,56 mg/mL; H1, H5 e H9: 0,78 mg/mL; A2, A6 e A10: 0,39 mg/mL; B2, B6 e B10: 0,19 mg/mL; C2, C6 e C10: 0,10 mg/mL; D2, D6 e D10: 0,05 mg/mL; E2, E6 e E10: $9,76 \times 10^{-3}$ mg/mL; F2, F6 e F10: $4,88 \times 10^{-3}$ mg/mL; G2, G6 e G10: $2,44 \times 10^{-3}$ mg/mL; H2, H6 e H10: $1,22 \times 10^{-3}$ mg/mL; A3, A7 e A11: $6,10 \times 10^{-4}$ mg/mL; B3, B7 e B11: $3,05 \times 10^{-4}$ mg/mL; C3, C7 e C11: $1,52 \times 10^{-4}$ mg/mL; D3, D7 e D11: $7,63 \times 10^{-5}$ mg/mL; E3, E7 e E11: $3,81 \times 10^{-5}$ mg/mL; F3, F7 e F11: $1,91 \times 10^{-5}$ mg/mL; G3, G7 e G11: $9,54 \times 10^{-6}$ mg/mL; H3, H7 e H11: $4,77 \times 10^{-6}$ mg/mL; A4, A8 e A12: $2,38 \times 10^{-6}$ mg/mL; B4, B8 e B12: $1,19 \times 10^{-6}$ mg/mL; C4, C8 e C12: $5,96 \times 10^{-7}$ mg/mL; D4, D8 e D12: $2,98 \times 10^{-7}$ mg/mL; E4, E8 e E12: $1,49 \times 10^{-7}$ mg/mL; F4, F8 e F12: $7,45 \times 10^{-8}$ mg/mL; G4, G8 e G12: $3,72 \times 10^{-8}$ mg/mL; H4, H8 e H12: $1,86 \times 10^{-8}$ mg/mL.

4.4. Análise de Marcadores

4.4.1. Cianidina-3-Glicosídeo

Utilizando o método de pH diferencial, foram pesadas duas porções, em balança analítica (Shimadzu – ATX224), de 0,05 g do extrato liofilizado e adicionados 5,0 mL de tampão de cloreto de potássico 0,025 M (pH 1,0) a uma porção e, em outro, 5,0 mL de tampão de acetato de sódio 0,4M (pH 4,5). Depois de 2 horas de extração à temperatura ambiente, as amostras foram filtradas e foi avaliada a absorbância, registrada no espectrofotômetro (SPECTROstar Nano – BMG Labtech), a 520 e 700 nm para soluções a pH 1,0 e 4,5, respectivamente. O resultado do Total de Antocianinas foi expresso em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (%m/m) (INÁCIO *et al.*, 2013).

4.4.2. Doseamento do Ácido Ascórbico (Vitamina C)

Para quantificar a vitamina C presente no extrato da jabuticaba, foram realizados os seguintes procedimentos padronizados por LIZIERO *et al.* 2017. Primeiramente, foi realizada a titulação do padrão: ácido ascórbico (AA) (Sigma Aldrich). Para isso, foram preparadas soluções estoque a 1% (m/v). Foram preparados 2 mL da solução estoque do padrão, 100 mL de água destilada, 25 mL de ácido sulfúrico 10% (p/v) e 1 mL de solução de amido 10%, sendo colocados em Erlenmeyer. Posteriormente, essas soluções foram tituladas com iodo 0,05 M. Para a preparação da solução de iodo 0,05 M, foram pesados 13 g de iodo, adicionados 100 mL de solução de iodeto de potássio a 20% e completou-se o volume com água destilada até um litro, em balão volumétrico.

A solução de iodo 0,05 M foi padronizada. Para isso, foram colocados 5 mL desta solução, 5 mL de solução de KI a 4%, 1 mL de ácido acético glacial e 1 mL de solução de amido 10%, em um erlenmeyer, sendo titulado com uma solução de tiosulfato de sódio (6,2574 g/ 200 mL). A solução de tiosulfato de sódio também foi padronizada e, para sua padronização, a solução de tiosulfato de sódio foi utilizada como agente titulante, enquanto o titulado foi uma solução contendo 5 mL de iodeto de potássio 20%, 5 mL de ácido clorídrico 6 N de bromato de potássio ($2,79 \times 10^{-3}$ mg/mL) e 1 mL de solução de amido 10%.

Para a titulação do extrato da jabuticaba foi preparada uma solução estoque contendo 0,1 g/mL do extrato, diluído em água destilada. Na titulação da amostra foi preparada 1,0 mL da solução estoque e adicionados 100 mL de água destilada, 25 mL de ácido sulfúrico 10% e 1 mL de solução de amido 10%, sendo titulado com a solução de iodo 0,05 M. Todas as titulações foram realizadas em triplicata.

4.5. Determinação da Atividade Antioxidante Total

4.5.1. Captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH°) (RUFINO, 2007)

Para o experimento, foi realizada a construção da curva analítica do radical DPPH°, na qual foram realizadas medidas de absorbância, a 515 nm, do radical DPPH° em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM, utilizando álcool metílico como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Foram preparadas, em tubos de ensaio com a amostra, diferentes diluições, em água destilada. Em ambiente escuro, uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi transferida para um tubo de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH°, homogeneizando. Foi utilizado álcool metílico como branco e solução controle contendo 40 mL de álcool metílico 50% e 40 mL de acetona 70% e água para completar o volume para 100 mL. As leituras foram realizadas pelo espectrofotômetro (SPECTROstar Nano – BMG Labtech) sendo monitoradas a cada minuto, para observação da redução da absorbância até sua estabilização.

4.5.2. Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS°⁺) (RUFINO *et al.*, 2007)

Para o ensaio, foi necessária a preparação prévia do radical ABTS°⁺. Para isso, foi preparada uma solução estoque de 7 mM. Para a reação, foram medidas 5,0 mL dessa solução estoque com 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM). Essa mistura foi mantida em ambiente escuro e temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1,0 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

Depois disso, foi construída a curva analítica do Trolox. Em ambiente escuro, foram transferidos 30 µL de cada solução de Trolox (100 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2000 µM), diluído em álcool etílico, para tubos de ensaio, adicionando-se 3,0 mL da solução do radical ABTS^{o+}, sendo homogeneizados em agitador de tubos. Após seis minutos da mistura, foi realizada a leitura, a 734 nm, no espectrofotômetro (SPECTROstar Nano – BMG Labtech). Utilizou-se álcool etílico como branco.

Para analisar a atividade antioxidante do extrato de jabuticaba, foi preparada uma solução contendo diferentes concentrações do extrato diluído em água destilada e, seguiu-se o mesmo procedimento de construção da curva analítica do Trolox. Em ambiente escuro, foram transferidos 30 µL de cada solução de amostra para tubos de ensaio, adicionando-se 3,0 mL da solução do radical ABTS^{o+}, sendo homogeneizados em agitador de tubos. Após seis minutos da mistura, foi realizada a leitura, a 734 nm, no espectrofotômetro (SPECTROstar Nano – BMG Labtech). Utilizou-se álcool etílico como branco. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6. Irritação Cutânea (CHIARI, 2012)

O potencial de irritação cutânea foi avaliado pela desnaturação da ovoalbumina. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque do extrato em água destilada, sendo realizada uma diluição seriada para ser testada. O ensaio consiste em adicionar 2,5 g do extrato e 10 g de clara de ovo (Fleischeggs – Fleischmann – lote 18327043), que contém ovoalbumina, recém-homogeneizada, no agitador magnético e analisar a turvação por transmitância, na espectrofotometria, a 660 nm. Foi preparado um controle negativo utilizando água destilada e a clara do ovo, nas respectivas proporções do ensaio. Quanto menor a turvação, maior será a transmitância e menor será o potencial irritativo do extrato. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

4.7.1. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

O ensaio foi realizado com três linhagens celulares: HaCat (queratinócitos humanos imortalizados), HepG2 (células de hepatoma humano) que possuem a capacidade de metabolizar xenobióticos e HDFa (fibroblastos da derme de humano adulto) (CHIARI *et al.*, 2012; CHIARI, 2011).

As células HDFa e HepG2 foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modification of Minimum Essential Media (DMEM), enquanto a HaCat em meio Minimum Essential Media (MEM), ambos suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de solução de antibiótico, mantidas a $37\pm 2^{\circ}$ C em atmosfera de 5% de CO_2 , em garrafas próprias para cultivo celular. As células com confluência de 80% a 90% foram tripsinizadas e seu conteúdo foi transferido para tubos estéreis e centrifugado, por três minutos, a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células foi suspenso em meio de cultura. A densidade celular para os ensaios utilizando o corante MTT foi de 5×10^5 células/mL, padronizada na contagem com a câmara de Neubauer (BRASIL, 2012). Para a contagem das células, foi utilizado o corante azul de Tripán, o qual cora as células mortas em azul, não sendo consideradas na contagem. Em seguida, foram transferidos 100 μL da solução contendo as células para cada poço das placas de 96 poços (ISO, 2009).

As placas foram incubadas, por 24 horas, para a completa adesão das células às placas de 96 poços. Em seguida, as células foram tratadas com 100 μL de controle positivo (solução contendo fenol), em diferentes concentrações; controle negativo (meio de cultura com 5% de soro) e diferentes concentrações do extrato, sendo deixadas, na estufa, durante 24 horas (ISO, 2009).

Após o tratamento, as soluções de tratamento foram removidas e as placas foram lavadas delicadamente com 150 μL Phosphate Buffer Saline (PBS). Após a lavagem, foram adicionados 100 μL de MTT (1 mg/mL de corante em PBS) em cada poço. As células, na microplaca, foram incubadas a $37\pm 2^{\circ}$ C, ao abrigo da luz, por três horas, quando foi observada a presença dos cristais violeta de formazana. Para a solubilização dos cristais de formazana, foram utilizados 100 μL de álcool isopropílico absoluto, adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 570 nm (ISO, 2009).

4.7.2. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante Vermelho Neutro (Neutral Red – NRU)

O ensaio utilizou três linhagens celulares: HaCat (queratinócitos humanos imortalizados), HDFa (fibroblastos da derme de humano adulto) e HepG2 (células de hepatoma humano). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modification of Minimum Essential Media (DMEM) para HDFa e HepG2 e Minimum Essential Media (MEM) para HaCat, ambos suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), mantidas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas e seu conteúdo foi transferido para tubos estéreis e centrifugado por três minutos, a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células foi suspenso em meio de cultura. A densidade celular para os ensaios utilizando o corante Vermelho Neutro foi de 5×10^5 células/mL, padronizada na contagem com a câmara de Neubauer (Brasil, 2012).

Para a contagem das células, foi utilizado o corante azul de Tripán, o qual cora as células mortas em azul, não sendo consideradas na contagem. Em seguida, foram transferidos 100 μL da solução contendo as células para cada poço das placas de 96 poços (ISO, 2009).

O meio de cultura foi substituído pelas diluições seriadas dos extratos da amostra e dos respectivos controles, sendo controle positivo, diferentes concentrações de uma solução estoque de Lauril Sulfato de Sódio (LSS) e controle negativo, meio com 5% de soro fetal bovino e antibiótico, em triplicata. A microplaca foi, novamente, incubada. Após 24 h, o tratamento foi removido e, a placa foi lavada com 150 μL de PBS e foram adicionados 100 μL de meio contendo o corante vermelho neutro. A incorporação do corante vermelho neutro, pelas células viáveis, foi verificada após 3 h. O meio foi removido e as células lavadas com 150 μL de PBS. Em seguida, foram adicionados 150 μL de uma solução contendo etanol e ácido acético glacial (50% de etanol, 1% de ácido acético glacial e 49% de água destilada). A placa foi agitada por 10 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro, em 540 nm (ROGERO *et al.*, 2003; ISO, 2009; SZUSTER *et al.*, 2018).

4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana

Para este ensaio, foram selecionados microrganismos próprios da microbiota da pele (simbiontes) e patogênicos, para avaliar o potencial antimicrobiano do extrato de jaboticaba, através da Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) (CLSI, 2015; adaptado de SOUZA, 2007). Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593) e *Candida albicans* (ATCC 90028).

4.8.1. Preparo das soluções estoque antimicrobianas

Como substâncias controle foram utilizados os antibióticos Ampicilina e Tetraciclina e antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol nas concentrações adequadas. Foi realizada a diluição de 500 mg de Ampicilina e da Tetraciclina, em 1000 mL de água destilada e, por conseguinte, diluindo 1:10 em água destilada, afim de se obter uma solução estoque de 50 µg/mL. Para a solução antifúngica foram dissolvidos 16 mg de Anfotericina B ou Fluconazol em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo novamente diluídos duas vezes na proporção de 1:5 em meio RPMI-1640, para obter-se a diluição de 32 µg/mL (CLSI, 2015; adaptado de SOUZA, 2007).

4.8.2. Preparo da solução estoque do extrato de jaboticaba

Foram suspendidos do extrato liofilizado de *P. jaboticaba*, em água destilada estéril, para obtenção de uma solução com concentração de 400 mg/mL. A partir desta solução foram preparadas as diluições necessárias para o experimento.

4.8.3. Preparo das suspensões bacterianas e de leveduras

Todas as suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 18 horas, aproximadamente (37°C e 5% de CO₂), em placa de Petri, com ágar de

infusão cérebro e coração (BHI). O repique foi realizado em caldo Müeller Hinton (MH) e, após uma nova incubação *overnight*, foi realizado o ajuste do inóculo adicionando-se solução salina 0,9%, até atingir turvação igual à suspensão do tubo com 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e, então, realizada a diluição 1:100 em caldo MH para obter a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, para ser utilizada no experimento (CLSI, 2015).

As suspensões de leveduras foram padronizadas a partir de cultura em placa de Petri com Sabouraud Dextrose Agar (SDA), de 24 horas, a 35,5°C, sendo suspendidas em 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada. Foi realizada a contagem, em câmara de Neubauer, para ajuste do inóculo, na concentração de, aproximadamente, $2,0 \times 10^4$ UFC/mL, sendo o volume final ajustado com meio RPMI (CLSI, 2008).

4.8.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo da amostra, utilizando microplacas de 96 poços, em triplicata. A determinação da CIM foi realizada com a adição de 100 µL do meio caldo MH em todos os orifícios da microplaca. Em seguida, foram adicionados, aos primeiros poços, 100 µL da amostra e do antibiótico e realizada a diluição seriada. Foram retirados 100 µL da primeira coluna e homogeneizados na segunda e, assim, sucessivamente até a última coluna, na qual os 100 µL restantes foram descartados. Então foram adicionados 100 µL do inóculo microbiano, previamente preparado. Foram realizados controles de crescimento do microrganismo em teste, da esterilidade do meio e da esterilidade da água utilizada como diluente. As placas foram encubadas a 37°C por 24 horas. A leitura da CIM foi realizada com a adição de 30 µL de solução aquosa de resazurina 0,01%, em cada orifício e, depois, incubando por 24 horas, a fim de observar a mudança da coloração, de azul para rosa, na presença de crescimento microbiano (CLSI, 2015).

Para a determinação da CBM, antes de adicionar a resazurina, foi realizada a inoculação, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, de cada um dos poços da

microplaca em ágar MH e após a incubação (37°C/ 24horas) foi efetuada a leitura para verificar se havia ou não crescimento microbiano (CLSI, 2015).

4.8.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo da amostra, utilizando microplacas de 96 poços, em triplicata. A determinação da CIM foi realizada com a adição de 100 µL do meio RPMI 1640 em todos os orifícios da microplaca. Em seguida, foram adicionados, aos primeiros poços, 100 µL da amostra e dos antifúngicos e realizada a diluição seriada. Foram retirados 100 µL da primeira coluna e homogeneizados na segunda e assim sucessivamente até a última coluna, na qual os 100 µL restantes foram descartados. Então, foram adicionados 100 µL do inóculo microbiano, previamente preparado. Foram realizados controles de crescimento do microrganismo em teste, da esterilidade do meio e da esterilidade da água, utilizada como diluente. As placas foram encubadas a 35,5°C, por 24 horas, sob agitação de 120 rpm. A leitura da CIM foi realizada com a adição de 30 µL de solução aquosa de resazurina 0,01%, em cada orifício e, depois, incubando por 24 horas, a fim de observar a mudança da coloração, de azul para rosa, na presença de crescimento microbiano (CLSI, 2008).

Para a determinação da CBM, antes de adicionar a resazurina, foi realizada a inoculação, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, de cada um dos poços da microplaca em ágar SDA e, após a incubação, (35,5°C/ 24horas) foi efetuada a leitura se havia ou não crescimento microbiano (CLSI, 2008).

4.9. Análise da produção de colágeno em células HDFa

Para avaliar a capacidade de produção de colágeno pelo extrato da casca da jabuticaba, foi utilizada a linhagem HDFa. Estas células foram cultivadas em meio DMEM e plaqueadas em placas de 96 poços, sendo utilizados 100 µL de suspensão celular (concentração de 5×10^5 células), em cada poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de jabuticaba solubilizado

em meio DMEM, com 5% de soro fetal bovino. Também, foi utilizado apenas o meio de cultura, como controle negativo. Os tratamentos foram mantidos, por 24 horas, em contato com a monocamada e, então, iniciou-se o procedimento de quantificação do colágeno produzido.

Para isso, os tratamentos foram retirados das placas sendo lavadas com 100 μ L PBS 1x. Foram adicionados 200 μ L de solução de Bouin, para fixar o material, a cada poço, para fixar o material. Após 1 hora, a solução de Bouin foi descartada e as placas foram lavadas em água corrente até a remoção completa da coloração do sobrenadante. Em seguida, as placas foram secas com papel absorvente e foram mantidas *overnight*, à temperatura ambiente, para secagem completa.

Foram adicionados 200 μ L de solução corante vermelho Sirius (Sirius Red – Sigma Aldrich) a cada poço para corar as fibras de colágeno. A placa foi mantida sob-agitação, por 1 hora, ao abrigo da luz. Então, o corante foi removido, os poços foram lavados 4 vezes com 200 μ L de ácido clorídrico 0,1 mol/L, para remover, completamente, a coloração. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de hidróxido de sódio 0,5 mol/L. As placas foram, novamente, mantidas sob agitação, ao abrigo da luz, a fim de solubilizar as fibras colágenas. Foi realizada leitura em espectrofotômetro, a 550 nm (CHIARI, 2011).

A fim de determinar a quantidade de colágeno produzida por cada tratamento, foi preparada uma curva analítica utilizando colágeno Verisol® como controle positivo. Diferentes concentrações do colágeno foram preparadas em ácido acético 0,2%. Foram acondicionadas 100 μ L da solução em placa de 96 poços e mantidas em estufa a $37\pm 2^\circ$ C, em estufa úmida. Após 24 horas, a placas foram transferidas para estufa seca ($37\pm 2^\circ$ C) para completar a secagem. Com isso, foram realizados os mesmos procedimentos que os utilizados para a placa com cultura celular (CHIARI, 2011). O ensaio foi realizado em triplicata.

5.0. Avaliação do potencial de cicatrização em células HDFa

Para avaliar o potencial de cicatrização do extrato da casca da jabuticaba, foi utilizada a linhagem HDFa. Estas células foram cultivadas em meio DMEM e

plaqueadas em placas de 24 poços, sendo utilizados 500 µL de suspensão celular (concentração de 1×10^5 células), em cada poço. Cada poço foi preparado com uma solução de colágeno Verisol® (0,2 mg/mL) por duas horas em estufa à 37°C/5% CO₂. Após 24 horas, foi realizado um risco na monocamada de cada poço e as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de jabuticaba solubilizado em meio DMEM, com 5% de soro fetal bovino. Também, foi utilizado apenas o meio de cultura, como controle negativo. Após adicionar os tratamentos em cada poço, foram realizadas as capturas das imagens de acordo com o tempo proposto (adaptado de WALTER *et al.*, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do extrato

Os resíduos industriais adquiridos contendo cascas e sementes da jabuticaba congeladas foram separadas e as cascas colocadas para descongelar sobre papel absorvente, como representado na Figura 2, as etapas de secagem e maceração das cascas da jabuticaba.

Figura 2. Cascas da jabuticaba secas e em processo de maceração.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

O extrato da casca de jabuticaba possui a coloração roxa escura, tem aspecto brilhante e é altamente viscoso como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3. Extrato da casca da jabuticaba liofilizado.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

Para a extração dos componentes da casca da jabuticaba, foi utilizado o conceito de extração com solventes de polaridade distintas. O álcool 70° GL apresenta como solvente apolar o álcool e, como solvente polar, a água, possibilitando a extração de uma variedade maior de compostos bioativos, partindo do princípio que o tipo de polaridade é capaz de arrastar consigo compostos que possuem similaridades. Durante a retirada dos solventes, foram realizadas em temperatura ambiente ou, no máximo, sob aquecimento a 45°C, a fim de não degradar os compostos antioxidantes presentes na casca do fruto (CHIARI, 2011).

As cascas utilizadas foram adquiridas a partir de resíduos industriais. Sabendo de sua composição nutricional e riqueza de bioativos, as cascas foram selecionadas para o extrato. Os resíduos industriais da jabuticaba têm sido amplamente utilizados, têm-se pesquisado seu uso como biocombustíveis, farinhas, bebidas, entre outros (ARAUJO, 2016; SOUZA, 2016; OLIVEIRA, 2019).

Todas as pesquisas envolvendo o extrato da jabuticaba estão cadastradas no SisGen AC36801; ADC2191; A6ED5AE.

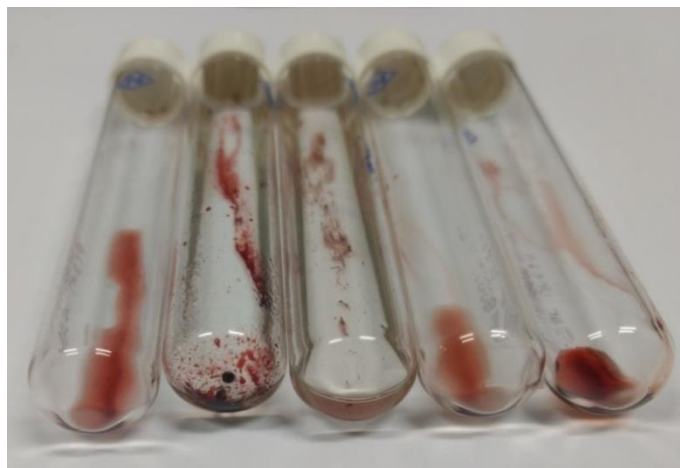
5.2. Análise de solubilidade

Os resultados da análise de solubilidade do extrato de jabuticaba obtidos foram expressos na Tabela 1 e representados na Figura 4.

Tabela 1. Avaliação da solubilidade do extrato liofilizado de jabuticaba.

Solvente	INCI name	Solubilidade
Água destilada	Aqua	Solúvel
Miristato de Isopropila	Isopropyl Myristate	Insolúvel
Etanol Absoluto	Alcohol	Insolúvel
Propilenoglicol	Propylene Glycol	Solúvel
Glicerina	Glycerin	Solúvel

Figura 4. Análise de solubilidade do extrato liofilizado da casca de jabuticaba, em diferentes tipos de solventes.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

Legenda: Tipos de solvente na ordem começando pela esquerda: água destilada, miristato de isopropila, etanol absoluto, propilenoglicol e glicerina.

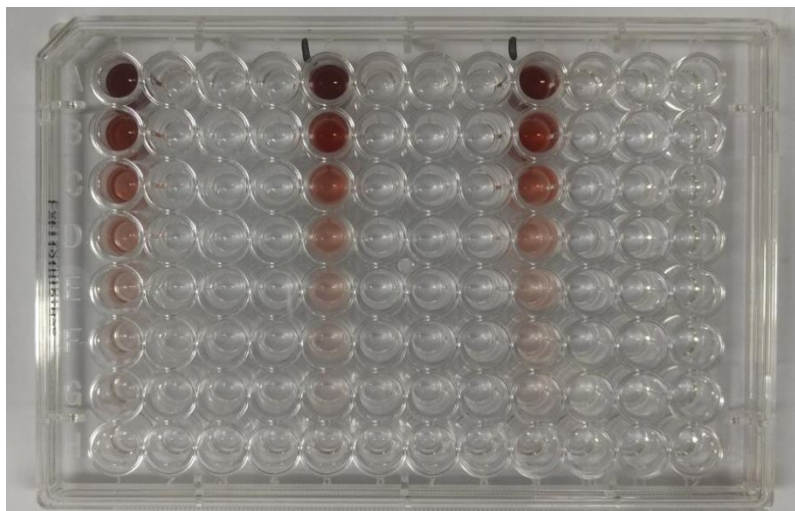
Ao observar a Figura 4, deve-se notar a homogeneidade de cada mistura de extrato, em diferentes solventes. Quanto mais homogêneo, mais solúvel. Quando são visualizadas as partículas do extrato no meio do solvente, mais insolúvel a mistura.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a avaliação da solubilidade corrobora com a complementação de dados para futuros ensaios. Inclusive para facilitar a escolha do solvente para diferentes ensaios e melhor aplicabilidade na formulação desejada. Um fator limitador da penetração do ativo no estrato córneo é a solubilidade visto que, sendo necessário um balaço hidro-lipídico, para facilitar a penetração (ALVES, 2015).

5.3. Avaliação do espectro de absorção ultra-violeta (UV)

Após a diluição seriada, a amostra foi analisada no espectrofotômetro, como mostra a Figura 5, de acordo com cada poço da placa.

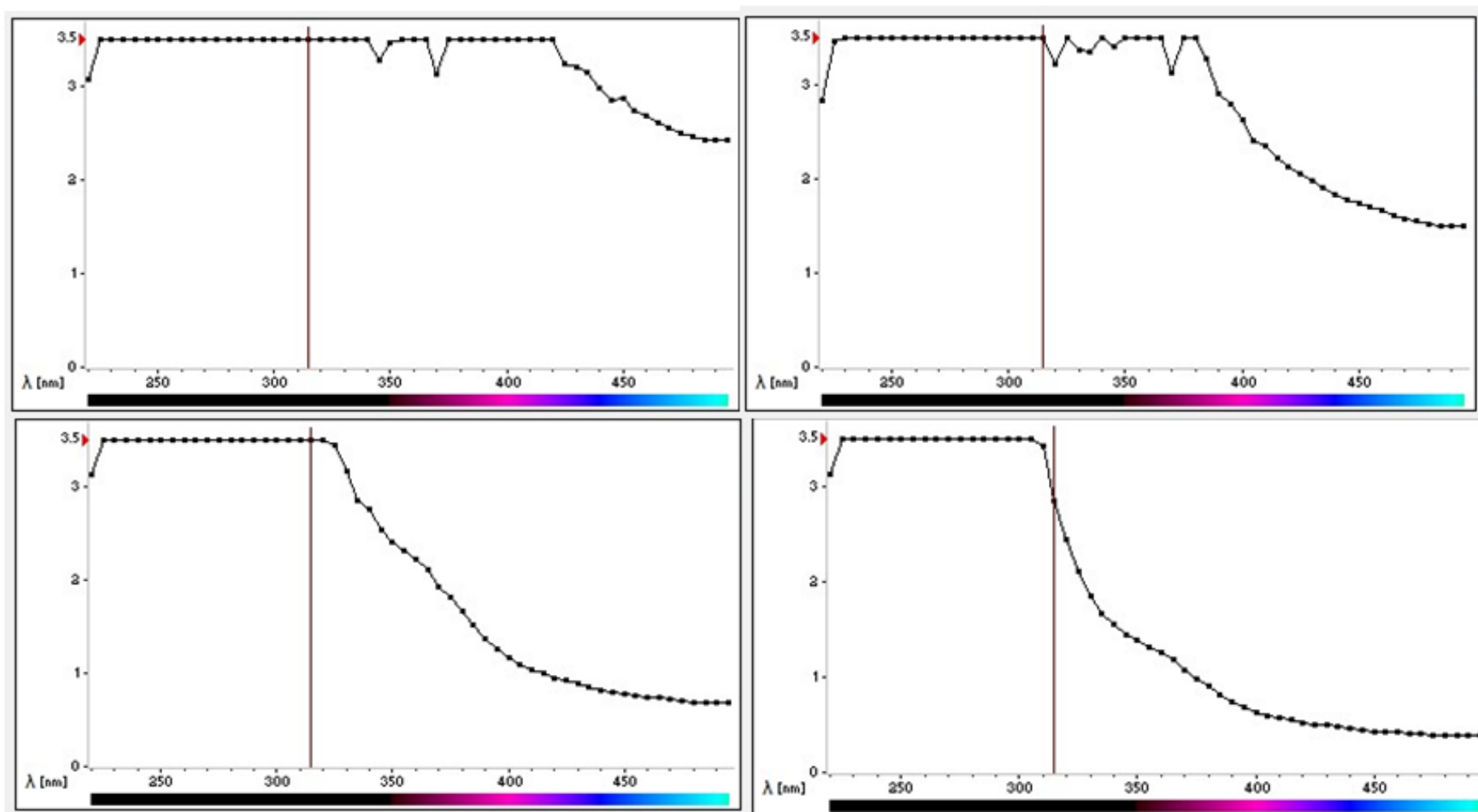
Figura 5. Placa de 96 poços contendo a diluição seriada, do extrato liofilizado da casca da jabuticaba, para análise espectrofotométrica de varredura (UVA e UVB).



Fonte: arquivo pessoal da autora.

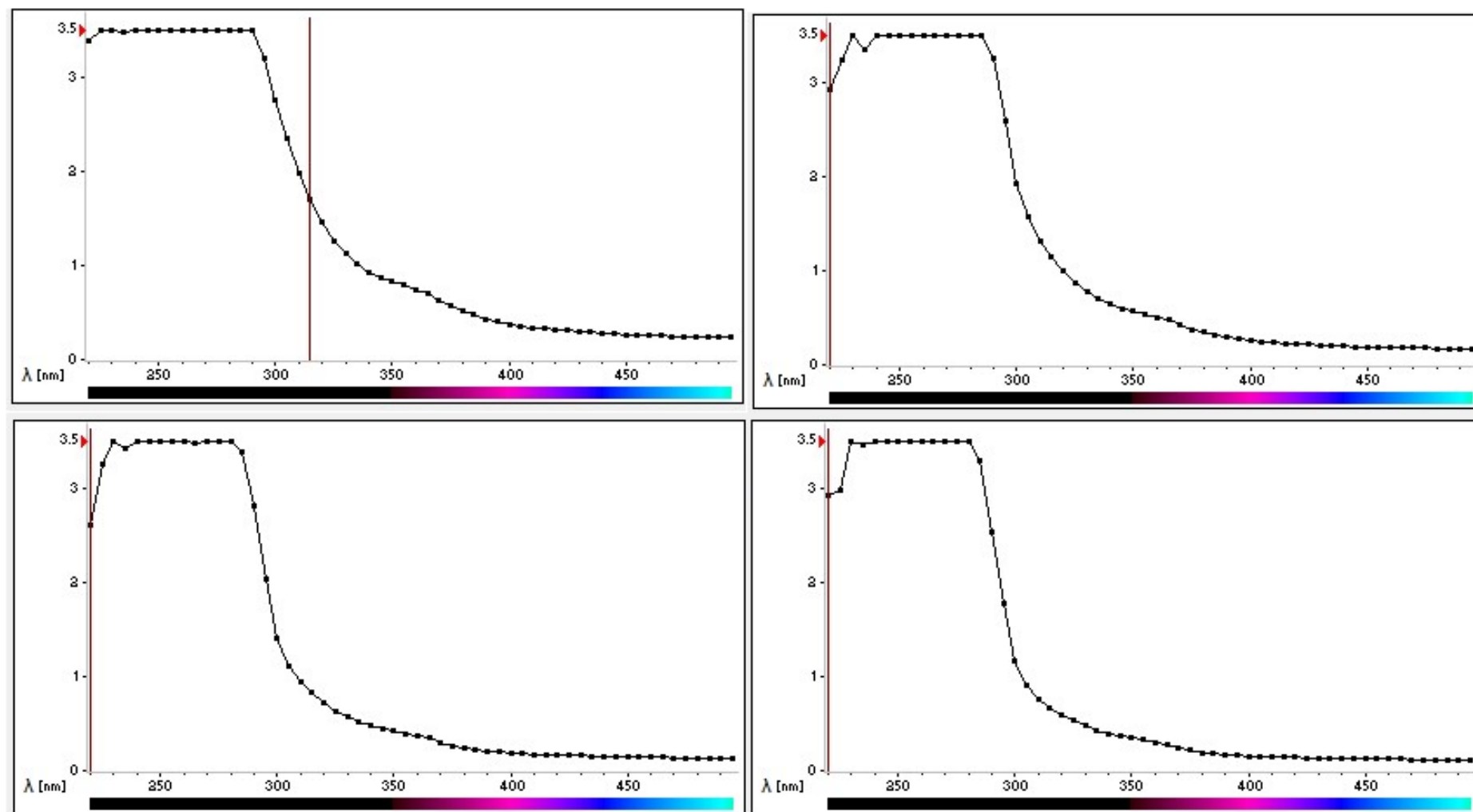
Foram obtidos, após as análises apresentadas, os gráficos apresentados nas Figuras 6, 7, 8 e 9 e nos apêndices 1, 2 e 3.

Figura 6. Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba, nas concentrações 100 – 12,5 mg/mL, em diluição seriada.



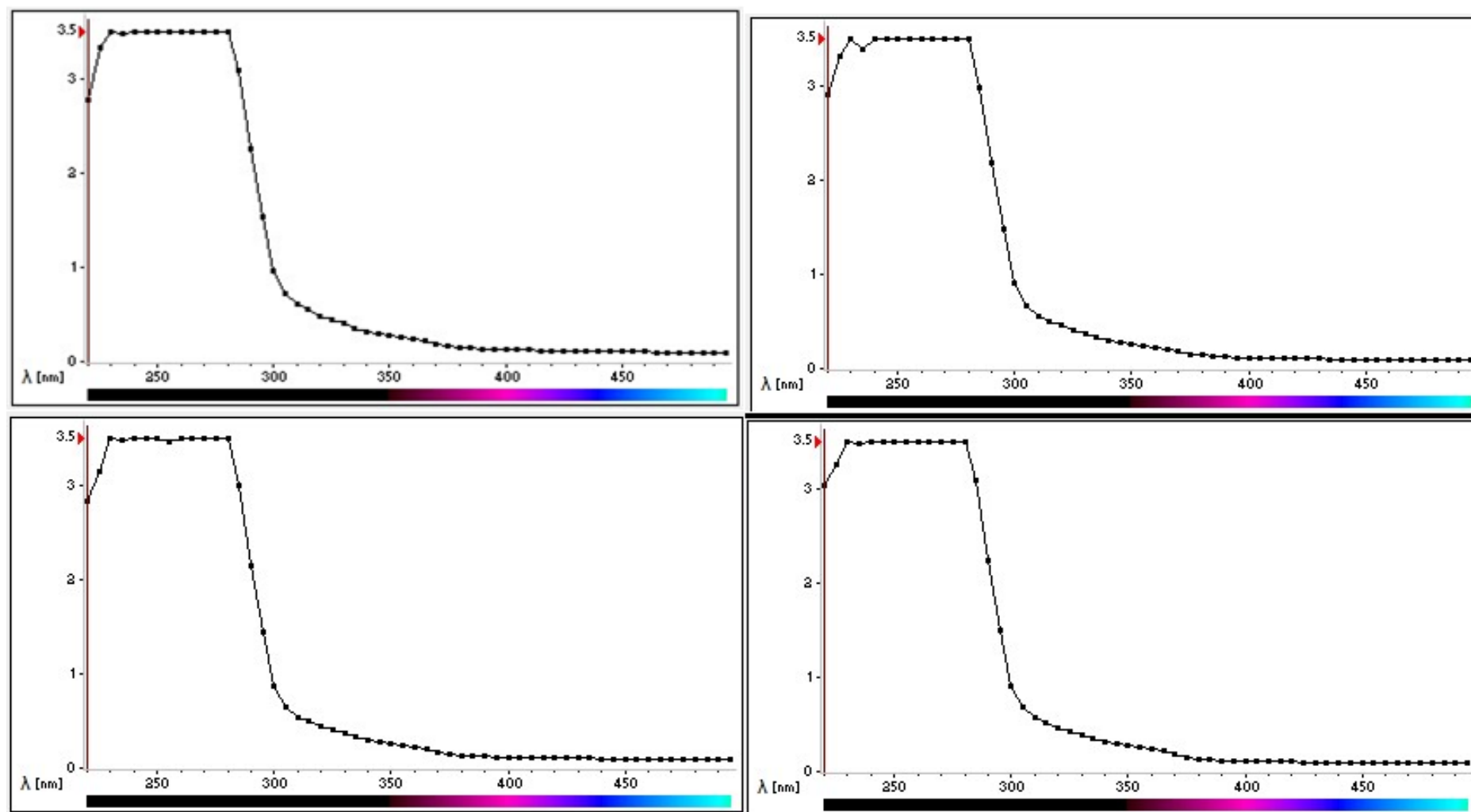
Fonte: arquivo pessoal da autora.

Figura 7. Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba, nas concentrações 6,25 – 0,78 mg/mL, em diluição seriada.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

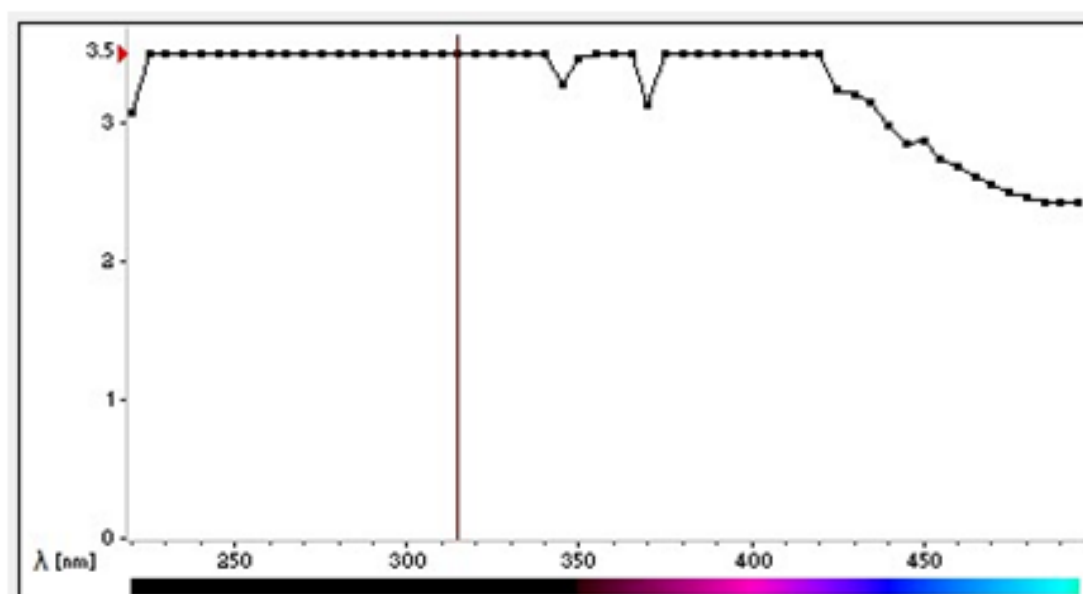
Figura 8. Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba, nas concentrações 0,39 – 0,05 mg/mL, em diluição seriada.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

Ao analisar a Figura 6, pode-se observar que, na varredura, o extrato A1 (100 mg/mL) apresentou uma elevada absorbância nos comprimentos de onda correspondentes à radiação UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). Nas Figuras 6, 7 e 8, que correspondem às diluições em decréscimo, ocorreu uma elevada absorbância na região que compreende a faixa de absorção do UVB, com decaimento ao final dos 295 nm, aproximadamente.

Figura 9. Espectro de varredura do extrato de jabuticaba (100 mg/mL).



A busca por novos ativos que proporcionem uma proteção solar ou efeito sinérgico, no aumento da proteção solar, tem aumentado, justamente pela maior incidência de casos de câncer de pele (INCA, 2020). Com isso, o uso da espectroscopia na região do UV tem se tornado um aliado na pesquisa. Com ela, é possível estabelecer a absorbância de uma amostra e correlacionar com a sua concentração. Materiais com potencial fotoprotetor têm propriedades de absorção ou reflexão da radiação UV (BORELLO; DOMENICI, 2019; LI *et al.*, 2019; BENJATIKUL *et al.*, 2020).

Há estudos que relacionam a capacidade de fotoproteção com a elevada concentração de antocianinas, que são metabólitos secundários de plantas que apresentam coloração entre vermelho, roxo e preto. Essa classe de compostos,

naturalmente, tem a função de proteger as plantas contra a radiação solar (BUCCI *et al.*, 2017; WESTFALL *et al.*, 2019).

O extrato da casca da jabuticaba, a 100 mg/mL apresentou uma elevada absorbância em amplo espectro, tanto na região da radiação UVB, quanto na região da radiação UVA. Nas concentrações inferiores, manteve-se estável na região do UVB. Com este ensaio, pode-se levantar a hipótese que este extrato é um potencial candidato a apresentar proteção solar ou sinergismo, quando adicionado em fitocosméticos.

5.4. Análise de Marcadores

5.4.1. Cianidina-3-Glicosídeo

A cianidina-3-glicosídeo é um biomarcador da casca da jabuticaba. Pertence à classe dos flavonoides e é responsável pela sua coloração escura. (LIMA, 2011). Utilizando o método de pH diferencial (INÁCIO, 2013), foi determinado que o extrato liofilizado da casca da jabuticaba apresentou teor de 161,20 (mg/100 g) de cianidina-3-glicosídeo.

Zhang (2016) avaliou o teor de cianidina-3-glicosídeo em diferentes espécies de cebolas, obtendo uma variação de teor relevante conforme as espécies. Na espécie de cebola branca continham 0,75 mg/100 g de cianidina, enquanto na espécie de cebola amarela, 9,64 mg/100 g. Porém na espécie roxa, haviam 29,99 mg/100 g de cianidina-3-glicosídeo. Estabelencendo a relação que, quanto mais arroxeadada, fosse a espécie de cebola, maior o teor de cianidina.

Há outra maneira de calcular o teor de antocianinas, como descrito por Leithardt (2018), na qual se obtém o teor expresso em antocianinas totais e monoméricas correlacionando com a cianidina-3-glicosídeo. Foram determinadas, para o extrato de jabuticaba, 284,43 mg de cianidina/100 g de base seca para antocianinas totais e 80,60 mg de cianidina/ 100 g de base seca para antocianinas monoméricas. Lima (2011) quantificou o teor de antocianinas totais em diferentes espécies de jabuticaba, obtendo o teor de 158,5 mg/100 g para a espécie Paulista e 205,7 mg/100 g para a Sabará. Em suas discussões aponta que o açaí, planta nativa

da Amazônia contém 263 mg/100 g de cianidina-3-glicosídeo e o camu-camu, pertencente a mesma família que a jabuticaba, 54 mg/100 g.

Foram observados elevados teores de cianidina-3-glicosídeo, antocianinas totais e antocianinas monoméricas no extrato da liofilizado da casca da jabuticaba.

5.4.2. Doseamento do Ácido Ascórbico (AA)

O uso de vitamina C na pele se tornou parte da rotina de cuidados, pois possui funções muito importantes como a atividade antioxidante, que reduz o dano causado pelos radicais livres da radiação solar e do envelhecimento cronológico e estimula a síntese de colágeno, conferindo ação antienvhecimento, tão desejada para quem faz uso de cosméticos com para esta função. A redução do teor de vitamina C na pele leva a má cicatrização, espessamento do estrato córneo e fragilidade na manutenção da morfologia da pele. Logo o uso tanto via oral, quanto por via tópica torna-se essencial para a manutenção da pele saudável (PULLAR *et al.*, 2017).

Para avaliar o teor de vitamina C no extrato da jabuticaba, foi necessário obter os resultados da solução padrão de AA e, em seguida, o teor da solução estoque (0,1 mg/mL) do extrato. Os resultados obtidos na quantificação da solução de AA estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Doseamento de AA em solução a 1% (massa teórica = 0,10007g).

Volume Titulado (mL)	N IODO	Volume da solução (mL)	MASSA DE AA (g)	% de AA (m/m)	Média	Desvio Padrão	Intervalo de confiança 95%
3,35	0,00336	1,000	0,991	99,051			
3,29	0,00336	1,000	0,973	97,277	97.967	0.950	1,076
3,30	0,00336	1,000	0,976	97,573			

O doseamento de AA na solução contendo extrato de jabuticaba está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Doseamento de AA presente na solução contendo extrato da casca da jabuticaba liofilizado.

Volume Titulado (mL)	Massa de AA (mg)	Volume de extrato (mL) utilizado na titulação	Massa de extrato (mg) utilizada na titulação	Concentração de vitamina C (%)
0.930	0.275	1.000	100.090	0.275
0.950	0.281	1.000	100.090	0.281
0.900	0.266	1.000	100.090	0.266
			Média	0.274
			Desvio	0.008
			Intervalo de Confiança 95%	0.009

A vitamina C desempenha um importante papel como antioxidante natural. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 2011, a polpa fresca da jabuticaba contém 16 mg desta vitamina, cerca de 40% das necessidades diárias de consumo de um adulto, enquanto a casca apresenta maior quantidade de vitamina C. Neste ensaio o teor de vitamina C quantificado para o extrato da casca da jabuticaba foi de 0,27 g de vitamina C / 100 g de extrato.

Neri-Numa e seus colaboradores estudaram a composição de diversas plantas, dentre eles o açaí apresentou o menor teor de vitamina C, 0,1 mg de vitamina C /100 g de fruta. Já o Buriti, apresentou teor de vitamina C de 26 mg de vitamina C / 100g de fruta. Se comparado com outras plantas, como por exemplo, o camu-camu, pertencente à mesma família que a jabuticaba (5,1 g de vitamina C / 100g de fruta), a jabuticaba apresenta um teor menor de vitamina C. Porém, extrato da jabuticaba possui um resultado considerável para sua aplicabilidade em cosméticos (NERI-NUMA *et al.*, 2018).

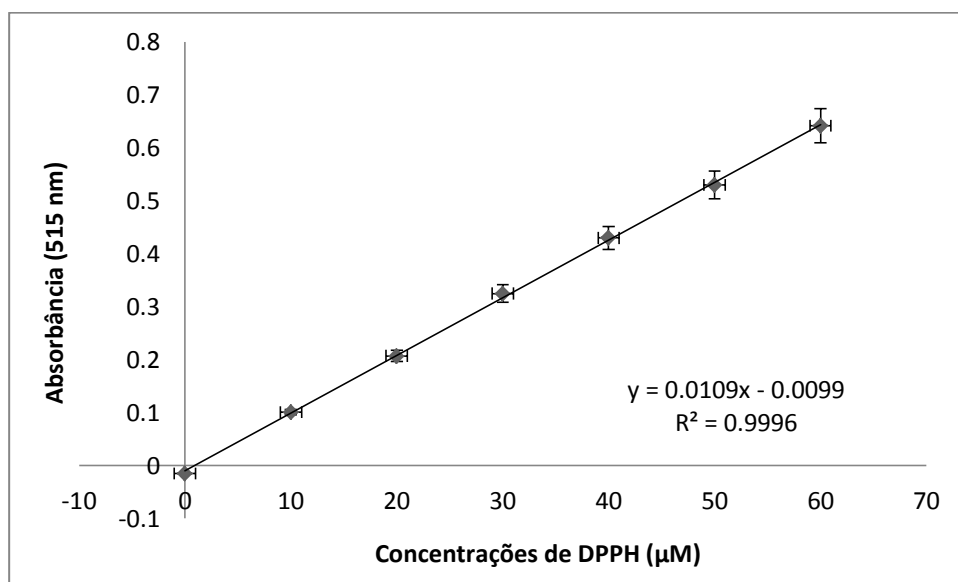
5.5. Determinação da Atividade Antioxidante Total

5.5.1. Captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH°)

A metodologia que utiliza o radical DPPH° é um ensaio muito empregado para determinar atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. A metodologia é baseada na captura do radical DPPH° por antioxidantes, produzindo um

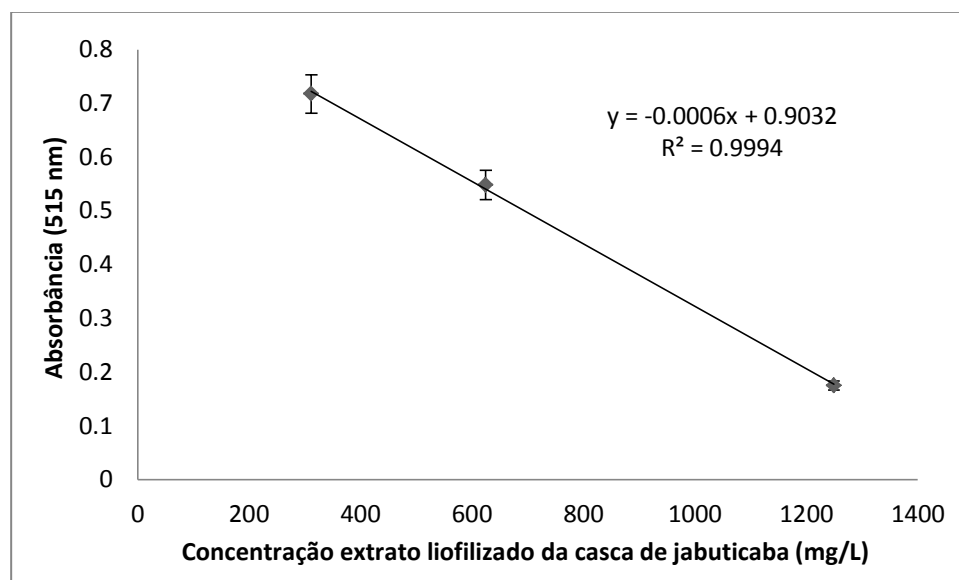
decréscimo da absorbância a 515 nm (RUFINO, 2007). Inicialmente, foi determinada a curva analítica do reagente DPPH°, para a qual foi calculada a equação da reta deste reagente (Figura 10).

Figura 10. Curva analítica do radical DPPH°.



Em seguida, foram realizadas as medidas de absorbância (nm), a cada minuto, até estabilizar, das diluições seriadas das amostras, assim como a obtenção do gráfico e determinação da equação da reta.

Figura 11. Absorbâncias estabilizadas do extrato em conjunto com o radical DPPH°.



Para o cálculo da atividade antioxidante total, foram substituídos 50% da absorbância inicial do controle, em cada equação da reta obtida, para encontrar o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH° (EC₅₀). Assim, obteve-se o valor de 176,77 em g de fruta/g de radical DPPH°.

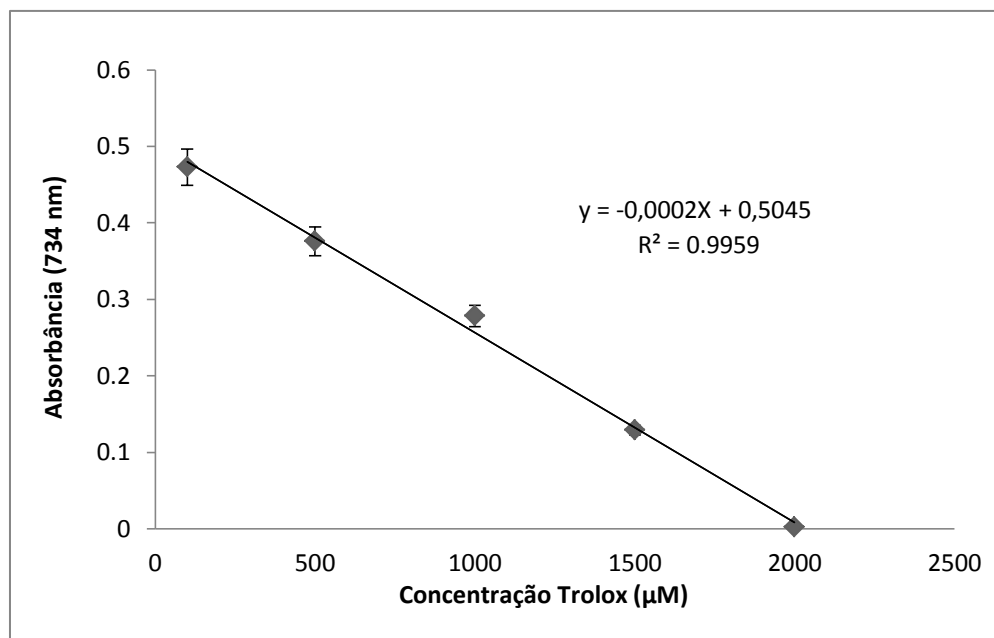
Na avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH° é observado um decréscimo da absorbância em relação ao tempo. Foi avaliada a capacidade antioxidante de diversos frutos pela metodologia utilizando o DPPH° e obtiveram os seguintes resultados: 138 ± 3,1 g de fruta seca/g do radical DPPH° para a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) (RUFINO *et al.*, 2010), enquanto, Chang (2019), reportou uma EC₅₀ de 138 g de fruta seca/g de radical DPPH° para a jabuticaba e 37 g de fruta seca/g de radical DPPH° para a pitanga, que pertencem à mesma família.

O extrato liofilizado da casca de jabuticaba demonstrou possuir elevada atividade antioxidante, visto que, quanto menor o valor de EC₅₀ do composto estudado, maior será a sua atividade antioxidante.

5.5.2. Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{o+})

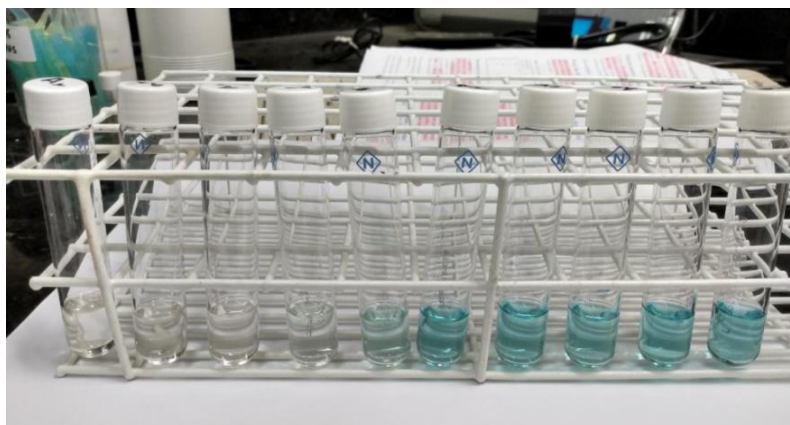
Após o preparo prévio do radical ABTS^{o+}, foi determinada a curva analítica do Trolox. Foram realizadas as medidas de absorbância, para diferentes concentrações do padrão, e os resultados foram expressos na Figura 12.

Figura 12. Curva analítica do Trolox.



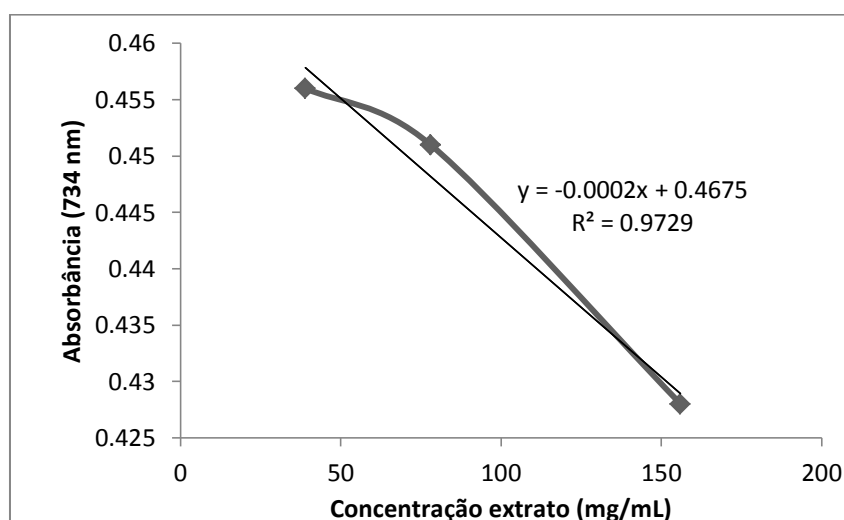
Em seguida, foram preparadas diferentes concentrações do extrato e realizada uma diluição seriada, como mostrada na Figura 13. O radical apresenta uma coloração verde-escura; então, quanto mais clara a solução, maior a quantidade de radical que reagiu com o antioxidante. Com os valores de absorbância de cada diluição, foi inserido no gráfico da Figura 14, sendo utilizado para calcular o EC 50, que é a quantidade suficiente para reagir e inativar 50% do radical ABTS^{o+}.

Figura 13. Diluição seriada do extrato de jabuticaba que reagiu com o radical $\text{ABTS}^{\circ+}$.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

Figura 14. Curva de reação das diluições do extrato liofilizado da casca de jabuticaba com o radical $\text{ABTS}^{\circ+}$.



A atividade antioxidante do extrato liofilizado da casca de jabuticaba, pela metodologia que emprega o radical $\text{ABTS}^{\circ+}$, foi calculada a partir dos gráficos apresentados nas Figuras 11 e 13. O valor encontrado foi de 123,85 μM Trolox/g da fruta.

O método de captura do radical $\text{ABTS}^{\circ+}$ é amplamente utilizado para a determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais uma vez que o radical

apresenta estabilidade e por se tratar de uma metodologia rápida e mais acessível frente a outras metodologias (KUSKOSKI et al., 2005).

Rufino et al., 2010, mediram a capacidade antioxidante pela metodologia que emprega o radical $ABTS^{\circ+}$ de diversos extratos obtidos da casca e polpa de frutos e o resultado para a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) foi de $317 \pm 2,7 \mu\text{M Trolox/g}$, enquanto para o jabolão (*Syzygium cumini*), que também é pertencente à família Myrtaceae, foi obtido o valor de $125 \pm 10,8 \mu\text{M Trolox/g}$. KUSKOSKI et al., 2005 utilizaram polpa de frutos como a goiaba (*Psidium guajava*) e o valor foi de $8,2 \pm 0,4 \mu\text{M Trolox/g}$. Chang et al., 2019, reportaram a atividade antioxidante da jabuticaba pela metodologia utilizando o radical $ABTS^{\circ+}$ de $317 \mu\text{mol TE/g}$.

A partir do resultado observado, $123,85 \mu\text{M Trolox/g}$ da fruta, confirma-se sua elevada atividade antioxidante, visto que a casca do fruto é rica em diversos compostos que conferem atividade antioxidante, como compostos fenólicos, principalmente as antocianinas (CHANG et al., 2019).

5.5.3. Diferentes metodologias para quantificação da atividade antioxidante

A maior classe de compostos antioxidantes encontrados como metabólitos secundários das plantas são os compostos fenólicos. São divididos em flavonoides e não flavonoides. Sobre a capacidade antioxidante há uma variação relevante entre os tipos de espécies testados para o parâmetro atividade antioxidantes. Mas, também há variações dentro de uma mesma espécie, até mesmo em uma mesma planta conforme tipo de plantio, época de colheita, emprego de irrigação adequada, maturação, entre outros fatores (RIGOLON, 2017).

Existem diversas metodologias para avaliar a atividade antioxidante. Os mais comuns são DPPH $^{\circ}$ e $ABTS^{\circ+}$, vistos anteriormente. Há, também, o ensaio de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), potencial antioxidante redutor férrico (FRAP), potencial antioxidante de redução cúprica (CUPRAC), método de captura de ânion radical superóxido, capacidade de captura do HOCl/OCl $^-$, capacidade de captura sobre o H $_2$ O, entre outras (ALMEIDA-CINCOTTO, 2016; SIRIVIBULKOVIT et al., 2018).

Diferentes metodologias empregadas na análise da atividade antioxidante tornam a análise de um extrato robusta, mas não são comparáveis entre si diante dos resultados de IC 50, que consiste na quantidade de compostos antioxidantes suficiente para reduzir 50% do radical utilizado, porém a observação a ser realizada está no plano da substância ter ou não capacidade antioxidante (ABDUL KARIM *et al.*, 2014; YEO; SHAHIDI, 2019).

Dentro da análise de extratos vegetais, é possível estabelecer a relação sinérgica de sua composição rica com os benefícios de substâncias puras. Sendo de grande complexidade e enorme vantagem a sua utilização visto que pode aumentar a atividade esperada (ALMEIDA-CINCOTTO, 2016).

5.6. Irritação Cutânea

A irritação cutânea *in vitro* possibilita avaliar o potencial de desnaturação de proteínas pelo extrato da casca da jabuticaba. Esta metodologia tem, por princípio, a similaridade de solubilização da albumina, comparada com a queratina, proteína presente em grande quantidade na epiderme. Neste ensaio, quanto maior a transmitância, menor a turvação e menor o perfil de irritação. A substância utilizada como controle foi água destilada, ou seja, uma substância que não causa irritação à pele (CHIARI *et al.*, 2012).

Os resultados da avaliação da irritação cutânea foram apresentados na Tabela 4, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4. Avaliação do potencial de irritação cutânea (Concentração do extrato X Transmitância).

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	TRANSMITÂNCIA
CONTROLE	0.684 ± 0,229
100,0	0,000 ± 0,229
50,0	0,000 ± 0,229
25,0	0,000 ± 0,229
12,5	0,106 ± 0,229
6,3	0,106 ± 0,229
3,1	0,182 ± 0,229
1,6	0,476 ± 0,229
0,8	0,727 ± 0,229
0,4	0,976 ± 0,229
0,2	0,931 ± 0,229
0,1	0,954 ± 0,229

Pode-se observar que, quanto menor a concentração do extrato, maior a transmitância, sendo menor o perfil de irritação cutânea. A faixa de concentração de extrato que mais se aproxima do valor de transmitância do controle, ou seja, o potencial de irritação cutânea da água, está contida entre 0,8 a 1,6 mg/mL. Porém, nas concentrações mais elevadas de extrato a transmitância chegou a zero, atestando possível irritação cutânea.

Considerando uma barreira da pele em homeostase, a permeabilidade é atribuída à estrutura do estrato córneo (EC). O EC possui células ricas em queratina agregadas a monômeros de filagrina. O EC também possui lipídeos responsáveis pela permeabilidade, acidificação, descamação, sinalização celular e balanço hídrico. Ainda, na homeostase da pele, a ativação da resposta imunológica inata da pele é rápida e dependente da gravidade do agente irritante e/ou alergênico ou cumulativo. Para esse tipo de resposta, há ativação de interleucinas-1 α dos corneócitos, células presentes no EC. Quando um agente irritante consegue adentrar a pele, pode ocorrer dano nos queratinócitos e induzir estímulos pró-inflamatórios (JAKASA; THYSSEN; KEZIC, 2018).

As proteínas sofrem alterações de conformação até a desnaturação completa quando é alterado o pH, a temperatura, a pressão, entre outros fatores

(SIRIVASTAVA & ALAM, 2018). O ponto isoelétrico é uma das propriedades físico-químicas mais importantes das proteínas, pois se trata do valor de pH no qual uma molécula apresenta carga elétrica igual a zero e, sendo valores maiores ou menores, há presença de cargas positivas ou negativas. O ponto isoelétrico da albumina é 4,7 e, para valores menores do que 4,0 ocorre a desnaturação desta proteína (BARROS *et al.*, 2019). O pH da solução estoque utilizada neste experimento, com concentração de 100 mg/mL, foi de 3,10, devido a elevada concentração de compostos fenólicos, que possuem caráter ácido. O pH da pele varia entre 5,5 e 6,5. Compostos muito ácidos ou básicos promovem a descamação da pele, que favorece o remodelamento facial, rejuvenescimento e melhoria de melanoses (PATHAK; MOHAN; ROHRICH, 2020).

Assim, nas concentrações menores que 0,8 mg/mL o extrato possui um potencial de irritação cutânea inferior ao potencial de irritação da água. Nas concentrações 0,8 a 1,6 mg/mL, o extrato apresentou potencial de irritação cutânea similar ao da água e acima de 25 mg/mL, um maior potencial irritativo.

5.7. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

Os resultados da citotoxicidade são expressos em IC 50 ou Concentração de Inibição de 50% das células viáveis em teste, ou seja, é a concentração suficiente para causar a morte de 50% das células viáveis. Na fase inicial dos testes de biocompatibilidade de extratos obtidos de plantas, que apresentem potencial cosmético, estes extratos não devem causar morte das células ou afetar suas funções celulares (BLACK, 1992; CHIARI *et al.*, 2012).

5.7.1. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

Para avaliar a viabilidade celular é necessária a presença de um cromóforo que interaja com células viáveis. O MTT é um dos corantes mais populares para esta metodologia. Este corante, com coloração amarela e solúvel em água, ao reagir com

as mitocôndrias das células vivas, forma cristais insolúveis de formazana de coloração arroxeada. Para este processo, são necessárias redutases mitocondriais. Após a solubilização dos cristais de formazana, é possível quantificar por espectrofotometria a 570 nm e estimar a toxicidade do ativo em teste, além de comparar com um padrão ouro (CHIARI, 2011; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

5.7.1.1. Em células HepG2

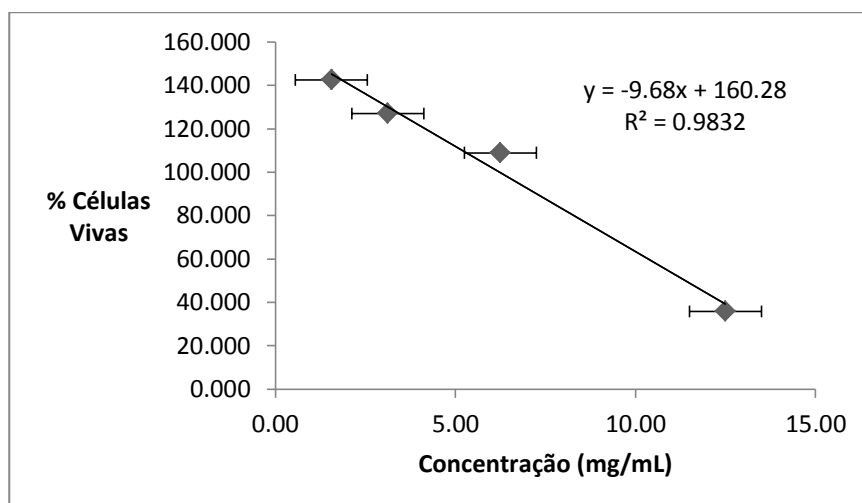
O ensaio foi realizado com HepG2, células de hepatoma humano, que possuem a capacidade de metabolizar xenobióticos. (CHIARI, 2011; CHIARI *et al.*, 2012).

O IC₅₀ do extrato da jabuticaba foi de $10,70 \pm 1,35$ mg/mL, enquanto o IC₅₀ do controle positivo (solução de fenol) foi de 2,8 mg/mL, utilizando o modelo experimental celular HepG2.

A linhagem celular de hepatoma humano (HepG2), avalia se os compostos bioativos presentes na casca da jabuticaba teriam uma possível toxicidade a esta linhagem celular, caso penetrem a pele e entrem na circulação sanguínea. Este efeito sistêmico teria afinidade por sua metabolização hepática (CORRÊA, 2018). Solai Prakash & Devaraj, 2019, obtiveram o IC₅₀ de 0,04 mg/mL do extrato de jambolão, planta que pertence à mesma família da jabuticaba. Dessa forma, a jabuticaba possui um menor efeito citotóxico, sendo viável para utilização em fitocosméticos.

Pode-se observar na Figura 15 que nas menores concentrações utilizadas no ensaio, ocorreu um aumento da viabilidade celular, assim como no extrato da goiaba, sendo explicado pela sua elevada concentração de compostos fenólicos, que possui efeito hepatoprotetor (CHIARI, 2011).

Figura 15. Viabilidade celular da linhagem HepG2 em diferentes concentrações de extrato da casca da jabuticaba utilizando o corante MTT.



Ainda que os ensaios de citotoxicidade *in vitro* não se relacionem diretamente com os ensaios *in vivo*, é seguro afirmar que, se o extrato tem uma ação citotóxica com os testes em cultura de células, é muito possível que desenvolvam toxicidade quando aplicado em tecido vivo (OSÓRIO *et al.*, 1998).

5.7.1.2. Em células HaCat

O uso de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat) são relevantes a fim de avaliar o potencial de irritação da pele, pois são as primeiras células com as quais um produto de uso tópico entra em contato. Além disso, esta linhagem apresenta morfologia e funcionalidades típicas de queratinócitos epidérmicos, sendo considerado um modelo robusto de estudo de testes de toxicidade da pele (TAOFIQ *et al.*, 2019).

O IC₅₀ do extrato da jabuticaba foi de $9,57 \pm 0,63$ mg/mL, enquanto o IC₅₀ do controle positivo (solução de fenol) foi de 2,98 mg/mL, utilizando o modelo experimental celular HaCat. Taofiq (2019), relatou a citotoxicidade em células HaCat com tratamento de extrato de cogumelo, obtendo um IC₅₀ de 100 µg/mL. Enquanto Almeida-Cincotto (2016), relatou IC₅₀ de 3419,11 µg/mL para o extrato de *Morus*

nigra L. Dessa forma, o extrato de jabuticaba apresentou um potencial de irritação avaliado pela citotoxicidade reduzido sendo viável para sua utilização em formulações cosmética.

5.7.1.3. Em células HDFa

O uso de fibroblastos da derme humana (HDFa) em ensaios de citotoxicidade são relevantes para avaliar o potencial tóxico de ativos que, incorporados em formulações tópicas, entram em contato com a derme humana. Avaliar esse potencial tóxico auxilia no uso seguro do ativo (GAWRON *et al.*,2019).

O IC₅₀ do extrato da jabuticaba foi de $7,12 \pm 0,98$ mg/mL, enquanto o IC₅₀ do controle positivo (solução de fenol) foi de 1,19 mg/mL, utilizando o modelo experimental celular HDFa. O extrato das sementes de *Nigella sativa* apresentou um IC₅₀ de 0,2 mg/mL em células HDFa, enquanto o extrato de *Peperomia blanda* apresentou IC₅₀ menor que 100 µg/mL e o extrato de *Morus nigra*, 5622,11 µg/mL (ALMAIDA-CINCOTTO, 2016; AL-MADHAGI *et al.*,2018; GAWRON *et al.*,2019), mostrando menor dermatotoxicidade.

5.7.2. Avaliação do potencial citotóxico pelo uso do corante Vermelho Neutro (Neutral Red – NRU)

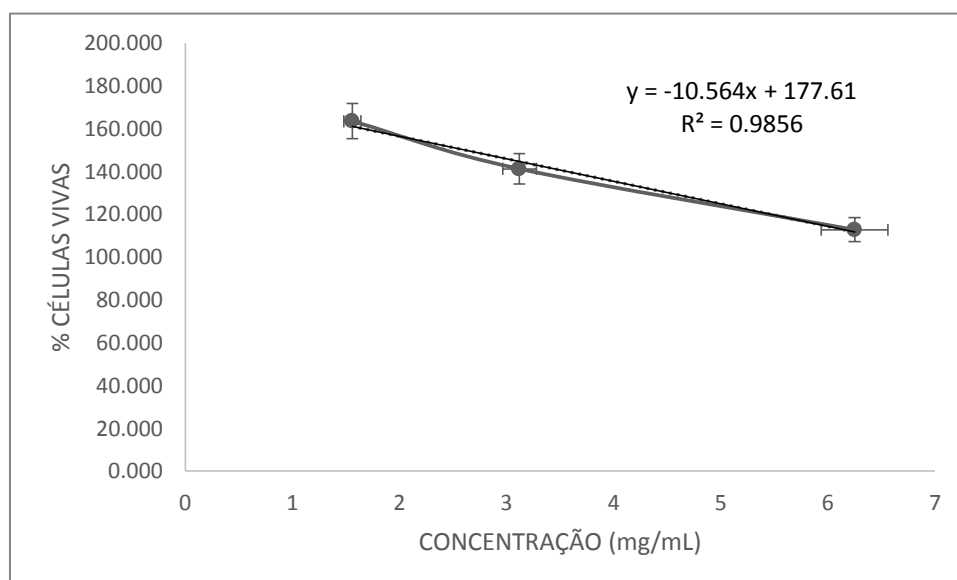
O uso do corante Vermelho Neutro também fornece uma estimativa do número de células viáveis, após o tratamento com ativo e controles. A eficiência deste teste dá-se pela incorporação do corante pelos lisossomos das células vivas através de difusão passiva e interação iônica e por ligações hidrofóbicas. Para quantificar a viabilidade foi utilizada espectrofotometria a 540 nm (REPETTO *et al.*,2008; ATES *et al.*,2017).

5.7.2.1. Em células HepG2

O IC₅₀ do extrato da jabuticaba foi de $11,43 \pm 3,93$ mg/mL, enquanto o IC₅₀ do controle positivo (solução de LSS) foi de 0,54 mg/mL, utilizando o modelo

experimental celular HepG2. E, assim como observado no ensaio utilizando o corante MTT, para a linhagem celular HepG2, nas menores concentrações utilizadas no ensaio, também ocorreu um aumento da viabilidade celular (Figura 16), assim como no extrato da goiaba, sendo explicado pela sua elevada concentração de compostos fenólicos, que possui efeito hepatoprotetor (CHIARI, 2011).

Figura 16. Viabilidade celular da linhagem HepG2 em diferentes concentrações de extrato da casca da jabuticaba utilizando o corante NRU.



O uso da medicina tradicional norteia diversos estudos de hepatoproteção. A *Pouteria ramiflora* (Mart.), *Pontulaca olearacea* e *Petroselinum sativum* são exemplos mais recentes de estudos nesta área. O efeito citotóxico dessas espécies avaliadas utilizando o corante NRU foi, respectivamente, de 3,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL; sendo valores superiores, considerados hepatotóxicos. O extrato de jabuticaba, além de apresentar valores de IC 50 superiores, ainda apresentou efeito hepatoprotetor, nas menores concentrações utilizadas (FARSHORI *et al.*, 2014; TUTTIS *et al.*, 2018).

5.7.2.2. Em células HaCat

O IC50 do extrato da jabuticaba foi de $10,94 \pm 1,80$ mg/mL, enquanto o IC50 do controle positivo (solução de LSS) foi de 0,14 mg/mL, utilizando o modelo

experimental celular HaCat. Hecker (2002) avaliou o potencial citotóxico dos alquifenóis do *Ginkgo biloba* L. utilizando o corante NRU e obteve um IC 50 de 889 mg/L, enquanto Mostafa (2019), obteve um IC 50 de 224,57 a 346,25 µg/mL para as nanopartículas de *Centaurea pumilio* L, mostrando menor citotoxicidade em células da epiderme humana.

5.7.2.3. Em células HDFa

O IC50 do extrato da jabuticaba foi de $6,57 \pm 1,27$ mg/mL, enquanto o IC50 do controle positivo (solução de LSS) foi de 1,02 mg/mL, utilizando o modelo experimental celular HDFa. Thring (2011), analisaram a citotoxicidade da tintura e do extrato liofilizado de *Rosa alternifolia* L., do chá branco (*Camellia sinensis*) e da *Hamamelis virginiana* L. obtendo viabilidade superior a 50% em todas as concentrações utilizadas (12,5 a 200 µg de liofilizado ou tintura). O extrato da casca da jabuticaba mostrou menor citotoxicidade nos fibroblastos da derme humana, logo, menor dermatotoxicidade.

5.7.3. Comparação entre corantes e linhagens celulares

O ensaio utilizando o corante MTT avalia a viabilidade de células com metabolismo ativo em converter o sal tetrazólio em cristais de formazana, que são solubilizados para serem quantificados espectrofotometricamente; contudo, o sal de tetrazólio pode sofrer algumas interferências de redução e oxidação, quando a substância em teste apresentar, em sua composição fitoestrogênios, polifenóis, vitaminas, compostos e ligas metálicas. O ensaio utilizando o corante Vermelho Neutro (NR) avalia a viabilidade na capacidade das células acumularem o corante nos lisossomos, sendo também quantificado por espectrofotometria. Com isso, a necessidade de usar duas metodologias para avaliar a viabilidade mostra-se pertinente. Assim, é possível reduzir a possibilidade de interferência da composição do extrato. Bacanli *et al.* (2017) relatou diferença de sensibilidade entre ensaios de citotoxicidade; porém, metodologias que empregam os corantes MTT e NRU ainda são avaliados como os mais sensíveis. Ainda no estudo avaliando compostos fenólicos, não foi relatada diferença entre resultados empregando os corantes MTT e

NRU (BACANLI *et al.*, 2017; GOMEZ *et al.*, 2017). Na Tabela 5, estão descritos os valores encontrados de IC 50, em diferentes linhagens celulares, relevantes para a cosmetologia, nos diferentes ensaios propostos.

Tabela 5. Análise comparativa de IC 50 das linhagens celulares e corantes (valores expressos em mg/mL)

Corantes	Linhagens		
	HaCat	HDFa	HepG2
<i>MTT</i>	9,57 ± 0,63 ^a	7,12 ± 0,98 ^c	10,70 ± 1,35 ^e
<i>NRU</i>	10,94 ± 1,80 ^b	6,57 ± 1,27 ^d	11,43 ± 3,93 ^f

Nota: foi utilizado o software GraphPad Prisma para a análise estatística, no qual foi obtido valor $p < 0,05$ pela ANOVA pós teste Tukey.

Estudos realizados por Pitz e seus colaboradores, em 2016, avaliaram a viabilidade celular na linhagem de fibroblastos L929, utilizando o corante MTT com tratamento de extrato hidroalcolico da casca da *Plinia peruviana*, obtendo viabilidade superior a 80%, com 100 µg/mL. Mendonça de Assis *et al.* 2019 avaliaram a citotoxicidade da *Plinia cauliflora* em células de fibroblastos L929 resultando na não toxicidade nas concentrações utilizadas (1,00 – 7,81 µg/mL). Já Calloni *et al.* 2016 testaram polifenóis da *Plinia trunciflora* em fibroblastos de pulmão e obteve viabilidade superior à 75% com 250 µg/mL.

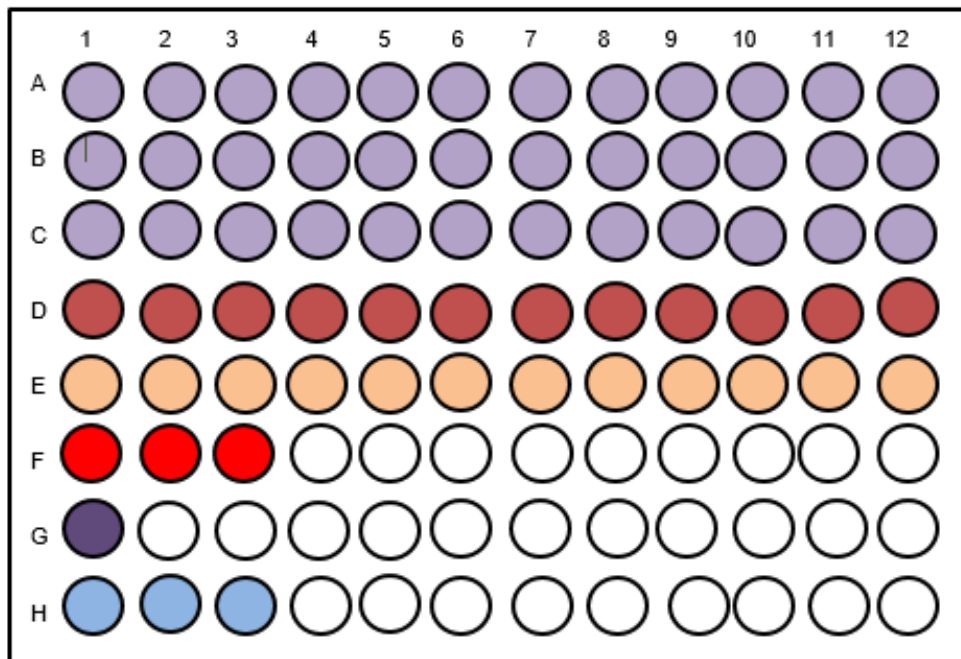
O uso de testes de citotoxicidade *in vitro* é amplamente utilizado para nortear a concentração ideal de uso de determinado ativo ou componente de formulação, para diversas áreas de pesquisa. Sharma (2011) testaram a toxicidade do óxido de zinco na linhagem HepG2 e obtiveram valores de 14 a 20 µg/mL em 12 e 24 horas, respectivamente, de exposição das células à substância. Guo (2016) avaliaram a citotoxicidade da *Aloe vera* em linhagens HeLa e HepG2 e, obtiveram IC 50 413,9 e 439,0 mg/mL, respectivamente, o que mostra a deficiência de ensaios em células da epiderme e derme humana nas avaliações de citotoxicidade.

Como já aludido, a necessidade de teste para avaliar o potencial de irritação cutânea, dermatotoxicidade e hepatotoxicidade é imprescindível para elucidar a possibilidade de usar um ativo em cosméticos. Porém, ainda são necessários estudos realizados utilizando as linhagens celulares HaCat, HDFa e HepG2, assim, se tornando complexa a comparação de dados.

5.8. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O uso de plantas com função antimicrobiana e antisséptica é conceituada na medicina tradicional e descende de milhares de anos. Muitos estudos se baseiam nessas e outras propriedades de plantas para alavancar pesquisas. Dentre vários metabólitos que possuem atividade antimicrobiana, destacam-se os compostos fenólicos. Na jabuticaba, o composto fenólico que se apresenta em maior quantidade é a cianidina-3-glicosídeo, pertencente à classe das antocianinas. Os compostos fenólicos causam morte de microrganismos por causarem disfunções estruturais e/ou funcionais na membrana do patógeno (SAKKAS *et al.*, 2017; INADA *et al.*, 2017; CIANCIOSI *et al.*, 2018). Para este ensaio, foram utilizados os delineamentos das placas presentes nas Figuras 17 e 18.

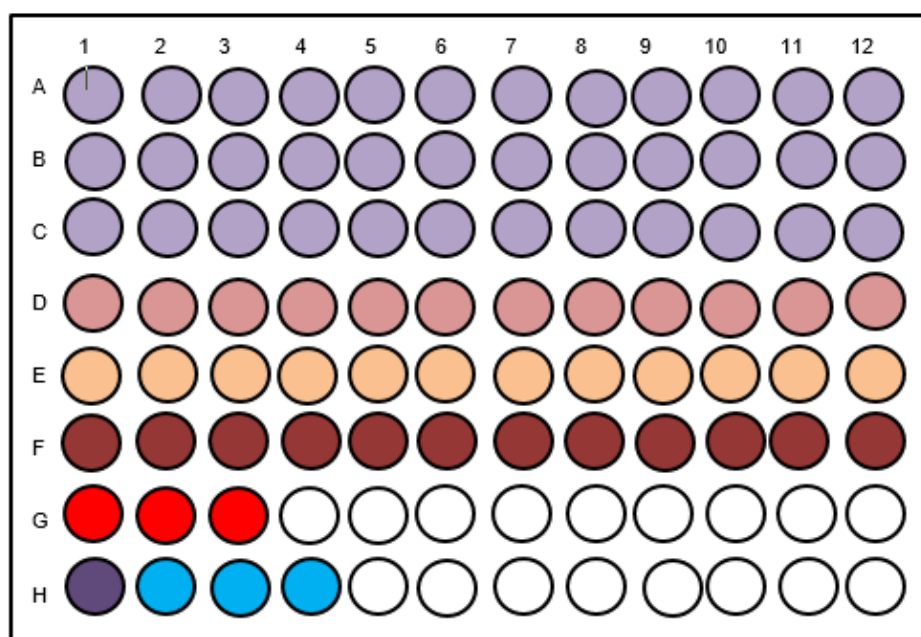
Figura 17. Delineamento utilizado no ensaio para análise de atividade antimicrobiana das cepas bacterianas.



Legenda

-  Diluição seriada do extrato da casca de jabuticaba liofilizado (100,00 mg/mL a 0,04 mg/mL).
-  Controle positivo com o antimicrobiano
-  Controle negativo – cultura do microrganismo
-  Controle do meio de cultura
-  Controle de crescimento microbiano do extrato da jabuticaba
-  Controle de crescimento da água estéril

Figura 18. Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana da cepa *C. albicans*.



Legenda

- Diluição seriada do extrato da casca da jabuticaba liofilizado (100,00 mg/ml a 0,04 mg/ml)
- Controle positivo com Fluconazol
- Controle negativo - cultura do microrganismo
- Controle positivo com Anfotericina B
- Controle do meio de cultura
- Controle do crescimento microbiano do extrato da jabuticaba
- Controle do crescimento microbiano da água estéril

A partir desse delineamento, foram obtidos os seguintes resultados para cada tipo de cepa de microrganismo, expressos em CIM, CBM ou CFM. A CIM ou Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração de extrato que inibe o crescimento microbiano visível, CBM ou Concentração Bactericida Mínima é a menor concentração que culmina na morte de 99,9% das bactérias e

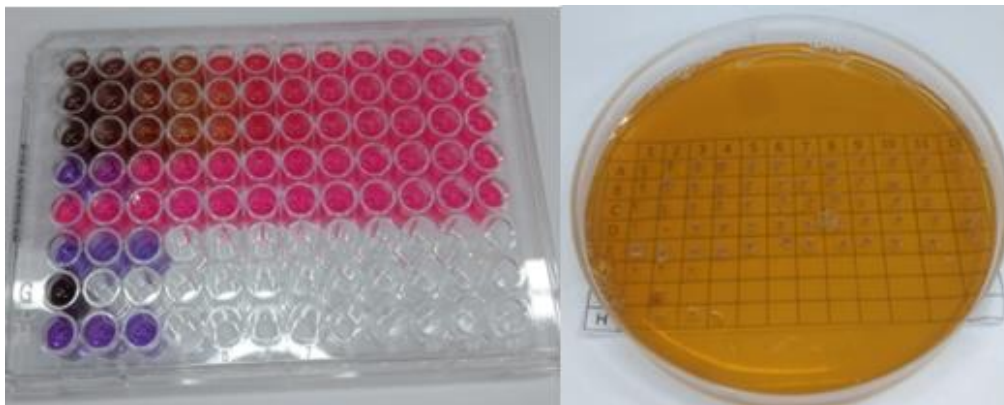
CFM ou Concentração Fungicida Mínima é a menor concentração que culmina na morte de 99,9% dos fungos (SOUZA, 2007; CLSI, 2008; CLSI, 2015).

5.8.1. *Escherichia coli*

A *E. coli* é classificada como bactéria Gram-negativa, com forma de bastonetes, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Habita, principalmente, o trato intestinal inferior dos homens, sendo considerada um indicador de poluição fecal ou, também chamados, coliformes fecais. Pode causar algumas doenças como infecções urinárias, septicemias, meningites, problemas intestinais, entre outras comorbidades. Está presente em diferentes sistemas, tendo um tempo de vida e reprodução rápidos, podendo ser considerada comensal ou patogênica dependendo do organismo ou local de colonização (SOUZA, 2007; JANG *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2019).

Devido sua plasticidade, têm apresentado grande taxa de genes de resistência aos antibióticos presentes em seus plasmídeos, sendo considerada um risco à saúde humana. Com isso, é necessário de pesquisa para novos compostos que sejam capazes de inibir ou extinguir o crescimento dessas cepas (SOUZA, 2007; JANG *et al.*, 2017). Dessa forma, o ensaio de atividade antimicrobiana do extrato da casca da jabuticaba em *E. coli* foi realizado e apresentado na Figura 19, mostrando que o extrato foi efetivo na inibição desta cepa.

Figura 19. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *E. coli*.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

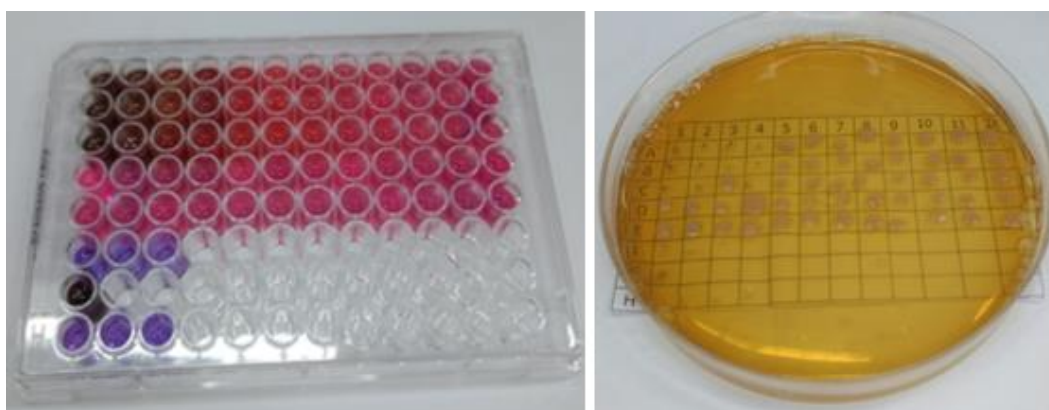
Como observado, as maiores concentrações do extrato da jabuticaba são fortemente coloridas, incapacitando a confirmação da CIM com a coloração da resazurina; porém, o CBM obtido foi de 100 mg/mL e a concentração do controle positivo (Ampicilina) foi de 12,5 µg/mL. Albuquerque *et al.* (2019) avaliou a casca seca e liofilizada da jabuticaba sem passar por processos de extração em cepas de *E. coli* obtendo um CIM de 20 mg/mL. Enquanto Fu, Lu e Zhou (2016) avaliaram o extrato de goiaba, que pertence à mesma família que a jabuticaba, obtendo CIM de 625,0 mg/mL e CBM de 1250,0 mg/mL, com isso, pode ser evidenciado que o resultado do extrato da jabuticaba foi superior ao extrato de goiaba, porém, menos eficiente se comparado ao resultado obtido pela casca seca e liofilizada.

5.8.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um bacilo Gram-negativo tipificado como patógeno oportunista, sendo responsável pelo agravamento de dermatoses, feridas provocadas por queimaduras e problemas pulmonares, principalmente em pacientes imunologicamente comprometidos. É caracterizado por sua elevada resistência à antibióticos e associações de fármacos, sendo considerado um problema à saúde, sobretudo às infecções hospitalares. O mecanismo que a *P. aeruginosa* rompe a

barreira do epitélio ainda não está bem elucidado, entretanto, quando ocorre, pode causar até necrose tecidual. Devido à elevada taxa de resistência e incidência, a pesquisa de novas possibilidades de tratamento para este microrganismo tem sido amplamente estudada (BERUBE *et al.*, 2015; MORADALI *et al.*, 2017; MORAND; MORAND, 2017). Na Figura 20, estão apresentados os resultados obtidos da CIM e CBM do extrato da casca de jabuticaba em cepas de *P. aeruginosa*, mostrando que o extrato foi efetivo na inibição desta cepa.

Figura 20. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *P. aeruginosa*.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

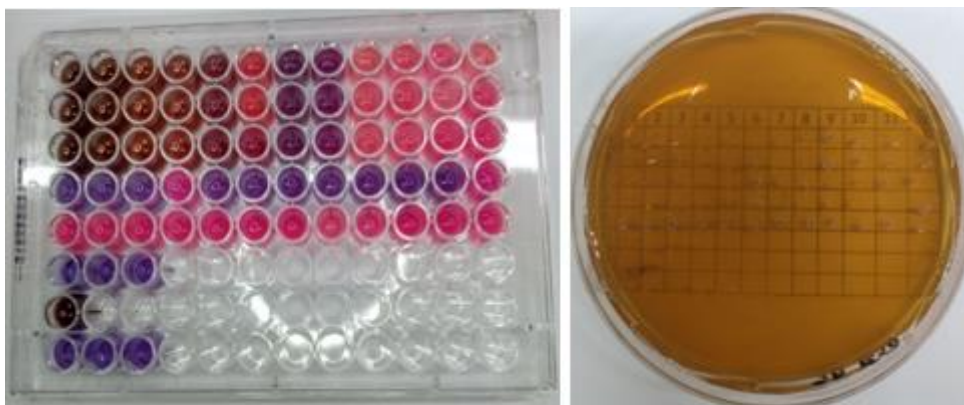
O valor de CIM está indefinido pela coloração do extrato da jabuticaba ser mais pigmentado do que a resazurina. Já o CBM foi de 6,25 mg/mL; ou seja, com esta concentração, houve morte aparente de 99,9% das cepas de *P. aeruginosa*. Esta cepa se apresentou resistente à Ampicilina e Tetraciclina na concentração padronizada (12,5 µg/mL) (CLSI, 2015), assim corroborando com a resistência esperada a antibióticos padrões. Fu, Lu e Zhou (2016) testaram o extrato de goiaba e soluções contendo compostos fenólicos isolados em cepas de *P. aeruginosa*, obtendo os seguintes resultados de MIC: para o extrato de goiaba, a CIM e CBM foram de 312,5 mg/mL, enquanto para ácido gálico, ácido ferúlico e quercetina foram

de 2,5 a 5,0 mg/mL. Os extratos de caqui e da fruta do conde também foram avaliados neste ensaio, apresentando CBM igual a 625,0 e 2500,0 mg/mL respectivamente. Assim, substâncias puras apresentaram um potencial antimicrobiano nesta cepa, superior aos extratos; entretanto, o extrato de jabuticaba foi mais efetivo na inibição da *P. aeruginosa* do que o extrato de goiaba, caqui e fruta do conde.

5.8.3. *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é um bacilo Gram-Positivo, pertencente ao Filo *Firmicutes*. É uma bactéria comensal, porém, oportunista, tendo a possibilidade de ser patogênica. Está associada à diversas doenças, como, sepse, endocardites, pneumonia, artrite, osteomielite e doenças na pele. O *S. aureus* faz parte da microbiota do ser humano, sendo comum na pele e mucosa nasal. Além da resistência a alguns antibióticos, o *S. aureus* desenvolveu fatores de virulência que são capazes de inativar a resposta imunológica do hospedeiro, tornando alvo de diversas pesquisas voltadas a aprofundar conhecimentos e desenvolver técnicas de suporte às doenças causadas por essa bactéria (DAYAN *et al.*, 2016; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Na Figura 21, estão apresentados os resultados obtidos da CIM e CBM do extrato da casca de jabuticaba em cepas de *S. aureus*, mostrando que o extrato foi efetivo na inibição desta cepa.

Figura 21. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *S. aureus*.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

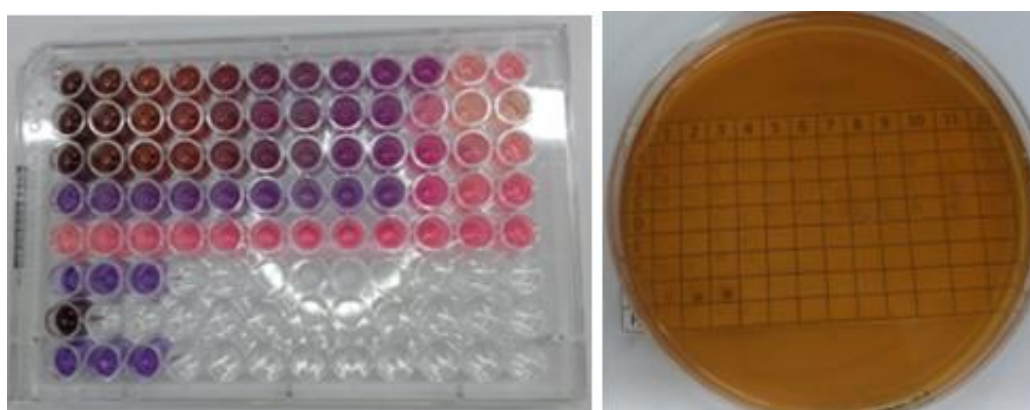
O valor de CIM foi de aproximadamente 1,56 mg/mL. Já o CBM foi de 0,78 mg/mL; ou seja, com esta concentração, houve morte aparente de 99,9% das cepas de *S. aureus*. Fu, Lu e Zhou (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos de caqui (CIM e CBM 312,5 mg/mL), goiaba (CIM 1250,0 mg/mL e CBM 2500,0 mg/mL) e fruta do conde (CIM 1250,0 mg/mL e CBM 2500 mg/mL) para cepas de *S. aureus*. Saddiq e Al-Ghamdi (2018), avaliaram o potencial antimicrobiano da *Aloe vera* em cepas de *S. aureus* obtendo um CIM de 20 mg/mL. Assim, o extrato da casca da jabuticaba obteve um desempenho superior na avaliação da atividade antimicrobiana quando comparado com os extratos já estudados.

5.8.4. *Staphylococcus epidermidis*

A *S. epidermidis* é uma bactéria Gram-Positiva, pertencente ao Filo *Firmicutes*. É considerada residente da microbiota da pele e mucosas humana, podendo evoluir para patógenos quando entra em contato com a corrente sanguínea ou quando o hospedeiro está imunocomprometido. A produção de biofilme está associada à sua cascata patogênica, dificultando a ação dos antibióticos. Além

disso, está fortemente associada a infecções nosocomiais e quadros de septicemia (KLEINSCHMIDT *et al.*, 2015; HON *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2017; OTTO, M. 2017). Na Figura 22, estão apresentados os resultados obtidos da CIM e CBM do extrato da casca de jabuticaba em cepas de *S. epidermidis*, mostrando que o extrato foi efetivo na inibição desta cepa.

Figura 22. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *S. epidermidis*.



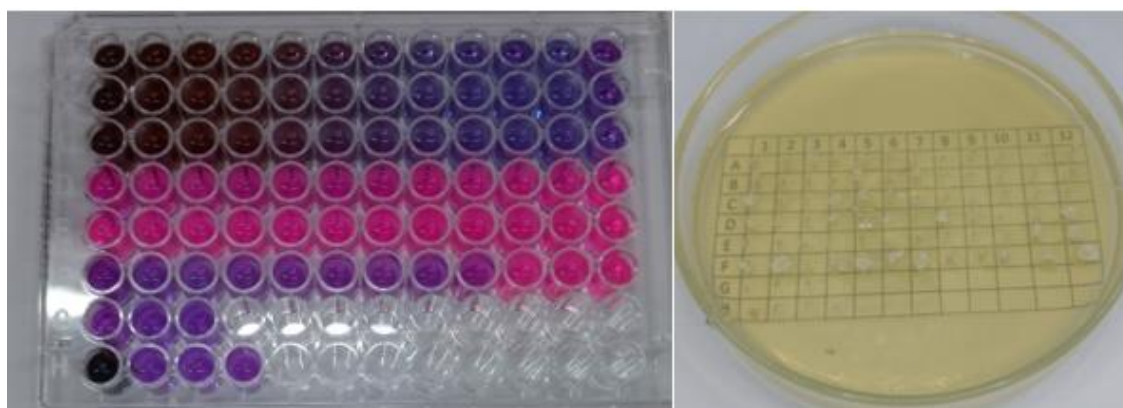
Fonte: arquivo pessoal da autora.

O valor de CIM foi de aproximadamente 0,39 mg/mL. Já o CBM foi de 0,39 mg/mL; ou seja, com esta concentração, houve morte aparente de 99,9% das cepas de *S. epidermidis*. Kamonwannasit *et al.*, 2013 avaliou o potencial antimicrobiano do extrato das folhas da Aquilaria e obteve valores de CIM e CBM de 6,00 e 12,00 mg/mL, respectivamente. Enquanto Fu, Lu e Zhou (2016) avaliou o potencial antimicrobiano da goiaba, obtendo CIM de 78,13 mg/L e CBM 156,25 mg/mL. Fu, Lu e Zhou (2016), também avaliaram o extrato do caqui, obtendo CIM e CBM de 625,00 mg/mL. Já o extrato de fruta do conde, obteve valor de CIM de 312,50 mg/mL e CBM 2500,00 mg/mL, mostrando que o extrato da jabuticaba necessita de uma concentração efetiva, na inibição do microrganismo, reduzida.

5.8.5. *Candida albicans*

A *C. albicans* é um fungo diplóide pertencente ao Filo *Ascomycota*. Faz parte da microbiota humana (pele, mucosas, trato gastrointestinal), podendo causar infecções superficiais na mucosa vaginal e bucal, conhecida como Candidíase e, infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos. Algumas cepas já são resistentes aos azóis, por exemplo, Fluconazol, medicamento de primeira escolha e de uso indiscriminado no tratamento de doenças relacionadas à infecção por *C. albicans*. A formação de biofilme tem sido estudada, pois nesta condição, ocorre o aumento da resistência aos antifúngicos (GULATI; NOBILE, 2016; KASHEM; KAPLAN, 2016; GOW NAR, 2017). Na Figura 23, estão apresentados os resultados obtidos da CIM e CFM do extrato da casca de jabuticaba em cepas de *C. albicans*.

Figura 23. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM), obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *C. albicans*.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

O valor de CIM nas maiores concentrações está indefinido pela coloração do extrato da jabuticaba ser mais pigmentado do que a resazurina; porém, nas menores concentrações, houve inibição do crescimento. Na CFM, concentrações menores que 1,56 mg/mL produziram a morte de 99,9% das cepas de *C. albicans*.

Quanto à atividade dos antifúngicos utilizados como controle positivo, o Fluconazol não inibiu o crescimento das cepas, corroborando com os estudos já realizados sobre a resistência de algumas cepas de *C. albicans* aos antifúngicos da classe azóis (GULATI; NOBILE, 2016; KASHEM; KAPLAN, 2016; GOW NAR, 2017). Já a Anfotericina B, pertencente à classe dos polienos, inibiu o crescimento nas maiores concentrações utilizado, só havendo desenvolvimento do fungo nas três menores concentrações de extrato.

O estudo de plantas que tenham atividade antifúngica tem sido muito explorado, tanto com efeito sinérgico quanto atuando exclusivamente. Extratos de *Aloe vera*, guaraná e mamona, já foram estudados, e até o presente momento, não apresentaram atividade antimicrobiana em cepas de *C. albicans*. O extrato glicólico de regaliz (alcaçuz) apresentou CFM de 50 mg/mL, assim como o extrato glicólico de romã (ZIDA *et al.*, 2017).

Estudos realizados avaliam que compostos aromáticos estão fortemente ligados à atividade antifúngica de diversas plantas. Compostos fenólicos têm grande atividade antimicrobiana, contra *C. albicans*, destacam-se os compostos fenólicos, como ácido gálico, ácido elágico, ácido ferúlico e ácido cafeico. Um extrato é composto por diversos compostos que, possivelmente, apresentam sinergia entre si, resultando num elevado ou reduzido potencial antimicrobiano (NOHYNEK *et al.*, 2006; HAGHDOOST *et al.*, 2016; LOURENÇÃO *et al.*, 2017).

5.9. Análise da produção de colágeno em células HDFa

É sabido que o envelhecimento da pele dá-se cronologicamente e, também, principalmente, pela exposição prolongada à radiação solar, denominado fotoenvelhecimento. Ambos afetam grandemente a pele, sendo de maneira muito parecida; porém, o fotoenvelhecimento acontece de maneira mais rápida e cumulativa. A derme é composta, em grande parte, por matriz colágena, a qual confere resistência mecânica e elástica (KOHL *et al.*, 2011; RITTIE; FISHER, 2015).

As alterações causadas na estrutura proteica do colágeno tipo I, o mais abundante na pele, são extremamente relevantes no envelhecimento da pele. Esse

enfraquecimento e degradação das fibras do colágeno favorecem a perda de resistência e elasticidade, além de favorecer a formação de rugas e até cria um microambiente para formação de tumores. Além da degradação do colágeno existente, o envelhecimento e/ou fotoenvelhecimento estimula a hipocolagênese, ou seja, a redução na produção de novas fibras de colágeno (RITTIE; FISHER, 2015; CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2019).

Com isso, torna-se extremamente relevante o estudo de substâncias que aumentem a produção de colágeno nos nossos fibroblastos a fim de reduzir os impactos do envelhecimento cronológico e do fotoenvelhecimento. Nas figuras 24 e 25 apresentam os resultados da avaliação da produção de colágeno de diferentes concentrações do extrato da casca da jabuticaba. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism utilizando o teste de ANOVA One Way com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$ (letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ^{a,b,c,d}).

Figura 24. Porcentagem de produção de colágeno utilizando diferentes concentrações do extrato da casca da jabuticaba comparando com o controle negativo (CN).

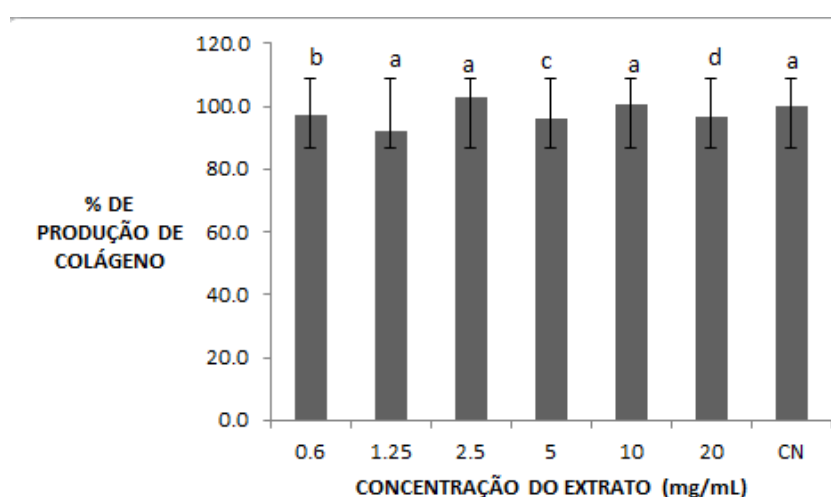
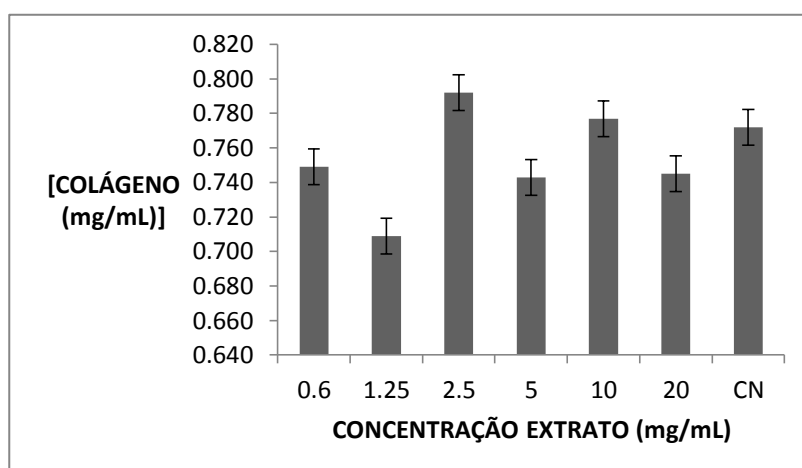


Figura 25. Concentração de colágeno produzido (mg/mL) utilizando diferentes concentrações do extrato da casca da jabuticaba comparando com o controle negativo (CN).



A linhagem HDFa foi escolhida para avaliar o potencial do extrato da casca da jabuticaba em induzir a produção de colágeno comparado ao controle negativo, que se trata, apenas, do meio de cultura. O uso de 2,5 mg/mL do extrato produziu aproximadamente 0,8 mg/mL de colágeno, havendo um incremento na produção de colágeno em 102,6%.

Almeida-Cincotto (2016) avaliou o potencial de produção de colágeno do extrato de amora, porém não obteve um resultado favorável comparado à citotoxicidade da fruta. Ma *et al.* (2019), avaliou a produção de colágeno de compostos fenólicos extraídos do extrato de uma espécie de orquídea (*Dendrobium loddigesii*), quando obteve elevada atividade antioxidante; porém, baixa produção de colágeno, sendo que a maioria dos compostos não apresentou atividade.

6.0. Avaliação do potencial de cicatrização em células HDFa

Uma das funções da pele é a proteção, sendo esta uma das mais importantes, pois participa diretamente na sobrevivência do ser humano. Uma pele injuriada, seja por acidente ou processo intencional, ocasiona uma abertura para

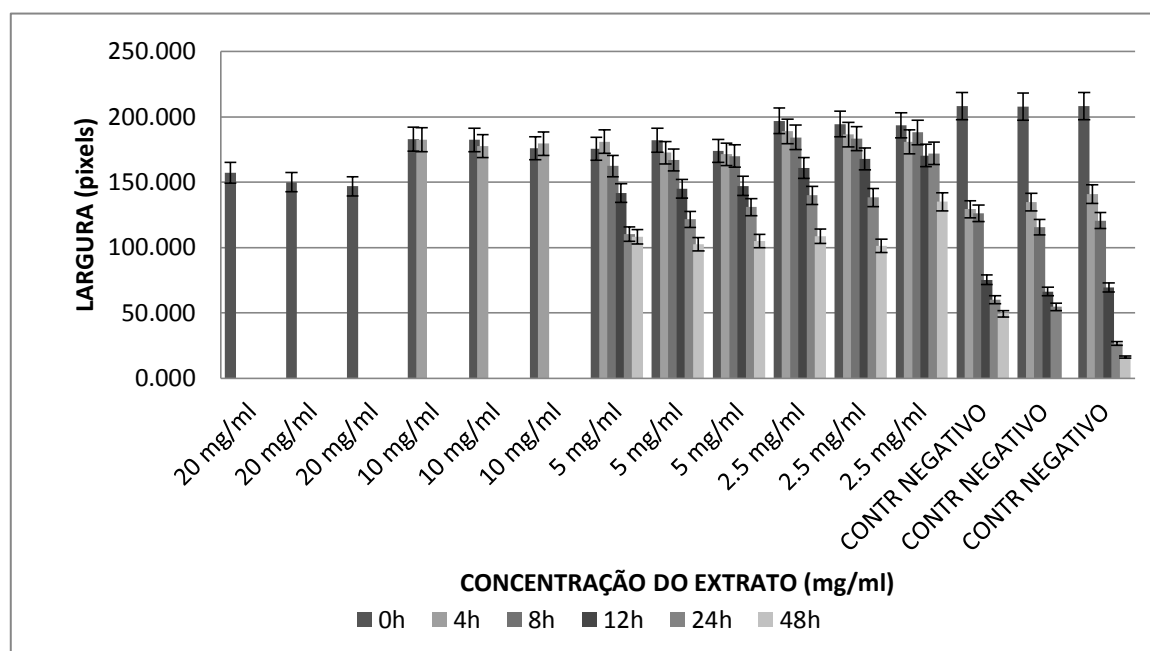
qualquer tipo de microrganismo, sendo patogênico ou não, adentrar ao corpo, por exemplo. Uma falha na reepitelização pode ocasionar a desidratação, infecções e até a morte. A resposta dos fibroblastos determina o resultado da cicatrização, sendo células de extrema importância na migração e proliferação no tecido lesionado. Porém, para o processo de cicatrização seja eficiente, são necessárias diversas etapas com muitas células e fatores bioquímicos (TAKEO; LEE; ITO, 2015).

A fim de evitar a perda de sangue e contaminação, a cicatrização deve acontecer o mais rápido possível. As etapas da cicatrização (homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento) devem ocorrer de forma coordenada variando o tempo de cada etapa conforme o tamanho da ferida. Porém, todos os mecanismos de início e manutenção da cicatrização ainda não são bem elucidados (DEKONINCK; BLANPAIN, 2019).

Na última etapa da cicatrização, chamada de remodelamento, deve ocorrer um balanço fino em relação à proliferação e apoptose das células, pois nesta etapa ocorrem os excessos de cicatrização gerando cicatrizes inestéticas e queloides. Assim, para ser eficaz, o processo de cicatrização também não deve ocorrer de maneira excessiva (WANG *et al*, 2018).

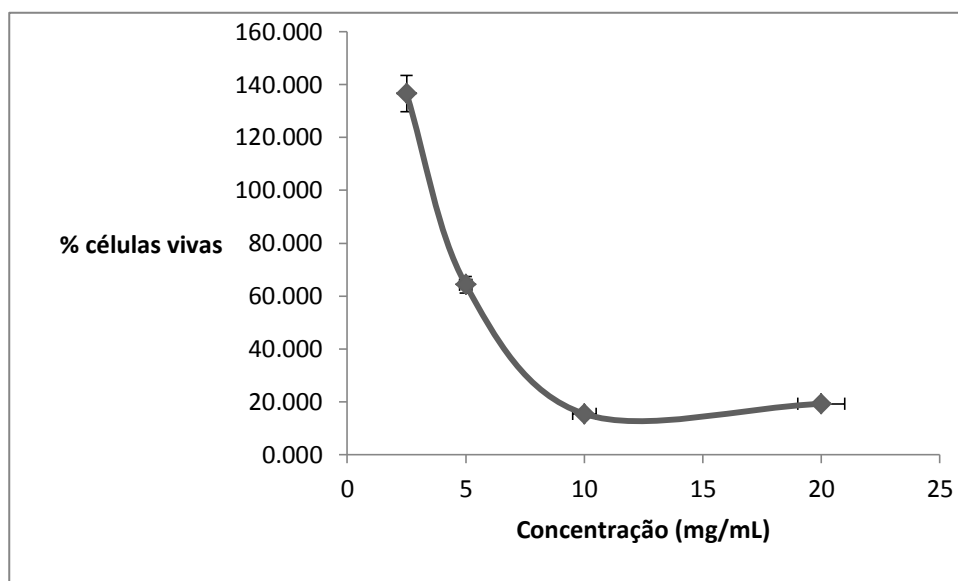
Com isso, o estudo de substâncias que aumentem ou diminuam o processo de cicatrização nos nossos fibroblastos a fim de acelerar o processo de cicatrização ou, também, reduzir a proliferação para evitar uma cicatrização inestética torna-se extremamente relevante. Na figura 26 apresentam os resultados da avaliação do potencial de cicatrização de diferentes concentrações do extrato da casca da jabuticaba. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism utilizando $p < 0,05$. As imagens coletadas foram avaliadas utilizando o *software* Image J a fim de medir a largura do arranhão feito em função do tempo proposto.

Figura 26. Avaliação do processo de cicatrização pela largura do arranhão de diferentes concentrações de tratamento em função do tempo.



Ao observar o gráfico, é possível afirmar que o controle negativo, cuja constituição foi de meio de cultura com 5% de soro fetal bovino obteve um melhor desempenho na redução da largura do arranhão em relação ao tempo que os demais tratamentos. Porém, os extratos nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL também apresentaram um estreitamento da largura do arranhão em relação ao tempo exposto. Os extratos com concentração superior a 10 mg/mL levaram a uma degradação das células, não apresentando características de células viáveis logo nas primeiras imagens. Ao final das 48 horas, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando o corante MTT a fim de avaliar a viabilidade celular, sendo obtido o resultado presente na Figura 27.

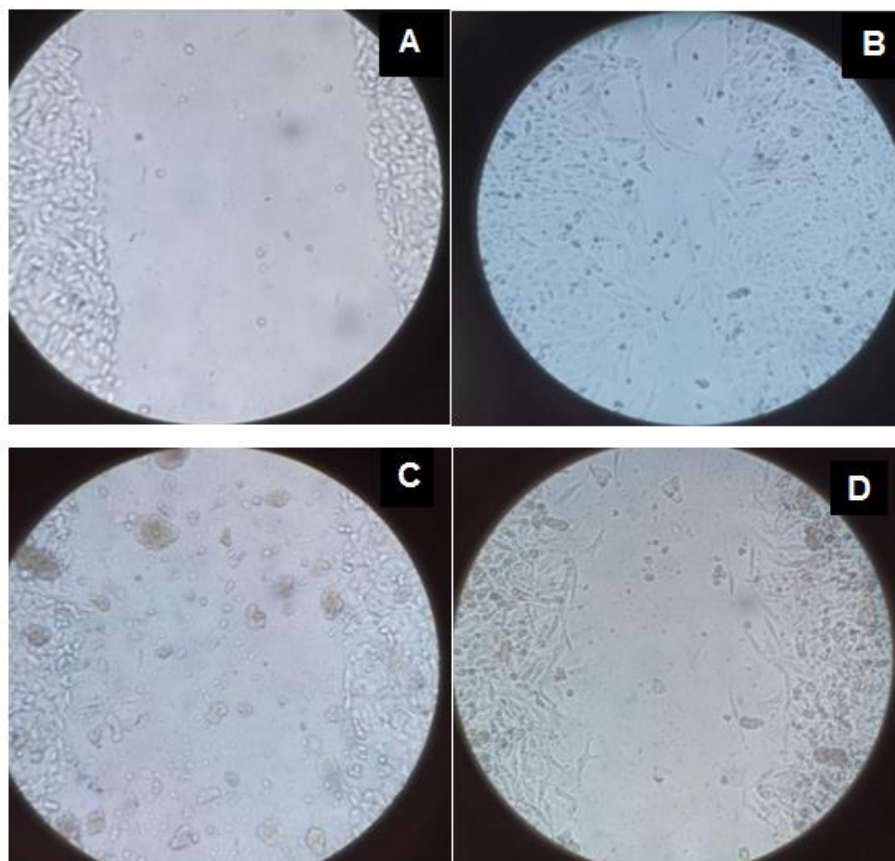
Figura 27. Porcentagem de células vivas em relação à concentração dos tratamentos utilizados no ensaio de avaliação do potencial de cicatrização utilizando células HDFa.



O resultado da viabilidade celular após 48 horas de contato do tratamento nas células HDFa axiliam na discussão sobre as características histológicas inviáveis dos tratamentos com concentração superior avaliadas (10,0 e 20,0 mg/mL), que levou a morte celular. Entretanto, o controle negativo e as menores concentrações do extrato (2,5 e 5,0 mg/mL) mantiveram uma viabilidade superior à 50% de células viáveis.

A Figura 28 exemplifica o perfil de cicatrização encontrado durante o ensaio. Nesta imagem é possível visualizar as características das células logo após sofrerem a lesão e, após 48 horas de tratamento, o perfil de migração das células a margem do arranhão com o intuito de fechar a lesão.

Figura 28. Perfil de cicatrização do controle negativo (A – tempo 0 hora e B – tempo 48 horas) e do extrato da casca da jabuticaba com concentração de 2,5 mg/mL (C- tempo 0 hora e D – tempo 48 horas).



Há milhares de anos, diferentes povos usam plantas e seus derivados na medicina. Logo, no auxílio da cicatrização não seria diferente. Muitas plantas possuem ativos que aceleram ou reduzem o processo de cicatrização. Sendo muito relevante seu estudo mais aprofundado. Se tratando de pele, o uso desses ativos incorporados de bases cosméticas torna-se uma associação coerente. Exemplos de ativos já estudados no âmbito da cicatrização são: a bromélia, que possui atividade proteolítica, anti-inflamatória e cicatrizante; o própolis, rico em compostos fenólicos, relevante na cicatrização de feridas causadas pelo diabetes; a centella asiática, utilizada por muito tempo na medicina asiática para acelerar a cicatrização; e a romã, considerada um alimento cicatrizante (ARTEM ATAIDE *et al.*, 2018). O óleo de Rosa Mosqueta é muito utilizado para auxiliar na cicatrização, mas também tratando cicatrizes inestéticas (ARTEM ATAIDE *et al.*, 2018; KHEZRI *et al.*, 2019).

Machado (2018) e seus colaboradores testaram diferentes extratos obtidos a partir da farinha da casca da jabuticaba, obtendo resultados promissores na cicatrização *in vivo*. Porém, como visto o ensaio realizado *in vitro* não apresentou uma taxa de cicatrização superior ao controle negativo. Mas é válido ressaltar que o processo de cicatrização é extremamente complexo e ainda não foi totalmente elucidado, mas se sabe que é dependente de diferentes células, citocinas, mediadores, sistema vascular e imunológico. Sendo muito complexa a reprodução *in vitro* e com resposta muito diferentes dos ensaios *in vivo* (UD-DIN; BAYAT, 2017; WALLACE *et al.*, 2020; OZGOK KANGAL; REGAN, 2020).

6. CONCLUSÃO

O uso do extrato da casca da jabuticaba, considerado um resíduo industrial, apresentou resultados promissores como ativo cosmético multifuncional. Obteve elevada solubilidade em solventes compatíveis com a pele. Ampla absorbância nas regiões referentes às radiações UVA e UVB na varredura espectrofotométrica. Elevada concentração de marcadores fitoquímicos, cianidina-3-glicosídeo e vitamina C. Também apresentou elevada taxa de atividade antioxidante, se comparada a outras frutas pertencentes à mesma família.

Além disso, apresentou excelentes parâmetros de irritação cutânea, citotoxicidade cutânea, dermatotoxicidade e hepatotoxicidade *in vitro* importantes para o uso seguro do extrato em formulações cosméticas. Apresentou um relevante potencial hepatoprotetor, resultado pertinente para evitar intoxicações caso o ativo chegue à corrente sanguínea e seja processado no fígado.

Pôde-se estabelecer CIM, CBM e CFM das cepas comensais e patogênicas mais comuns presentes na pele, sendo considerável no tratamento coadjuvante e prevenção de diversas disfunções de pele.

E, também, estabelecer a potencialidade do extrato na indução da produção de colágeno, fator importante na redução dos dados do envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento.

Foi avaliado o potencial de cicatrização *in vitro*, obtendo resultados relevantes para pesquisas futuras.

7. REFERÊNCIAS

- ABDUL KARIM, A.; AZLAN, A.; ISMAIL, A.; HASHIM, P.; ABD GANI, S. S.; ZAINUDIN, B. H.; ABDULLAH, N. A. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, Article number: 381, 2014. doi:10.1186/1472-6882-14-381
- AHMED, Idris Adewale et al. Natural anti-aging skincare: role and potential. **Biogerontology**, v. 21, n. 3, p. 293-310, 2020.
- ALBUQUERQUE, B. R.; PEREIRA, C.; CALHELHA, R. C.; JOSÉ ALVES, M.; ABREU, R. M. V.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Jaboticaba residues (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food Chemistry**.v. 309, 125735, 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2019.
- AL-MADHAGI, Wafa M. et al. Chemical profiling and biological activity of *Peperomia blanda* (Jacq.) Kunth. **Peer J**, v. 6, p. e4839, 2018.
- ALMEIDA-CINCOTTO, Maria Gabriela José de. **Extrato de folhas de *Morus nigra* L.: prospecção de novo ativo e sua aplicação em produto cosmetodermatológico**. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2016.
- ALMEIDA-CINCOTTO, Maria Gabriela José et al. FM. Avaliação do potencial citotóxico e do potencial em estimular a biossíntese de colágeno de extrato de folhas de *Morus nigra* L. em cultura celular. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, 2016.
- ALVES, Natália Cristina. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. **Amazônia: Science & Health**, v. 3, n. 4, p. 36-43, 2015.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010b.

ARAUJO, V. F. P. **Desenvolvimento de bebidas lácteas com polpa de abacaxi e farinha da casca de jabuticaba**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, 2016.

ARTEM ATAIDE, Janaína et al. Natural actives for wound healing: A review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1664-1674, 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos – Caderno de Tendências para 2019 e 2020. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

ATES, G.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V.; RODRIGUES, R. M. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. **Cell Viability Assays**, p. 19–26, 2017. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_2

BACANLI, Merve et al. Assessment of cytotoxicity profiles of different phytochemicals: comparison of neutral red and MTT assays in different cells in different time periods. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 95, 2017.

BAILÃO, E.; DEVILLA, I.; DA CONCEIÇÃO, E.; BORGES, L. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.10, p. 23760–23783, 2015. doi:10.3390/ijms161023760.

BALASUBRAMANIAN, D.; HARPER, L.; SHOPSIN, B.; TORRES, V. J. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, v. 75, n.1, ftx005, 2017. doi:10.1093/femspd/ftx005.

BARROS, H. D. F. Q.; BASEGGIO, A. M.; ANGOLINI, C. F. F.; PASTORE, G. M.; CAZARIN, C. B. B.; MAROSTICA-JUNIOR, M. R. Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). **Food Research International**. v. 124, p. 16-26, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.010>.

BENJATIKUL, K.; MAHAMONGKOL, H.; WONGTRAKUL, P. Sunscreen Properties of Marl. **Journal of Oleo Science**, v. 69, n. 1, p. 73–82, 2020. doi:10.5650/jos.ess19232.

BERUBE, B. J.; RANGEL, S. M.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. **Current Genetics**, v. 62, n. 1, p. 109–113, 2015. doi:10.1007/s00294-015-0522-x

BLACK, J. **Biological performance of material**: Fundamentals of Biocompatibility. 4th. ed. New York: Marcel Dekker, 1992.

BORELLO, E.; DOMENICI, V. Determination of Pigments in Virgin and Extra-Virgin Olive Oils: A Comparison between Two Near UV-Vis Spectroscopic Techniques. **Foods**, v. 8, n. 1, p. 18, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/foods8010018>.

BORGES, F. D. S.; SCORZA, F. A. **Terapêutica em Estética**: conceitos e técnicas. 1 .ed. São Paulo: Phorte, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Seguran%C3%A7a+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>.> Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

BUCCI, P.; PRIETO, M. J.; MILLA, L.; CALIENNI, M. N.; MARTINEZ, L.; RIVAROLA, V.; MONTANARI, J. Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v. 17, n. 5, p. 889-899, 2017. doi:10.1111/jocd.12436.

CALLONI, C.; SILVA SANTOS, L. F.; MARTÍNEZ, L. S.; SALVADOR, M. Data on cell viability of human lung fibroblasts treated with polyphenols-rich extract from *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel). **Data in Brief**, v. 6, p. 728–731, 2016. doi:10.1016/j.dib.2016.01.028.

CHAMBERS, E. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. Skin Barrier Immunity and Ageing. **Immunology**. v. 160, n. 2, p. 116-125, 2019. doi:10.1111/imm.13152

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects – A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1580-1604, 2018. doi:10.1080/10408398.2017.1422111.

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. Estudo da segurança de cosméticos: Presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33 n. 3, p. 323-330, 2012.

CHIARI, Bruna Galdorfini. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011.

CIANCIOSI, Danila et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2322, 2018.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 0-1, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, informational supplement M7-A10.** Wayne, PA: CLSI, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, informational supplement M27-A3.** CLSI, Wayne,PA: CLSI, 2008.

CORRÊA, Gabriela de Oliveira Prado. **Avaliação in vitro da citotoxicidade e potencial de irritação de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos.** 2018. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas 2018.

DAYAN, G. H.; MOHAMED, N.; SCULLY, I. L.; COOPER, D.; BEGIER, E.; EIDEN, J.; ANDERSON, A. S. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 11, p.1373–1392, 2016. doi:10.1080/14760584.2016.1179583

DELONINCK, S.; BLANPAIN, C. Stem cell dynamics, migration and plasticity during wound healing. **Nature Cell Biology**, 21(1), 18–24, 2019. doi:10.1038/s41556-018-0237-6.

DONADIO, L. C. **Jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba (vell.) Berg*]**. Jaboticabal: Funep, 2000. 55 p.

FARSHORI, N.N.; AL-SHEDDI, E.S.; AL-OQAIL, M.M.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A.A.; SIDDIQUI, M.A. Cytotoxicity assessments of *Portulaca oleracea* and *Petroselinum sativum* seed extracts on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). **Asian Pacific Journal of Cancer Prev**, v. 15, n. 16, p. 6633-6638, 2014. doi:10.7314/apjcp.2014.15.16.6633

FU, L.; Lu, W.; Zhou, X. Phenolic Compounds and In Vitro Antibacterial and Antioxidant Activities of Three Tropic Fruits: Persimmon, Guava, and Sweetsop. **BioMed Research International**, p. 1–9, 2016. doi:10.1155/2016/4287461.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; de SOUZA, P.; dos REIS LÍVERO, F. A. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, 112169, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112169>.

GAWRON, Grzegorz et al. Nigella sativa seed extract applicability in preparations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effects on human dermal fibroblasts viability. **Journal of ethnopharmacology**, v. 244, p. 112135, 2019.

GOMEZ PEREZ, M.; FOURCADE, L.; MATEESCU, M. A.; PAQUIN, J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 43–46, 2017. doi:10.1016/j.ab.2017.07.027

GOW NAR, Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. **Microbiology**, v. 163, n. 8, p. 1145-1147, 2017. doi:10.1099/mic.0.000499

GU, Y.; HAN, J.; JIANG, C.; ZHANG, Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 59, 101036, May 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101036>.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v.18, n. 5, p. 310–321, 2016. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.

GUO, X.; MEI, N. Aloe vera: A review of toxicity and adverse clinical effects. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 34, n. 2, p. 77–96, 2016. doi:10.1080/10590501.2016.1166826

HAGHDOOST, N. S.; SALEHI, T. Z.; KHOSRAVI, A.; SHARIFZADEH, A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 4, p. 298–305, 2016. doi:10.1016/j.mycmed.2015.11.004

HALL, John E. **Guyton & Hall Fundamentos de Fisiologia**. Elsevier Brasil, 2017.

HECKER, H.; Johannisson, R.; Koch, E.; Siegers, C.-P. *In vitro* evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. **Toxicology**, v. 177, n. 2-3, 167–177, 2002. doi:10.1016/s0300-483x(02)00189-0.

HON, K. L.; TSANG, Y. C. K.; PONG, N. H.; LEUNG, T. F.; IP, M. Exploring *Staphylococcus epidermidis* in atopic eczema: friend or foe? **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 41, n. 6, p. 659–663, 2016. doi:10.1111/ced.12866.

INÁCIO, Maria Raquel Cavalcanti et al. Total anthocyanin content determination in intact açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1160-1164, 2013.

INADA, K. O. P.; DUARTE, P. A.; LAPA, J.; MIGUEL, M. A. L.; MONTEIRO, M. Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) juice obtained by steam-extraction: phenolic compound profile, antioxidant capacity, microbiological stability, and sensory acceptability. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 52–61, 2017. doi:10.1007/s13197-017-2769-3

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA/MS) PRÓ-ONCO. Estimativas 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/referencias>>. Acesso em: 1 de março de 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”. 3rd. ed. ISO 10993-5, 2009.

JAKASA, I.; THYSSEN, J. P.; KEZIC, S. The role of skin barrier in occupational contact dermatitis. **Experimental Dermatology**. v. 49, p. 135-43. 2018. doi:10.1111/exd.13704

JANG, J.; Hur, H.-G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T.; ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570–581, 2017. doi:10.1111/jam.13468

KAMONWANNASIT, S.; NANTAPONG, N.; KUMKRAI, P.; LUECHA, P.; KUPITTAYANANT, S.; CHUDAPONGSE, N. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. v. 12, 20, 2013. doi:10.1186/1476-0711-12-20

KASHEM, S. W.; KAPLAN, D. H. Skin Immunity to *Candida albicans*. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 7, p. 440–450, 2016. doi:10.1016/j.it.2016.04.007.

KHEZRI, Keyvan; FARAHPOUR, Mohammad Reza; MOUNESI RAD, Shokoofeh. Accelerated infected wound healing by topical application of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 980-988, 2019.

KLEINSCHMIDT, S.; HUYGENS, F.; FAOAGALI, J.; RATHNAYAKE, I. U.; HAFNER, L. M. Staphylococcus epidermidis as a cause of bacteremia. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1859–1879, 2015. doi:10.2217/fmb.15.98

KOHL, E.; STEINBAUER, J.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.-M. Skin ageing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 8, p. 873–884, 2011. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03963.x.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, volume 2018, n. 6, pdb.prot095505, 2018. doi:10.1101/pdb.prot095505

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LEITHARDT, D. R. F.; YAMASHITA, A. N.; BELÉIA, A. D. P. Determinação de isoflavonas e antocianinas em soja preta. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 9 n. 3, p. 112-124, jul./set. 2018.

LERI, Manuela et al. Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1250, 2020.

LI, H.; COLANTONIO, S.; DAWSON, A.; LIN, X.; BEECKER, J. Sunscreen Application, Safety, and Sun Protection: The Evidence. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 23, n. 4, p. 357-369, 2019. doi:10.1177/1203475419856611.

LI, S.-X.; LI, M.-F.; BING, J.; WU, X.-F.; PENG, F.; MA, M.-G. Preparation of organic acid lignin submicrometer particle as a natural broad-spectrum photo-protection agent. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 132, p. 836-843, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.177

LIMA, Annete de Jesus Boari et al . Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal , v. 33, n. 3, p. 877-887, Sept. 2011.

LIN, Tzu-Kai; ZHONG, Lily; SANTIAGO, Juan Luis. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 70, 2018.

LIZIERO, Daniele Franquini Perez et al. Metodologia simplificada para doseamento de ácido ascórbico em extratos vegetais. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 20, n. 2, p. 80-87, 2017.

LORDANI, T. V. A.; DE LARA, C. E.; FERREIRA, F. B. P.; DE SOUZA TERRON MONICH, M.; MESQUITA DA SILVA, C.; FELICETTI LORDANI, C. R.; LONARDONI, M. V. C. Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic **Review. Mediators of Inflammation**, 2018, 1–12, 2018. doi:10.1155/2018/7354250.

LOURENÇÃO BRIGHENTI, F.; SALVADOR, M. J.; VIDAL LACERDA GONTIJO, A.; BOTAZZO DELBEM, A. C.; BOTAZZO DELBEM, Á. C.; SOARES, C. P.; KOGA-ITO, C. Y. Plant extracts: initial screening, identification of bioactive compounds and effect against *Candida albicans* biofilms. **Future Microbiology**, v. 12, 1, p. 15–27, 2017. doi:10.2217/fmb-2016-0094

MA, R.-J.; YANG, L.; BAI, X.; LI, J.-Y.; YUAN, M.-Y.; WANG, Y.-Q.; ZHOU, J. Phenolic Constituents with Antioxidative, Tyrosinase Inhibitory and Anti-aging Activities from *Dendrobium loddigesii* Rolfe. **Natural Products and Bioprospecting**. v. 9, 5, p. 329-336, 2019. doi:10.1007/s13659-019-00219-y

MACHADO, Gustavo Henrique Andrade et al. Antibacterial activity and in vivo wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. **Chemical biology & drug design**, v. 92, n. 1, p. 1333-1343, 2018.

MENDONÇA de ASSIS, P.; CYPRIANO DUTRA, R.; AMARANTE, C. B.; AFONSO MIRANDA CHAVES, M. DAS G. et al. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: toxicological assays, biological activities, and elemental analysis of organic compounds. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2019. doi:10.1080/14786419.2019.1633642

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017. doi:10.3389/fcimb.2017.00039

MORAND, A.; MORAND, J.-J. *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 144, n. 11, p. 666–675, 2017. doi:10.1016/j.annder.2017.06.015

MOSTAFA, E.; FAYED, M. A. A.; RADWAN, R. A.; BAKR, R. O. *Centaurea pumilio* L. Extract and Nanoparticles: A Candidate for Healthy Skin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, 110350. (2019. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110350

NERI-NUMA, I. A.; SORIANO SANCHO, R. A.; PEREIRA, A. P. A.; PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345–360, 2018. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.053

NEVES, N. A.; STRINGHETA, P. C.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jabuticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MS n. **Food Chemistry**, v. 252, p. 61–71, 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.078

NGUYEN, T. H.; PARK, M. D.; OTTO, M. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017. doi:10.3389/fcimb.2017.00090

NOHYNEK, L. J.; ALAKOMI, H.-L.; KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M.; HELANDER, I. M.; OKSMAN-CALDENTEY, K.-M., et al. Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. **Nutrition and Cancer**, v. 54, n. 1, p. 18–32, 2006. doi:10.1207/s15327914nc5401_4

OLIVEIRA, Bárbara Cunha Tesch de. **Produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos industriais da jabuticaba utilizando líquidos iônicos para a quebra da celulose**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018. doi:10.3390/toxins10060252

OSÓRIO, R.M; HEFTI, A.; VERTUCCI F.J.; SHAWLEY AL. Cytotoxicity of Endodontic Materials. **Journal of Endodontics**. v. 24, p. 91-96, 1998.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis: a major player in bacterial sepsis? **Future Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1031–1033, 2017. doi:10.2217/fmb-2017-0143

OZGOK KANGAL, MK.; REGAN, JP. Wound Healing. 2020 Jul 10. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 30571027.

PACKER, JANAINA F.; LUZ; MARISA M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 17, n. 1, p. 102-107, Mar. 2007.

PATHAK, A., MOHAN, R.; ROHRICH, R. J. Chemical Peels. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 145, n. 1, p. 58e–66e, 2020. doi:10.1097/prs.0000000000006346

PETRUK, G.; DEL GIUDICE, R.; RIGANO, M. M.; MONTI, D. M. (2018). Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018, 1–11, 2018. doi:10.1155/2018/1454936

PITZ, H. da S.; PEREIRA, A.; BLASIUS, M. B.; VOYTENA, A. P. L.; AFFONSO, R. C. L.; FANAN, S.; MARASCHIN, M. In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (Plinia peruviana) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, 1–6. doi:10.1155/2016/3403586.

PULLAR, JM.; CARR, AC.; VISSERS, MCM. The Roles of Vitamin C in Skin Health. **Nutrients**. 2017, v. 9, n. 8, p. 866. doi: 10.3390/nu9080866. PMID: 28805671; PMCID: PMC5579659.

REPETTO, G., PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, 7, p. 1125–1131, 2008. doi:10.1038/nprot.2008.75

RIGOLON, Thaís Caroline Buttow. **Predição do conteúdo de antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante dos frutos de amora (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium* sp.) e casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) usando parâmetros colorimétricos**. 2017. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

RITTIE, L.; FISHER, G. J. Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. a015370–a015370, 2015. doi:10.1101/cshperspect.a015370

ROGERO, Sizue Ota et al . Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos , v. 6, n. 3, p. 317-320.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+ Embrapa. Trop. Comun. Técn, 2007.

RUFINO, M. S. M., et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 15, p. 996–1002, 2010.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMÉNEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Metodologia Científica**: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura da radical livre DPPH. EMBRAPA. 2007.

SADDIQ AA, Al-Ghamdi H. Aloe vera extract: A novel antimicrobial and antibiofilm against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Pak J Pharm Sci**. v. 31, n. 5, (Supplementary), p. 2123-2130, 2018.

SAKKAS, Hercules; PAPADOPOULOU, Chrissanthy. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 429-438, 2017.

SHARMA, V.; ANDERSON, D.; DHAWAN, A. Zinc Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Liver Cells (HepG2). **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 98–99, 2011. doi:10.1166/jbn.2011.1220

SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 795–800, 2018. doi:10.2116/analsci.18p014

SOLAI PRAKASH, Ashwin Kumar; DEVARAJ, Ezhilarasan. Cytotoxic potentials of *S. cumini* methanolic seed kernel extract in human hepatoma HepG2 cells. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1313-1319, 2019.

SOUZA, D. G. **Caracterização da farinha da casca de jabuticaba e uso em bebidas lácteas saborizadas com mamão**. 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2016.

SOUZA, Tatiana Maria de. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg.(Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)**. 2007. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de ciências Farmacêuticas, Unesp, 2007.

SRIVASTAVA, R.; ALAM, M. S. Effect of pH and surfactant on the protein: A perspective from theory and experiments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1519–1527, 2018. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.019

SZUSTER, Magdalena et al. Evaluation of the localization and biological effects of PAMAM G3 dendrimer-biotin/pyridoxal conjugate as HaCaT keratinocyte targeted nanocarrier. **Acta Biochimica Polonica**, 2018. DOI: 10.18388/abp.2018_2767.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos versão 4. Campinas: Unicamp, 2011. Disponível em:< https://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 27 de janeiro de 2020.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5n. 1, p. a023267–a023267, 2015. doi:10.1101/cshperspect.a023267

TAOFIQ, Oludemi et al. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 127, p. 228-236, 2019.

THRING, T. S.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. **Journal of Inflammation**, v. 8, 1, 27, 2011. doi:10.1186/1476-9255-8-27

TUTTIS, K.; COSTA, D. L. M. G.; NUNES, H. L.; SPECIAN, A. F. L.; SERPELONI, J. M.; SANTOS, L. C.; SYLLOS CÓLUS, I. M. Pouteria ramiflora (Mart.) Radlk. extract: Flavonoids quantification and chemopreventive effect on HepG2 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, 16, p. 792–804, 2018. doi:10.1080/15287394.2018.1491911

UD-DIN S, BAYAT A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. **Wound Repair Regen**. 2017, v. 25, 2, 164-176, 2017. doi: 10.1111/wrr.12513. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28120405.

WALLACE, HA.; BASEHORE, BM.; ZITO, PM. Wound Healing Phases. 2020 Sep 29. In: StatPearl]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 29262065.

WALTER, Merlin NM et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental cell research**, v. 316, n. 7, p. 1271-1281, 2010.

WANG, P.-H.; HUANG, B.-S.; HORNG, H.-C.; YEH, C.-C.; CHEN, Y.-J.; Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 2, p. 94–101, 2018. doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002

WESTFALL, Alexandra; SIGURDSON, Gregory T.; GIUSTI, M. Mónica. Antioxidant, UV Protection, and Antiphotoreaging Properties of Anthocyanin-Pigmented Lipstick Formulations. **Journal of cosmetic science**, v. 70, n. 2, p. 63-76, 2019.

YEO, J.; SHAHIDI, F. Critical re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 67, n. 26, p. 7526–7529 2019. doi:10.1021/acs.jafc.9b02462

ZHANG, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging. **Cell Transplantation**, 27(5), 729–738. doi:10.1177/0963689717725755

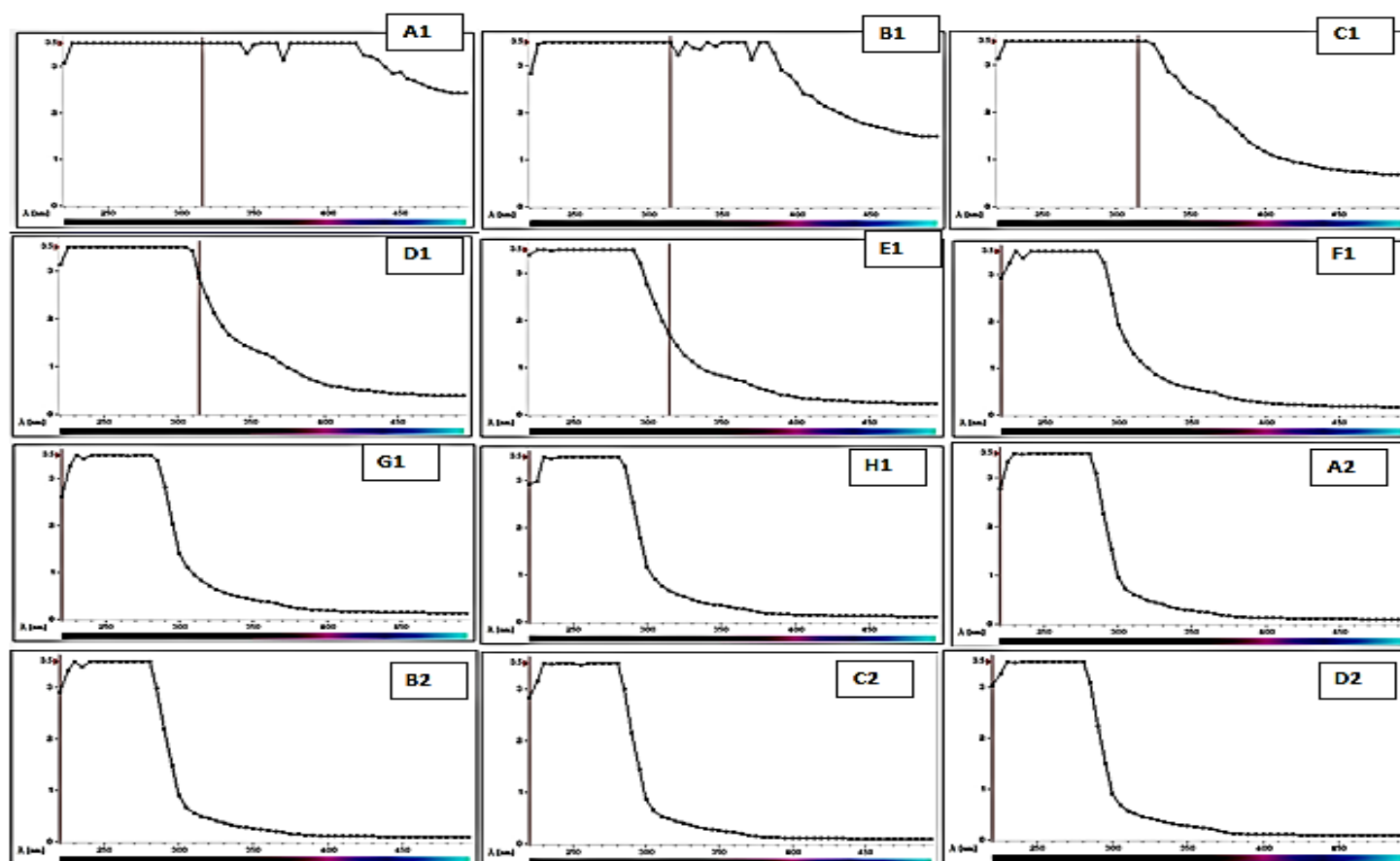
ZHANG, Shi-lin et al. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 2175-2181, 2016.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Anti- Candida albicans natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 1–19, 2017. doi:10.1016/j.mycmed.2016.10.002

ZUCCO, Alba; DE SOUSA, Francisco Santana; DO CARMO ROMEIRO, Maria. Cosméticos naturais: uma opção de inovação sustentável nas empresas. **Brazilian Journal of Business**, v. 2, n. 3, p. 2684-2701, 2020.

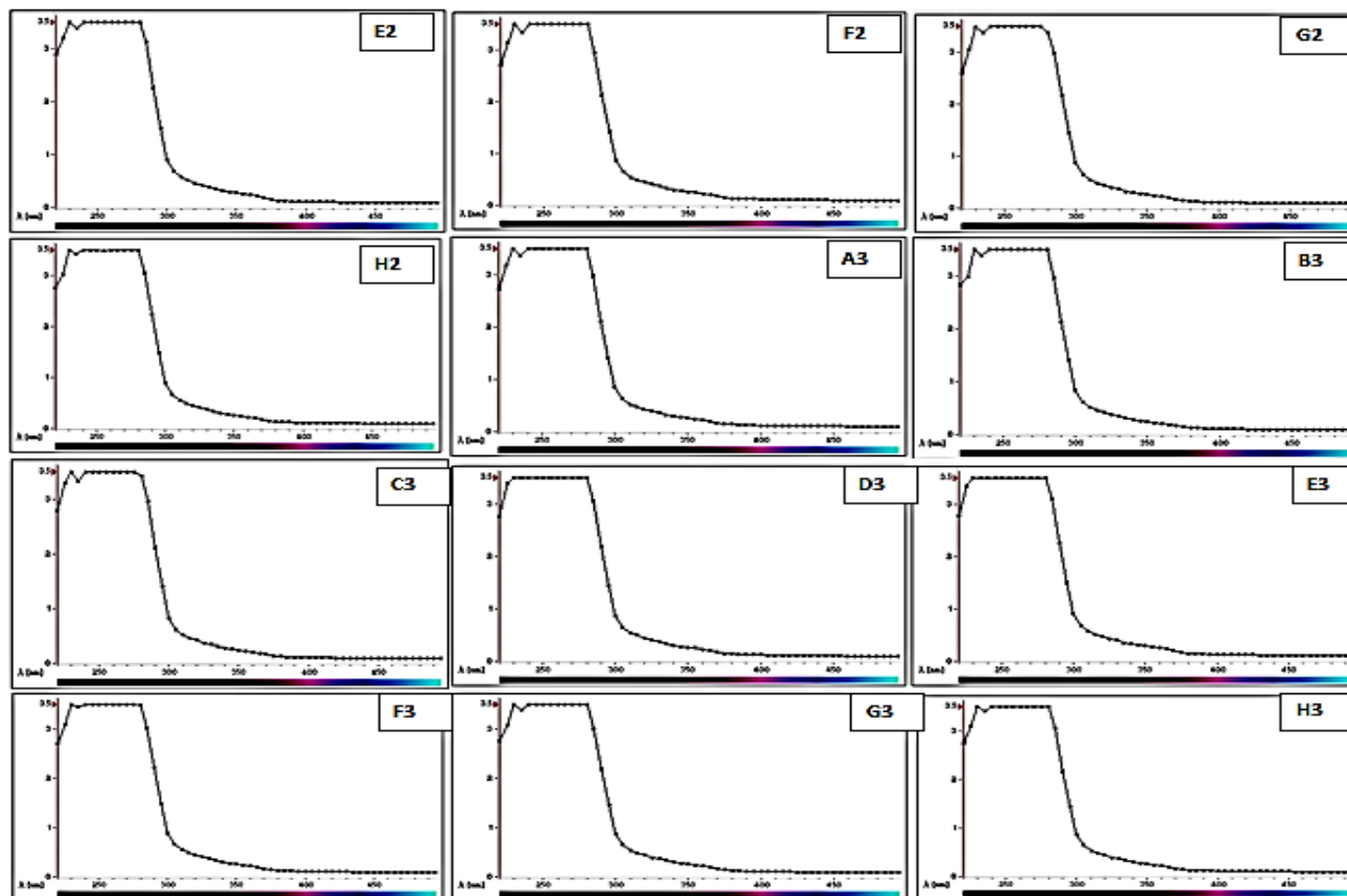
Apêndices

1. Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba, nas concentrações 100 – 0,05 mg/mL, em diluição seriada.



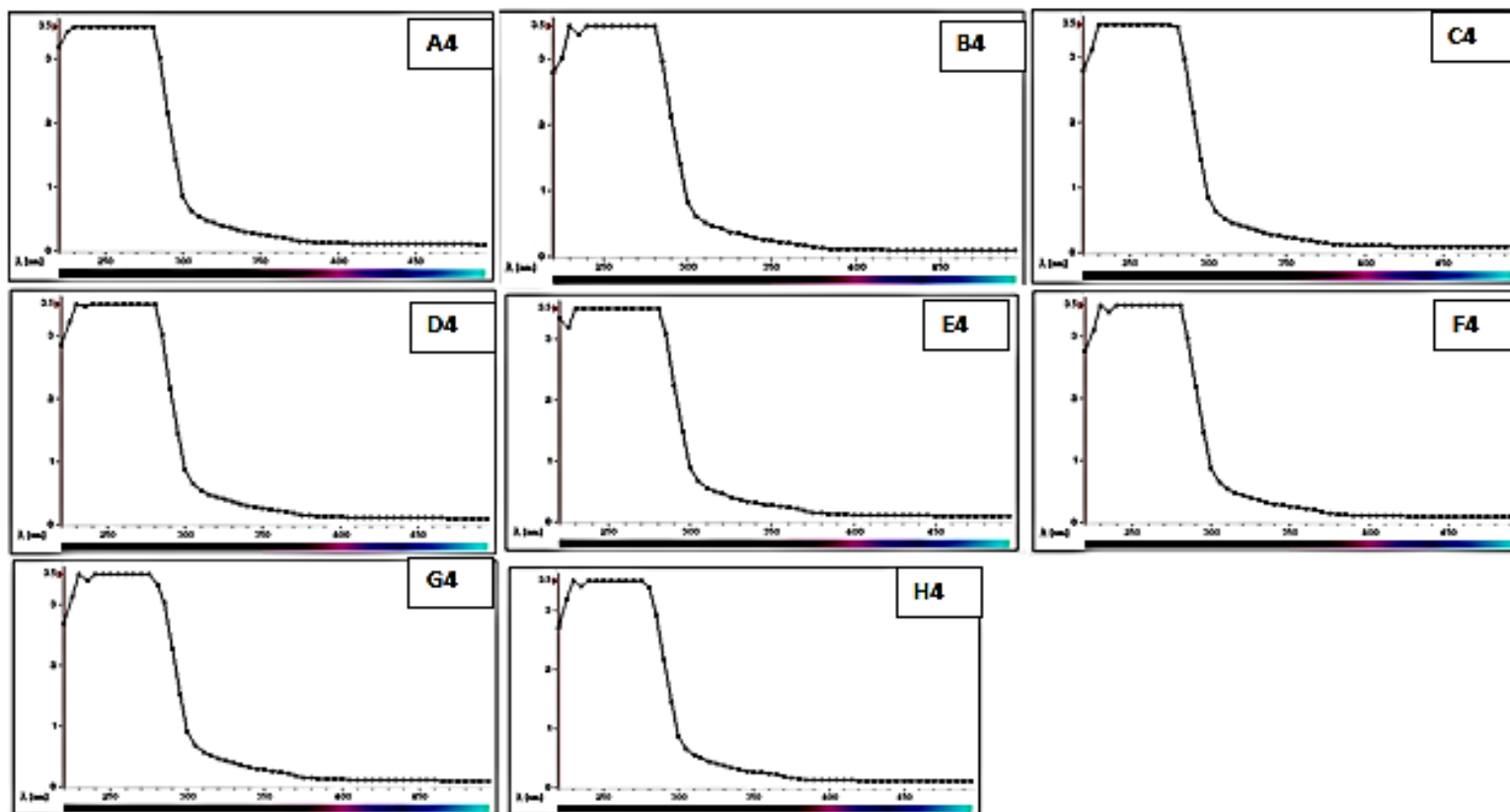
Fonte: arquivo pessoal da autora.

2. Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba, nas concentrações $9,76 \times 10^{-3}$ – $4,77 \times 10^{-6}$ mg/mL, em diluição seriada.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

3. Gráficos de Absorção X Comprimento de onda (nm) das soluções contendo extrato de jabuticaba, nas concentrações $2,38 \times 10^{-6}$ – $1,86 \times 10^{-8}$ mg/mL, em diluição seriada.



Fonte: arquivo pessoal da autora.