UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

UNESP

JANINE MAILHO GIMENIS

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIGLICANTE DO EXTRATO DE *Moringa oleifera* Lamark E INCORPORAÇÃO EM LIPOSSOMAS PARA ANÁLISE DE BIOMETROLOGIA CUTÂNEA

ARARAQUARA

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

UNESP

JANINE MAILHO GIMENIS

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIGLICANTE DO EXTRATO DE *Moringa oleifera* Lamark E INCORPORAÇÃO EM LIPOSSOMAS PARA ANÁLISE DE BIOMETROLOGIA CUTÂNEA

Tese apresentada como requisito à obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Câmpus Araraquara.

Orientador: Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Coorientadora: Profa Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva

ARARAQUARA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Gimenis, Janine Mailho
G491a Atividade antioxidante e antiglicante do extrato de *Moringa oleifera* Lamark e incorporação em lipossomas para análise de biometrologia cutânea / Janine Mailho Gimenis. – Araraquara : [s.n.], 2019
85 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva
Coorientador: Vânia Rodrigues Leite e Silva

1. Antioxidantes. 2. Produtos finais de glicosilação. 3. Flavonoides. 4. Nanotecnologia. 5. Hidratação. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Valéria Aparecida Moreira Novelli - CRB/8 4634

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Atividade antioxidante e antiglicante do extrato de *Moringa oleifera* Lamark e incorporação em lipossomas para análise de biometrologia cutânea"

AUTORA: JANINE MAILHO GIMENIS
ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA
COORIENTADORA: VANIA RODRIGUES LEITE E SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis

Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES
Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Profª. Drª. PATRICIA SOARES SANTIAGO
Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profª Drª ERIKA COSENDEY TOLEDO DE MELLO PEIXOTO
Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP - Bandeirantes

Araraquara, 17 de outubro de 2019

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e amigos, pelo incentivo e apoio que recebi e principalmente, por sempre participarem positivamente da minha vida e vibrarem comigo a cada conquista.

" A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita"

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos meus filhos, ***Clara*** e ***Francisco***, por tanto amor e alegrias que sempre me dão e me impulsionam para ser sempre melhor em todos os sentidos. Vocês são tudo para mim!

A meu marido, ***Sérgio***, meu grande amor, que ao longo destes 26 anos que estamos juntos, de namoro e casados; compreende, respeita e me apoia em desafios pessoais e profissionais.

Aos meus pais, ***Suely e Luiz Carlos***, e a meu irmão ***Carlos Eduardo*** pelo amor incondicional que é a base de tudo o que realmente vale a pena. Me sinto muito feliz e abençoada.

Ao professor ***Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva***, que esteve comigo durante o mestrado e o doutorado, ensinando e acompanhando não somente os trabalhos durante estes estudos, mas colaborando em diversas áreas do conhecimento. Ser humano sábio e com um coração enorme, que tive o privilégio em me orientar! Muito obrigada por toda a orientação, compreensão e confiança.

À minha coorientadora, professora ***Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva***, que logo que me formei me acolheu e me deu a primeira oportunidade profissional. Meus agradecimentos especiais por tudo o que representa em minha vida, tenho o maior carinho e orgulho! Obrigada pela parceria de sempre e por me coorientar nos testes clínicos do meu doutorado, realizados em parceria com a Universidade Federal de São Paulo, campus Diadema, no laboratório de cosmetologia.

Aos amigos que fiz durante este período de mestrado e doutorado no laboratório, ***Amanda da Costa Gomes, Célia Cristina Malaguti Figueiredo, Amanda Martins Viel, Kamille Spera, Pamela Cristina Santos, Gustavo Franciscatti Mecina, Anderson Lourenção, Gustavo Martins e Lucas Lima,*** cada qual com o seu jeito único de ser, ajudaram a me aprimorar em todos os sentidos. Agradeço em especial as meninas que participaram mais dos meus projetos, as amigas ***Amanda da Costa Gomes, Célia Cristina Malaguti Figueiredo e Amanda Martins Viel***, sem vocês este título seria muito mais difícil de ser alcançado, minha eterna gratidão!

À amiga ***Carolina Reis Zambom*** que conheci na Unesp durante as disciplinas do programa e sempre foi muito atenciosa e prestativa e me auxiliou na elaboração e caracterização dos lipossomas no laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, muito obrigada!

Ao ***João Luiz Bronzel Júnior***, técnico de Laboratório NUB do Instituto de Química de Araraquara/UNESP, pelo auxílio nas análises fitoquímicas do meu projeto.

Ao professor ***Dr. Valdecir Farias Ximenes***, pelos auxílios nos testes de fluorescência e por toda a disponibilidade em atender e ensinar.

Ao professor ***Dr. Ricardo Della Coletta***, pelos auxílios nos testes de citotoxicidade em células tumorais.

À professora ***Dra. Patrícia Santos Lopes***, por ter se disponibilizado em me auxiliar nos testes de citotoxicidade.

Ao professor ***Dr. Marcelo Dutra Duque***, por ter colaborado com a realização das análises estatísticas dos testes biofísicos na pele.

À professora ***Dra. Erika Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto***, por ter atendido prontamente o pedido em participar da defesa com os seus valiosos conhecimentos. Meu muito obrigada especial para você!

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de cursar este doutorado e aos funcionários por toda a clareza de informação e atenção com os alunos.

Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista campus Assis, pela disposição e auxílios prestados.

A todos os professores do doutorado, meus sinceros agradecimentos por colaborarem com expertise em minha formação. Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial para a professora ***Marisa Veiga Capela***, que além de professora ímpar de bioestatística, acolheu de forma muito especial eu e minhas amigas que viajamos durante um semestre para assistir as suas aulas. Muito obrigada de coração professora!

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, pelo apoio da realização deste trabalho (código de Financiamento 001).

GIMENIS, J. M. Atividade antioxidante e antiglicante do extrato de *Moringa oleifera* Lamark e incorporação em lipossomas para análise de biometrologia cutânea. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Química, Araraquara/SP.

RESUMO

Novos produtos com ação antioxidante e antiglicante são estudados para indústria cosmética e farmacêutica, pois diversos tratamentos podem ser realizados devido a esta atividade de muitos compostos naturais. Neste contexto, este trabalho permitiu o aumento do conhecimento sobre o extrato bruto hidroetanólico de *Moringa oleifera* LAM, bem como sua encapsulação em lipossomas para estudo do potencial efeito na melhora da hidratação e função barreira da pele, por meio da avaliação da atividade antioxidante e antiglicante *in vitro* e avaliação da eficácia *in vivo* instrumental com equipamentos biometrológicos. Foi realizado o fracionamento do extrato em sílica C18 e análise em HPLC-DAD/MS. A avaliação da atividade antioxidante do extrato foi realizada pelos testes da atividade sequestradora do radical livre DPPH, potencial redutor de ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP), inibição da peroxidação lipídica (TBARS), atividade sequestradora de óxido nítrico (NO) e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL). A avaliação antiglicante do extrato foi avaliada pelo método da mobilidade proteica em eletroforese (MRE), determinação de grupos de amina livres e determinação da fluorescência de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Foi realizada a avaliação da citotoxicidade do extrato pelo método sulforrodamina B e da viabilidade celular pelo método de redução do MTT. Foram preparados os lipossomas vesículas pelo método de hidratação do filme lipídico e as mesmas caracterizadas pelos testes do potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho das partículas e determinada a estabilidade. Foi realizada a avaliação da atividade antioxidante dos lipossomas pelo teste da atividade sequestradora do radical livre DPPH. Foram preparadas formulações e realizados testes clínicos de eficácia instrumental *in vivo* com Corneometer® CM825, Tewameter® TM300 e pHmeter® pH900.

Palavras-chaves: *Moringa oleifera* LAM.; Antioxidantes; Lipossomas; Biometrologia Cutânea.

GIMENIS, J. M. Antioxidant and antioxidant activity of *Moringa oleifera* Lamark extract and incorporation into liposomes for skin biometrology analysis. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Química, Araraquara/SP.

ABSTRACT

New products with antioxidant and anti-glycemic action are studied for the cosmetic and pharmaceutical industry, as several treatments can be performed due to this activity of many natural compounds. In this context, this work allowed the increase of knowledge about Moringa oleifera LAM crude hydroethanolic extract, as well as its liposome encapsulation to study the potential effect on the hydration and barrier function of the skin, through the evaluation of antioxidant and antioxidant activity. in vitro and evaluation of instrumental in vivo efficacy with biometrological equipment. C18 silica extract fractionation and HPLC-DAD / MS analysis were performed. The antioxidant activity of the extract was evaluated by DPPH free radical scavenging activity, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) tests, lipid peroxidation inhibition (TBARS), nitric oxide (NO) scavenging activity and Oxygen Absorption (ORAC-FL). The antioxidant evaluation of the extract was evaluated by the electrophoresis protein mobility (MRE) method, determination of free amine groups and fluorescence determination of advanced glycation end products (AGEs). The cytotoxicity of the extract by the sulforrodamine B method and cell viability by the MTT reduction method were evaluated. Vesicle liposomes were prepared by the lipid film hydration method and characterized by zeta potential, polydispersion index and particle size tests and stability determined. The antioxidant activity of the liposomes was evaluated by the DPPH free radical scavenging activity test. Formulations were prepared and in vivo clinical instrumental efficacy tests were performed with Corneometer® CM825, Tewameter® TM300 and pHmeter® pH900.

Keywords: *Moringa oleifera* LAM.; Antioxidants; Liposomes; Cutaneous Biometrology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da *M. oleifera*..... 21
Figura 2 - *Moringa oleifera*..... 22
Figura 3 - Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante..... 24
Figura 4 - Representação das unidades formadoras de um lipossoma e efeito do colesterol..... 29

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Curva cinética do ensaio ORAC-FL na presença de extrato de *Moringa oleifera*..... 50
Figura 2 - Cromatograma de pico base (BPC +All MS), no modo positivo, de compostos presentes no extrato de *Moringa oleifera*..... 51
Figura 3 - Espectro MS composto 32..... 51
Figura 4 - Espectro MS composto 52..... 52
Figura 5 - Espectro MS composto 72..... 52
Figura 6 - Espectro MS composto 99..... 52
Figura 7 - Espectro MS composto 100..... 53
Figura 8 - Espectro MS composto 112..... 53
Figura 9 - Espectro MS composto 121..... 53
Figura 10 - Espectro MS composto 122..... 53
Figura 11 - Espectro MS composto 138..... 54
Figura 12 - Cromatograma UV 340 nm do extrato de *M. oleifera*..... 54
Figura 13 - Espectro UV dos picos obtidos no cromatograma UV 340 nm do extrato de *M. oleifera*..... 55
Figura 14 - Teste de mobilidade relativa em eletroforese para avaliação da capacidade antiglicação..... 56
Figura 15 - Porcentagem de aminas livres determinada pelo método do OPA..... 56
Figura 16 - Resultados da formação dos AGEs determinada por intensidade de fluorescência (A) e porcentagem de inibição dos AGEs (B)..... 57
Figura 17 - Efeito da doxorrubicina (A) e do extrato de *M. oleifera* (B) em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos..... 58
Figura 18 - Efeito da doxorrubicina (A) e do extrato de *M. oleifera* (B) em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos..... 59

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Comparação dos valores de Corneometer versus Tempo..... 75
Figura 2 - Comparação dos valores de Corneometer versus Produto..... 76
Figura 3 - Comparação dos valores de TEWL versus Tempo..... 77
Figura 4 - Comparação dos valores de TEWL versus Produto..... 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Atividade antioxidante do extrato das folhas de *Moringa oleifera* e controle positivo ácido gálico e trolox por meio dos testes DPPH, FRAP, TBARS e NO..... 49
Tabela 2 - Frações cromatográficas identificados no extrato das folhas de *M. oleifera*..... 51
Tabela 3 - Tempo de retenção dos picos do cromatograma UV 340nm..... 54
Tabela 4 - Atividade antiproliferativa..... 58

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição lipídica dos lipossomas utilizados..... 67
Tabela 2 - Desenvolvimento das formulações A, B, C, D e E..... 69
Tabela 3 - Determinação do tamanho médio (TM), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (Zeta) dos lipossomas contendo extrato de *M. oleifera*..... 73
Tabela 4 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos lipossomas sem e com o extrato incorporado..... 74
Tabela 5 - Valores de significância de Corneometer versus Tempo (p>0,05)..... 75
Tabela 6 - Valores de significância de Corneometer versus Produto (p>0,05)..... 76
Tabela 7 - Análise estatística do produto LE..... 77
Tabela 8 - Valores de significância de TEWL versus Tempo (p>0,05)..... 78
Tabela 9 - Valores de significância de TEWL versus Produto (p>0,05)..... 78
Tabela 10 - Análise estatística do produto BS..... 79
Tabela 11 - Análise estatística do produto EX..... 79
Tabela 12 - Análise estatística do produto CT..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS

Λmax	Comprimento de onda máxima
Amax	Absorbância máxima
AAPH	2,2'-Azobis (2- amidinopropano) dicloridrato
AGE	Produtos de glicação avançada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
MTT	Brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio
Na	Sódio
NMF	Natural Moisturizing Factor (fator natural de hidratação)
NO	Óxido nítrico
OPA	Ortoftalaldeído
PBS	Tampão fosfato salino
P/V	Peso por volume
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RL	Radicais livres
EROs	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Nitroprussiato de sódio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEWL	Transepidermal Water Loss (perda de água transepidérmica)
UA	Unidades Arbitrárias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
Cm	Centímetro
Σ	Somatória
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
M	Molar
µg	Micrograma
mg	Miligrama
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 16
REFERÊNCIAS..... 18

2 REFERENCIAL TEÓRICO..... 21
2.1 *Moringa oleifera*..... 21
2.2 Danos oxidativos no organismo..... 24
2.1.1 Doenças degenerativas..... 24
2.1.2 Envelhecimento e Estresse Oxidativo..... 25
2.3 Glicação proteica..... 26
2.4 Avaliações antioxidantes e antiglicantes..... 27
2.5 Estabilidade de compostos naturais na indústria e encapsulação..... 27
2.6 Pele e integridade da barreira cutânea..... 29
2.7 Biometrologia cutânea..... 31
REFERÊNCIAS..... 32

3 OBJETIVOS..... 38
3.1 Objetivo geral..... 38
3.2 Objetivos específicos..... 38

CAPÍTULO 1
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGLICANTE E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* L.

1-Introdução..... 39
2-Material e Métodos..... 40
3-Resultados..... 49
4-Discussão..... 59
5-Conclusão..... 61
Referências..... 61

CAPÍTULO 2
ANÁLISES POR BIOMETROLOGIA CUTÂNEA DE LIPOSSOMAS CONTENDO EXTRATO DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* L.

1-Introdução..... 65
2-Material e Métodos..... 66
3-Resultados..... 73

4-Discussão..... 80
5-Conclusão..... 82
Referências..... 82

1 INTRODUÇÃO

Moringa oleifera Lamarck é uma planta nativa da Índia conhecida como "árvore milagrosa" ou "planta diamante". Tem sido amplamente cultivada em todo o mundo, por seus múltiplos usos, principalmente por ser fonte de nutrientes e por seus efeitos medicinais, além de seu cultivo apresentar baixo custo de produção (LIN et al., 2019).

Vários estudos têm demonstrado a presença dos mais diversos constituintes químicos em *M. oleifera*, principalmente uma gama de compostos fenólicos associados à atividade antioxidante, flavonoides e glucosinolatos. Também foi demonstrado que raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes são ricas fontes de proteínas e minerais como cálcio, sódio, potássio e magnésio, bem como ácidos graxos. Vale salientar a presença das vitaminas A, B, C e E, assim como riboflavina, ácido ascórbico, ácido linolênico e ácido fólico nas folhas (ANWAR et al., 2007; AMAGLO et al., 2010; SHIH et al., 2011).

Os estudos etnobotânicos com *M. oleifera* se concentram nas propriedades das folhas da planta, pois as mesmas tem provado numerosas propriedades biológicas, como propriedade antioxidante (CHUMARK et al., 2008; SINGH et al., 2009; SREELATHA e PADMA 2009; VERMA et al., 2009; KUSHWAHA et al., 2014; YASSA e TOHAMY 2014), anti-inflamatória e imunomoduladora (ABD-ELHAKIM et al., 2018; SANDEEP et al., 2019), anticancerígena (JUNG 2014), anti-hipertensiva (NANDAVE et al., 2009), hipolipidêmica (NAMBIAR et al., 2010), hipoglicêmica (WILLIAM et al., 1993; KUMARI 2010; YASSA e TOHAMY 2014) e antimicrobiana (UGWOKE et al., 2017). Certamente, seus numerosos efeitos farmacológicos são devido à diversidade de seus fitoquímicos (LIN et al., 2019). Desta forma, *M. oleifera* constitui importante fonte de compostos bioativos e a adaptabilidade da planta às mais diversas condições aliadas à presença de variados constituintes químicos e nutrientes lhe confere imensa importância econômica e medicinal.

Diante do exposto acima e considerando a importância da espécie *M. oleifera* para a descoberta de novos compostos ativos, sabe-se que as plantas são fonte de ampla variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres, que podem atuar de forma direta e/ou indireta no estresse oxidativo, prevenindo e até combatendo doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento. Além da busca de novos antioxidantes, sabe-se que o desenvolvimento de novas tecnologias para liberação e otimização dos mesmos torna-se cada vez mais necessário. Entre estas tecnologias está a incorporação de fármacos em nanossistemas, que consiste na associação de moléculas a vetores específicos objetivando o direcionamento de fármacos para o seu alvo de ação. Estas formulações oferecem numerosas vantagens comparadas aos sistemas convencionais de administração, como aumento da eficácia do tratamento, redução das dosagens e frequência de administração do fármaco,

redução do custo da terapia, diminuição da toxicidade e proteção do fármaco contra inativação química ou enzimática (TORCHILIN, 2009).

A nanotecnologia farmacêutica desenvolveu sistemas coloidais de imobilização e liberação controlada para a veiculação de agentes bioativos na forma de nanodispositivos incorporados com substâncias hidrofílicas e lipofílicas entre estes dispositivos estão os lipossomas (DUNNE et al., 2003). Estes constituem parte dos sistemas coloidais de liberação controlada de compostos terapêuticos, formados por associações de lipídeos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em bicamadas lipídicas concêntricas tipo "concha esférica". Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídeos sintéticos, disponíveis comercialmente (CHORILLI et al., 2007). Os lipossomas são empregados na terapêutica há mais de 40 anos e apresentam muitas vantagens, entre elas a biocompatibilidade, pois contém os mesmos constituintes estruturais que as membranas biológicas, os fosfolipídeos. Tais vesículas são consideradas excelentes nanodispositivos devido a sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica. Os lipossomas também são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (BATISTA et al., 2007).

Para a produção de lipossomas, a técnica de hidratação do filme lipídico é a mais utilizada. Esta técnica consiste em solubilizar os lipídeos em solvente orgânico, como clorofórmio ou metanol, e em seguida evaporar esse solvente formando um fino filme na parede do tubo utilizado. O filme lipídico preparado é posteriormente hidratado com água ou com solução tampão adequada. A molécula a ser encapsulada pode ser incorporada na solução tampão, no caso de serem hidrofílicas, ou dissolvidos na mistura lipídica, se forem lipofílicas (GREGORIADIS e SENIOR, 1980; KIRBY et al., 1980). A utilização dos lipossomas está relacionada também com uma maior duração do efeito terapêutico do fármaco, que apresenta prolongada liberação no organismo, permitindo que doses maiores sejam administradas sem os riscos da toxicidade. Assim, há maior janela terapêutica e um menor número de administrações do fármaco ao longo do tratamento (MENDES et al., 2018).

Na última década a ciência farmacêutica e a cosmetológica, ganhou uma profunda relevância, convertendo seus produtos em elementos geradores de saúde, bem-estar e qualidade de vida. No entanto, o conhecimento neste campo vem se intensificando cada vez mais e revelando os ativos que compõem um produto, sua formulação e adequação ao biotipo e aos novos conceitos de fabricação para manipulação em farmácia e/ou indústria (DAUDT et al., 2013; ALMEIDA et al., 2017).

Dentro deste contexto destaca-se a Bioengenharia cutânea, ou Biometrologia cutânea, que consiste no estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele por meio da medição de diferentes variáveis por métodos cientificamente comprovados e não-invasivos, que podem ser usados sozinhos ou em combinação. Existem equipamentos modernos que podem medir, por exemplo, a concentração de água na pele e a perda transepidérmica, antes e depois do uso de uma

fórmula. A biometrologia está fortemente inserida na análise Genética e Cosmética, visto o seu crescimento na área da saúde e considerando ainda o desenvolvimento da Biotecnologia na saúde humana, na produção de alimentos e na Medicina Forense (BLICKENSTAFF et al., 2014; HUMBERT, 2017).

Diante do exposto, este estudo conciliou as vantagens da nanotecnologia juntamente com a ação antioxidante e o possível potencial antiglicante de *M. oleifera* na elaboração de lipossomas com o extrato das folhas da planta para aplicação tópica. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido para obter e caracterizar lipossomas contendo o extrato das folhas de *M. oleifera* e avaliar *in vitro* e *in vivo* esse sistema de liberação controlada. Portanto, o presente trabalho viabilizou a ampliação dos estudos com *M. oleifera* com uma abordagem nanotecnológica, o que consiste numa importante aplicação destas nanoestruturas como forma de aplicação do extrato da planta, maior estabilidade dos seus compostos antioxidantes, antiglicantes e melhora da qualidade da pele, justificando sua realização.

REFERÊNCIAS

ABD-ELHAKIM, Y. M.; EL BOHI, K. M.; HASSAN, S. K.; EL SAYED, S.; ABD-ELMOTAL, S.M. Palliative effects of *Moringa oleifera* ethanolic extract on hemato-immunologic impacts of melamine in rats. Food and Chemical Toxicology, v. 114, p. 1-10, 2018.

ALMEIDA, C. B. L.; CONDE E SÁ, C.; CARVALHO, R. C. D.; ALMEIDA, E. S. Estudo prospectivo da moringa na indústria de cosméticos. Cadernos de Prospecção, v. 10, n. 4, p. 905-918, 2017.

AMAGLO, N. K.; BENNETT, R. N.; LO CURTO, R. B.; ROSA, E. A. S.; LO TURCO, V.; GIUFFRIDA, A.; LO CURTO, A.; CREA, F.; TIMPO, G. M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chemistry, v.122, p. 1047-1054, 2010.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. Phytotherapy Research, v.21, p.17-25, 2007.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 43, n. 2, 2007.

BLICKENSTAFF, N. R.; COMAN, G. C.; MAIBACH, H. I. Emphasizing basic science research in medical training for evidence-based practice. Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology's, v. 80, n. 3, p. 199-200, 2014.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; DE OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2007.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; KLAI-UPSORN, S. P. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties,

hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. Journal of Ethnopharmacology, v. 116, p. 439-446, 2008.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, IRENE. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. Ciência e Cultura, v. 65, n.3, 2013.

DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protaminesulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. Journal of Controlled Release, v. 92, p. 209-219, 2003.

GREGORIADIS, G.; SENIOR, J. The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. FEBS Letters, v. 119, n. 1, p. 43-46, 1980.

HUMBERT, P.; FANIAN, F. MAIBACH, H.; AGACHE, P. Agache's Measuring the Skin (Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants). Springer, 2ª ed., 2017.

JUNG, I. L. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. PLoS One, v. 9, 2014.

KIRBY, C.; CLARKE, J.; GREGORIADIS, G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*. The Biochemical Journal, v. 186, n. 2, p. 591-598, 1980.

KUMARI, D. J. Hypoglycemic Effect of *Moringa oleifera* and Azadirachta indica in Type-2 Diabetes. The Bioscan, v. 5, p. 211-214, 2010.

KUSHWAKA, S.; CHAWLA, P.; KOCHHAR, A. Effect of supplementation of drumstick (*Moringa oleifera*) and amaranth (*Amaranthus tricolor*) leaves powder on antioxidant profile and oxidative status among postmenopausal women. Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 11, p. 3464-3469, 2014.

LIN, H.; ZHU, H.; TAN, J.; WANG, H.; WANG, Z.; LI, P.; ZHAO, C.; LIU, J. Comparative analysis of chemical constituents of *Moringa oleifera* leaves from China and India by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. Molecules, v. 24, p. 942, 2019.

MENDES, L. P.; LIMA, E. M.; TORCHILIN, V. P. Targeted nanotheranostics for selective drug delivery in cancer. In: Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics. Elsevier, p. 245-277, 2018.

NAMBIAR, S.; GUIN, P.; PARNAMI, S.; DANIEL, M. Impact of antioxidants from drumstick leaves on the lipid profile of hyperlipidemics. Journal of Herb Medical Toxicology, v. 4, p. 165-172, 2010.

NANDAVE, M.; KUMAR OJHA, S.; JOSHI, S.; KUMARI, S.; SING ARYA, D. 2009. *Moringa oleifera* leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and cardioprotective intervention. Journal of Medicinal Food, v. 2, p. 47- 55.

SANDEEP, G.; ANITHA, T.; VIJAYALATHA, K. R.; SADASAKTHI A. Moringa for nutritional security (*Moringa oleifera* Lam.). International Journal of Botany Studies, v. 4, p. 21-24, 2019.

SHIH, M. C.; CHANG, C. M.; KANG, S. M.; TSAI, M. L. Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. International Journal of Molecular Sciences, v. 12, p. 6077-6088, 2011.

SINGH, B. N.; SINGH. B. R.; SINGH, R. L.; PRAKASH, D.; DHAKAREY, R.; UPADHYAY, G.; SINGH, H. B. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. Food and Chemical Toxicology, v. 47, p. 1109-1116, 2009.

SREELATHA, S.; PADMA, P. R. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. Plant Foods for Human Nutrition, v. 64, p. 303-311, 2009.

TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli sensitive pharmaceutical nanocarriers. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 71, p. 431-444, 2009.

UGWOKE, C. E. C.; EZE, K. A.; TCHIMENE, K. M.; ANZE, S. P. G. Pharmacognostic evaluation and antimicrobial studies on *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 8, n. 1, p. 88-94, 2017.

VERMA, A. R.; VIJAYAKUMAR, M.; MATHELA, C. S.; RAO, C. V. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. Food and Chemical Toxicology, v. 47, n. 9, p. 2196-2201, 2009.

WILLIAM, F.; LAKSHMINARAYANAN, S.; CHEGU, H. Effect of some Indian vegetables on the glucose and insulin response in diabetic subjects. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 44, p. 191-196, 1993.

YASSA, H. D.; TOHAMY, A. F. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. Acta Histochemica, v. 116, n. 5, p. 844-854, 2014.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lamarck é uma espécie pertencente ao único gênero da família Moringacea. É conhecida pelos nomes comuns de acácia branca, lírio branco, árvore-rabanete-de-cavalo (devido ao sabor das suas raízes), moringueiro, cedro e quiabo-de-quina (devido à forma das suas vagens) (MORTON, 1991). É uma árvore nativa da região noroeste da Índia e atualmente a produção, processamento e utilização desta cultura está ganhando força em muitos países, sendo largamente cultivada na África, América do Sul, Centro, Sudeste e sul Asiático, Índia, Arábia e nas Ilhas do Pacífico e Caraíbas (SANTOS et al., 2015) (Figura 1). No Brasil é considerada uma espécie arbórea exótica que se adaptou satisfatoriamente às condições edafoclimáticas do semiárido do Nordeste brasileiro (JESUS et al., 2013; SOUZA et al., 2015)

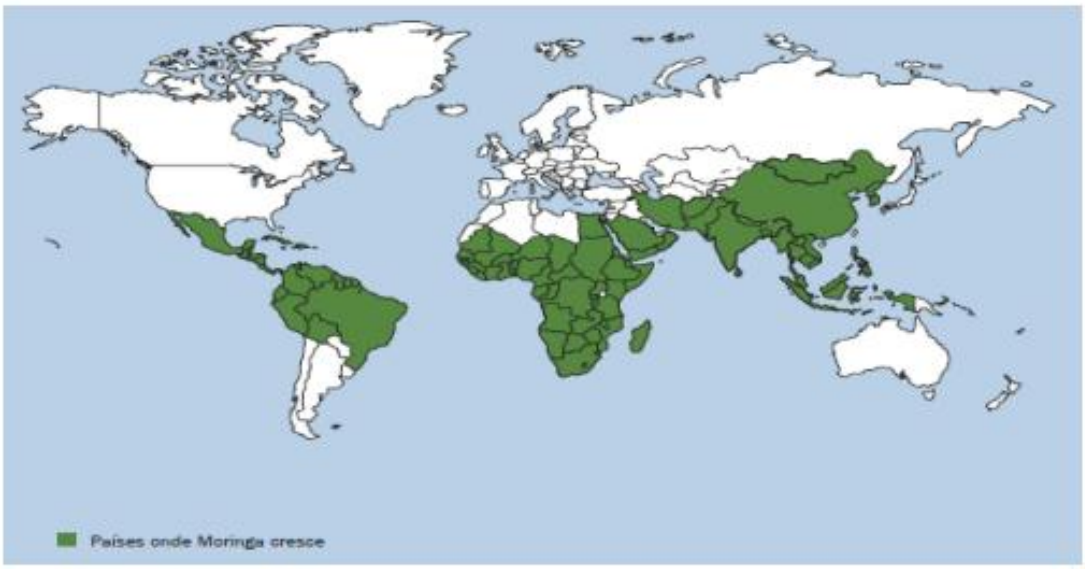


Figura 1 - Distribuição geográfica da *M. oleifera*. Disponível em: www.treesforlife.org/moringa/book. Acessado em 04/07/2019.

Moringa oleifera cresce facilmente, mesmo em solos pobres, não requerendo cuidados especiais, não necessita de muita água, podendo crescer em regiões onde a chuva é escassa ou irregular, tolerando uma larga variedade de condições de solo, com preferência por solos de pH neutro ou ligeiramente ácido, arenosos bem drenados ou argilosos. (KOUL e CHASE, 2015). Com uma temperatura de crescimento ideal entre 25°- 35°C, pode tolerar uma temperatura até 48°C e resistir a geadas ligeiras, mas não sobrevive sob baixas temperaturas (próximas de congelamento). Por esses motivos a moringa é considerada uma árvore tropical, de regiões quentes semiáridas, bastante resistente à seca e adaptável a uma vasta gama de condições ambientais, desde as secas e quentes às úmidas e quentes (SANTOS et al., 2015; ASENSI et al., 2017).

Esta espécie caracteriza-se por ser arbórea, perene e de rápido crescimento, pode alcançar entre 7 a 12 metros de altura e tronco de 30 centímetros de diâmetro (ANWAR et al., 2007; SINGH et al.; 2015). As folhas são alternadas, duas ou três folhas pinadas no final dos ramos e pecíolo longo com 8 a10 pares de folhas. As flores são agradavelmente perfumadas, de coloração branca ou creme, e amarelo pontilhado na base. Os frutos são em formato de vagens lobadas, lineares pendentes, geralmente com 20 a 45 cm de comprimento, podendo chegar a 120 cm de comprimento (RAMACHANDRAN et al., 1980) (Figura 2).



Figura 2 - *Moringa oleifera*. Fonte: o autor

No Brasil sua introdução é relativamente recente, em 1950, na forma de planta ornamental e inicialmente como uma planta apícola, por intermédio do pesquisador Warwick Estevam Kerr (SILVA e KERR, 1999), pois produz flores durante boa parte do ano, e desde então, tem sido

cultivada também devido ao seu alto valor alimentício, principalmente das folhas. Na medicina popular esta espécie é empregada como fonte de diferentes compostos bioquímicos. As folhas, raízes e casca são usadas no tratamento e prevenção de inúmeras doenças e tais benefícios são associados com os diversos metabólitos presentes em sua composição (SANDEEP et al., 2019). Num estudo comparativo de treze cultivares de *M. oleifera* de diferentes partes do mundo, sua análise fitoquímica detectou variações no nível total de compostos fenólicos e ou flavonoides. Esta diferença nos metabólitos secundários da planta, como os compostos fenólicos sugere que há diferenças na capacidade dos cultivares em se adaptarem a novos ambientes. As condições ambientais podem exercer stress nas plantas e isto pode resultar na produção e expressão de metabólitos secundários diferenciados pela planta, contudo, nem sempre uma maior quantidade de compostos fenólicos está relacionada com uma maior bioatividade (NDHLALA et al., 2014).

Diversas pesquisas mostraram que as folhas de *M. oleifera* são consideradas uma rica fonte de vitaminas, carotenoides, aminoácidos, minerais, flavonoides e alcaloides, bem como mistura única de compostos fenólicos compreendendo quercetina, apigenina e kaempferol (KARTHIVASHAN et al., 2015). Por conta de suas propriedades, possibilita a utilização de quase toda sua extensão, já que poucas partes da árvore contem quaisquer toxinas (FOIDL et al., 2001; OLSON e FAHEY, 2011). A Organização Mundial de Saúde sugeriu a *M. oleifera* como um suplemento alimentar para combater a desnutrição nos países em desenvolvimento. (RWEYEMAMU et al., 2015). Somado a isso, estudos relatam que o pó de sementes de *M. oleifera* são usadas na purificação da água e pode remover o cádmio de sistemas aquosos (SHARMA et al., 2006). Devido às suas propriedades antimicrobianas (FILGONA et al., 2005) e floculantes (MCCONNACHIE et al., 1999), as sementes podem ser utilizadas na limpeza da água. Além disso, estudos demonstram que a coadministração do pó de sementes de *M. oleifera* protege os animais do estresse oxidativo (GUPTA et al., 2007). Com as sementes de *M. oleifera* também pode ser produzido um óleo de alta qualidade que é comestível e tem potencial uso como biocombustível. Este óleo conhecido comercialmente como óleo “Ben” ou “Behen”, apresenta alto valor industrial, sendo utilizado no preparo de alimentos, na fabricação de lubrificantes, combustíveis e cosméticos (PEREIRA et al., 2016).

Moringa também tem sido muito utilizada na indústria de dermocosméticos, principalmente em hidratantes para o corpo e condicionadores de cabelo, devido à descoberta de componentes ativos extraídos do óleo da semente, que contém frações proteicas específicas que protegem a pele humana das influências ambientais e combate o envelhecimento prematuro da pele. A dupla atividade, antipoluição e condicionamento, e fortalecimento dos cabelos, são muito úteis no cuidado com a pele e com os cabelos (ANWAR et al., 2007; SONAWANE E SUVARNA, 2016; ALMEIDA et al., 2017).

2.2 Danos oxidativos no organismo

2.1.1 Doenças degenerativas

Para a manutenção da homeostasia oxidativa, a célula conta com um arsenal de antioxidantes como a glutationa, ácido alfa-lipoico, coenzima Q, ferritina, ácido úrico, bilirrubina, etc. Outros antioxidantes como o ácido ascórbico ou vitamina C, tocoferol ou vitamina E, betacaroteno ou vitamina A podem ser obtidos pela dieta. Existem ainda os antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase, catalase, glutationaperoxidase, etc, que atuam na produção ou eliminação das espécies reativas do oxigênio (EROs) (Figura 3) (SILVA e JASIULIONIS, 2014).

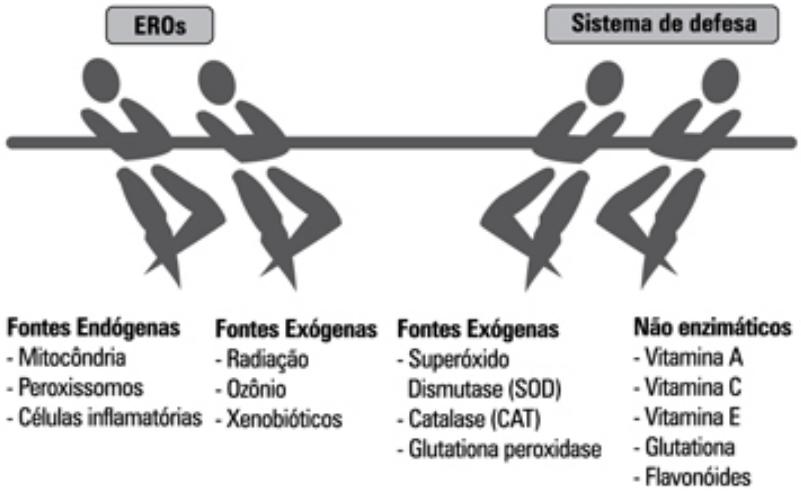


Figura 3 - Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante. Fonte: SILVA e JASIULIONIS, 2014.

É importante ressaltar que diversas funções fisiológicas são controladas por vias que envolvem sinalização redox, reações de troca de elétrons por redução e oxidação, como no caso da produção de radical livre superóxido (O_2^-). Um exemplo é a produção aumentada de EROs por leucócitos durante os processos inflamatórios, representando importante defesa contra patógenos. Também se observa a participação de EROs em processos que envolvem adesão celular, como embriogênese, diferenciação, reparo e cicatrização (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HIRATA et al., 2004). A apoptose, morte celular programada que regula o tempo de vida de células normais, pode ser induzida por danos ao DNA causados por EROs. Desta forma, a presença de concentrações adequadas de EROs pode ser importante para a manutenção de estados celulares normais (VALKO et al., 2007).

Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá equilíbrio das funções celulares, entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá um desequilíbrio o que caracteriza o estresse oxidativo. (FERREIRA e

MATSUBARA, 1997). Assim, o termo estresse oxidativo é empregado em situações nas quais o "desafio" por radicais livres resulta em um dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que o organismo se encontra em estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de forma que os primeiros sejam predominantes (SIES, 1993).

Entre os processos patológicos em que já foi descrita a participação do estresse oxidativo estão as doenças cardiovasculares, neurológicas, o diabetes e o câncer além de estar associado ao envelhecimento precoce. Diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon, apresentam níveis elevados de EROs (REUTER et al., 2010). As EROs são reguladoras de diversas vias de transdução de sinais, podendo participar de diversas etapas da transformação e progressão tumoral, como a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, metástase e inflamação (SILVA e JASIULIONIS, 2014). Trabalhos científicos mostram diversos benefícios do uso de terapias antioxidantes para o tratamento de doenças como Alzheimer, diabetes e câncer (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; JUNIOR et al., 2004).

2.1.2 Envelhecimento e Estresse Oxidativo

A participação do estresse oxidativo no envelhecimento também já é bem conhecida. O envelhecimento se trata de um evento multifatorial que acontece depois da fase reprodutiva da vida, onde se observa um progressivo declínio das funções fisiológicas do organismo. Uma das teorias é baseada no fato de que danos celulares causados por EROs são cumulativos e deletérios ao longo do tempo. Um dado interessante é que danos oxidativos no DNA podem ser monitorados pela urina e foi observado que a composição da dieta pode modular esses danos. A longevidade poderia, portanto, ser dependente não apenas de fatores intrínsecos, como hereditariedade, mas também de fatores externos, como a dieta e a prática de exercícios físicos (SILVA e JASIULIONIS, 2014).

Entre os fatores externos que aceleram e/ou aumentam os sintomas de envelhecimento destacam-se as radiações ultravioleta, principalmente as oriundas da exposição solar. Este tipo de radiação é a principal causa de danos na pele por formação de EROs, levando à imperfeição do colágeno na pele e, eventualmente, à aspereza da mesma (GONZÁLEZ et al., 2008; SOWA et al., 2013). Estes podem interferir nas proteínas; ácidos graxos e sacarídeos, o que resulta em danos oxidativos (SVOBODOVA et al., 2003; ICHIHASHI et al., 2003). O envelhecimento está associado a alterações morfológicas (FLYNN e COLEMAN, 2002) e é caracterizado por perda de elasticidade, pigmentação irregular, ressecamento e rugosidade (FISHER et al., 2002; PAWLACZYK et al., 2013). Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos de revitalização da pele, isto é, da sua restauração

após danos de qualquer natureza (incluindo o envelhecimento), aumentou (FLYNN e COLEMAN, 2002). As formulações tópicas ganharam atenção e interesse consideráveis como um veículo para a entrega de vários ativos na pele humana (FOLDVARI, 2000). Uma abordagem na proteção da pele contra a redução do envelhecimento é através do uso de compostos fenólicos antioxidantes aplicados topicamente. (ICHIHASHI et al., 2003).

2.3 Glicação proteica

A glicação é uma reação não enzimática que se dá no meio biológico ou em alimentos, e que ocorre entre açúcares e grupos nucleofílicos de biomoléculas (BARBOSA et al., 2016). O termo glicação pode também se referir à sequência de reações não enzimáticas que se inicia quando açúcares redutores como glicose e frutose reagem com grupos nucleofílicos de aminoácidos constituintes de proteínas, lipídeos ou ácidos nucleicos, gerando os chamados produtos de glicação avançada (AGEs, acrônimo em inglês para Advanced Glycation End-Products) (ZHANG et al., 2008).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (BIERHAUS et al., 1998). A contribuição dos AGEs para o desenvolvimento e a progressão das complicações diabéticas encontra-se bem evidenciada na literatura (JAKUS e RIETBROCK, 2004).

A formação dos AGEs ocorre vagarosamente sob condições fisiológicas e afeta predominantemente moléculas de meia-vida longa, como o colágeno, exercendo importante função no processo de envelhecimento (FORBES et al., 2005). No entanto, sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, a geração dos AGEs aumenta intensamente (LAPOLLA et al., 2005; JAY et al., 2006; JAHAN e CHOUDHARY, 2015). Esta formação é predominantemente endógena, mas esses produtos podem ser introduzidos no organismo por fontes exógenas, como o tabagismo e a dieta (PEPPA et al., 2003). Os AGEs podem danificar as células por três mecanismos básicos. O primeiro é a modificação de estruturas intracelulares, incluindo aquelas envolvidas com a transcrição gênica. O segundo mecanismo é a interação dos AGEs com proteínas da matriz extracelular modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula, gerando disfunção. O terceiro mecanismo se refere à modificação de proteínas ou lipídeos sanguíneos; as proteínas e os lipídeos circulantes modificados por AGEs podem, então, ligar-se a receptores específicos, causando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que, por sua vez, contribuem para a patologia vascular do diabetes (BIERHAUS et al., 1998; BROWNLEE, 2005).

As proteínas de meia-vida longa que constituem a matriz extracelular e as membranas basais vasculares são também suscetíveis à formação e ao acúmulo dos AGEs. Além de reduzir a solubilidade e a digestibilidade enzimática, a formação dos AGEs compromete a conformação geométrica dessas proteínas, causando anormalidades estruturais e funcionais permanentes. Há evidências de que a formação de ligações cruzadas entre os AGEs e o colágeno tipo I ou elastina conduza ao aumento na área da matriz extracelular, resultando no aumento da rigidez vascular. A formação dos AGEs na laminina compromete a reunião de seus polímeros, diminuindo, assim, sua interação com o colágeno tipo IV (BROWNLEE, 2005; GOLDIN et al., 2006).

2.4 Avaliações antioxidantes e antiglicantes

É possível correlacionar a importância das avaliações antioxidantes com a atividade antiglicante de compostos naturais, pois a mesma pode ser gerada pelo estresse oxidativo e o desequilíbrio da eliminação de diferentes radicais livres (SOUSA et al., 2015; NAZ et al., 2017). Os principais efeitos do estresse oxidativo são danos a diversos componentes celulares inclusive ao próprio ácido desoxirribonucleico (DNA), podendo contribuir para o envelhecimento e o aparecimento de diversas doenças (HERMES-LIMA, 2004).

Os agentes antioxidantes como os compostos fitoquímicos, evitam ou retardam a oxidação de um substrato, garantindo a integridade celular e reparando lesões causadas pelos radicais livres (HALLIWELL, 2006). Tais compostos podem ser de origem endógena (enzimática ou não) e de origem exógena (dietética). Os antioxidantes presentes nos vegetais variam amplamente em seus conteúdos e perfis entre as diversas espécies. Vários trabalhos têm demonstrado alta correlação entre grandes quantidades de compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante de vegetais. Além do potencial antioxidante depender da estrutura química dos compostos fenólicos, sabe-se que um efeito antioxidante isolado pode reagir sinergicamente com outros compostos que contribuem para potencializar essa função (GIADA e MANCINI FILHO, 2006).

Estudos comprovaram que vários extratos de plantas, frutas e vegetais que apresentam atividade antidiabética apresentaram também atividade antiglicante e contém bioativos como os terpenoides, flavonoides, fenilpropanoides, polifenóis e vitaminas. (MARINHO et al., 2016; TORRES et al., 2018).

2.5 Estabilidade de compostos naturais na indústria e encapsulação

Muitos ativos naturais pesquisados ultimamente são compostos instáveis, podendo sofrer reações que levam à diminuição ou perda de eficácia e até mesmo a degradação do produto. Por isso, novas tecnologias vêm sendo propostas para melhorar o desempenho dos produtos cosméticos e sua aceitação pelo consumidor (GRANADA et al., 2007; ALAVI et al., 2017). Uma alternativa para

aumentar a estabilidade e, ainda, permitir a liberação controlada é o encapsulamento das substâncias ativas por meio de técnicas que envolvem a nanotecnologia. (DAUDT et al., 2013).

Dentro das classes de ativos que são passiveis de serem encapsulados estão os compostos extraídos de vegetais. Os extratos vegetais são fontes promissoras de substâncias bioativas, porém em seu estado bruto podem ter a atividade antioxidante comprometida em razão de sua instabilidade físico-química. Neste contexto, a nanotecnologia pode ser utilizada para a estabilização de diferentes compostos, aumentando também a estabilidade dos produtos finais. Adicionalmente, a nanoencapsulação de compostos antioxidantes pode aumentar a sua atividade antioxidante e prolongar a liberação dos mesmos, aumentando assim a sua eficácia (SCHAFFAZICK et al., 2005; KÜLKAMP et al., 2011).

A nanotecnologia tem sido utilizada no desenvolvimento de inúmeras formulações, com o propósito do aumento da estabilidade, eficácia e melhora do sensorial (NOHYNEK et al., 2010; MIHRANYAN et al 2012). Em 1965, o cientista inglês Alec Bangham e seu grupo de pesquisa descreveram pela primeira vez os sistemas fosfolipídicos, através do desenvolvimento de um sistema de difusão de íons utilizando membranas lipídicas artificiais. Esse sistema, mais tarde, foi nomeado como lipossomas (ALLEN & CULLIS, 2013). Após o trabalho de Bangham, os lipossomas estabeleceram-se como um modelo simples para o estudo de membranas biológicas. Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, onde desde então, os lipossomas desempenham um papel importante no desenvolvimento de novas formulações (GREGORIADIS, 1976; SANTOS e CASTANHO, 2002).

Os lipossomas são vesículas esféricas que consistem em uma ou mais membranas como bicamadas fosfolipídicas envolvendo um núcleo aquoso. O principal componente lipídico do lipossoma é tipicamente fosfatidilcolina derivada do ovo ou lecitina de soja. Colesterol é usualmente incluído na composição para estabilizar a estrutura e, assim, gerar lipossomas mais rígidos. Dependendo das condições de processo e da composição química, podem ser formadas pequenas e grandes vesículas unilamelares e multilamelares, com uma ou várias bicamadas concêntricas. Lipossomas convencionais são os que possuem apenas um fosfolipídeo, normalmente a fosfatidilcolina e colesterol como aditivo para aumentar a fluidez na fase gel e diminuir a fluidez na fase cristal-líquida (SANTOS e CASTANHO, 2002; FREZARD et al., 2005) (Figura 4).

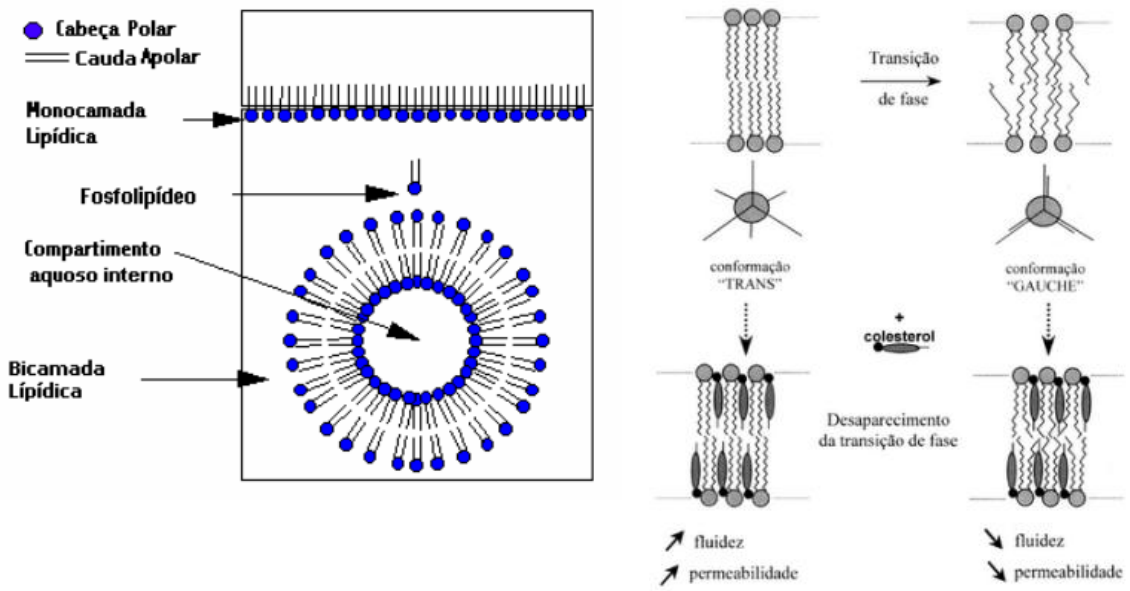


Figura 4 - Representação das unidades formadoras de um lipossoma e efeito do colesterol. Fonte: FREZARD et al., 2005.

Os lipossomas são estruturas lamelares termodinamicamente estáveis que se formam espontaneamente quando os lipídios são colocados em contato com a fase aquosa. Além disso, os lipossomas não são tóxicos nem invasivos e são capazes de carregar substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas (MIHRANYAN et al., 2012). Estes, quando formulados em formulações tópicas podem repor ou aumentar os lipídios endógenos do estrato córneo, aumentando a hidratação e reduzindo a secura da pele (WU e GUY, 2009).

2.6 Pele e integridade da barreira cutânea

A pele é composta por células e anexos cutâneos (folículos pilosos, unhas e glândulas), podendo ser sub caracterizada em camadas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais superficial da pele, constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, contendo células especializadas, como os melanócitos, que produzem melanina. A principal função da epiderme é formar uma barreira protetora, protegendo a pele contra danos externos e dificultando a perda de água e a entrada de substâncias estranhas no organismo. As células da epiderme renovam-se constantemente, em um processo de descamação da camada córnea que varia de 25 a 45 dias de acordo com a idade e as condições gerais da pele, como a hidratação, e o estado de saúde e a sensibilidade individual, que podem alterar a fisiologia cutânea (BARATA, 2002; HARRIS, 2003).

Já a epiderme se diferencia da derme pela presença de células queratinizadas justapostas, enquanto na derme há uma abundante matriz extracelular entre as células. A derme é a camada intermediária da pele, formada principalmente por fibras de colágeno e elastina, que conferem

tonicidade e elasticidade à pele, e por vasos sanguíneos e terminações nervosas (HARRIS, 2003). A substância fundamental amorfa ocupa os espaços entre as fibras elásticas e colágenas, funcionando como lubrificante para essa microarquitetura móvel. É formada pelo fluido intersticial, por complexos de glicosaminoglicanas e por proteínas denominadas proteoglicanas e glicoproteínas. A pele apresenta propriedades físicas, viscoelásticas e de extensibilidade, que podem ser influenciadas pela composição da matriz dérmica, por exemplo, pela diminuição da síntese de ácido hialurônico e de outras glicosaminoglicanas no envelhecimento, o que reduz o turgor da pele (MELO e CAMPOS, 2016). A hipoderme ou tela subcutânea, apoia e une a epiderme e a derme, e é formada por tecido conjuntivo que varia do tipo frouxo ao denso, nas várias localizações e nos diferentes indivíduos (JUNQUEIRA et al., 2017).

Considerando a complexidade da pele, o conhecimento da sua biologia é fundamental para os seus cuidados. Assim, inicialmente é importante avaliar as condições de hidratação, uma vez que a água é um fator essencial à vida e representa a molécula de maior importância para a pele e para o seu funcionamento normal, especialmente da sua camada externa, a epiderme. Além disso, a hidratação adequada é fundamental para a manutenção do conteúdo aquoso na epiderme e da funcionalidade da barreira epidérmica (MELO e CAMPOS, 2016). A capacidade de retenção hídrica da pele é altamente dependente da camada córnea, mas também é dependente de substâncias com características higroscópicas (RAWLINGS, 2006).

Nos últimos anos a determinação da hidratação cutânea tem sido considerada como parâmetro de grande interesse, uma vez que o conteúdo hídrico do estrato córneo fornece informações relativas às propriedades físicas da pele bem como da sua função de barreira (RAWLINGS, 2006; SIMPSON et al., 2012). A capacidade que o estrato córneo tem em reter a água é um fator essencial para haver manutenção da flexibilidade e suporte da pele, já que quando o estrato córneo apresenta uma quantidade adequada de água, a pele adquire propriedades que lhe conferem um aspeto macio, liso e saudável, assim como a manutenção da função natural de barreira (WARNER e LILLY,1994).

Alterações na propriedade de barreira da pele causam distúrbios na capacidade de retenção de água no estrato córneo, podendo levar ao aparecimento de fissuras ou descamação, assim como fragilidade da pele, até mesmo em condições normais de umidade e temperatura (LODÉN et al.,1999). A água liga-se ao estrato córneo devido à presença de metabólitos solúveis, componentes proteicos estruturais e constituintes do sebo. A evaporação de água da superfície cutânea é prevenida pela existência de ceramidas, de lipídeos intercelulares presentes no estrato córneo e de sebo que recobre a superfície da pele (TAGAMI, 2006).

O estado de hidratação é influenciado por vários fatores, nomeadamente pela porcentagem de água que atinge o estrato córneo a partir dos tecidos mais profundos, pela porcentagem de água que evapora à superfície cutânea, e pela capacidade de retenção hídrica do estrato córneo (RAWLINGS,

2006). Deve-se salientar que o sebo cutâneo bem como a quantidade e qualidade do fator natural de hidratação também interferem com o grau de hidratação da pele (PAULA, 2001).

O estado de hidratação da pele está condicionado pelo equilíbrio entre a evaporação e a difusão que ocorrem na pele e pelo valor do fluxo de água que evapora, e que se denomina de perda de água transepidérmica (LODÉN et al.,1999). A capacidade de fixação de água pelo estrato córneo é um parâmetro muito importante e que também regula a hidratação cutânea (YANG et al., 2019). Os corneócitos são muito ricos em queratina, que por sua vez está unida a outras substâncias, principalmente aos fatores naturais de hidratação (NMF). Estes consistem numa mistura de substâncias higroscópicas permitindo assim a fixação de água nos corneócitos. De maneira a evitar a desidratação é essencial manter a integridade da barreira da pele (LÓDEN et al., 2015).

2.7 Biometrologia cutânea

Por meio de diferentes técnicas é possível avaliar a eficácia de produtos cosméticos bem como averiguar o normal funcionamento da pele. Os cosméticos devem permanecer na superfície da pele, ou seja, não alcançar a derme, para que não ocorra a absorção pelos capilares sanguíneos da mesma. Os produtos que cumprem essa característica de absorção pela derme são denominados de farmacêuticos. Por este motivo, os produtos cosméticos não podem exercer qualquer tipo de ação farmacológica (MICHALUN et al., 2011). São funções dos cosméticos a limpeza, correção, proteção, perfumação, e embelezar a pele e os seus anexos, apresentando assim a finalidade de tratar a pele de forma a prevenir a sua deterioração e restabelecer o seu equilíbrio fisiológico quando este sofrer qualquer tipo de perturbação (BARATA, 2002).

O avanço técnico e a melhoria dos conhecimentos sobre a fisiologia cutânea têm contribuído para aproximar cada vez mais a qualidade cosmética com a qualidade farmacêutica. Diversos métodos científicos permitem averiguar a qualidade, apurar a inocuidade e determinar a eficácia dos produtos cosméticos (BARATA, 2002). A ciência da biometria cutânea, que procura reproduzir numericamente os fenômenos biológicos, tem sido amplamente abordada em diversos estudos que pretendem avaliar a eficácia de produtos cosméticos (AZULAY et al., 2010). Assim, a biometria cutânea consiste numa ciência que, recorrendo a meios de medida, permite estudar características biológicas, mecânicas e funcionais da pele, possibilitando avaliar os efeitos dos cosméticos (BARATA, 2002). Compreende um conjunto de métodos que, através de instrumentos não invasivos, avalia as propriedades físico-químicas da pele. Assim, estudam-se parâmetros cutâneos tais como a oleosidade, a hidratação, o pH, a elasticidade, a perda de água transepidérmica, a pigmentação e a temperatura (ELKHYAT et al., 2001; NOUVEAU-RICHARD et al., 2007).

REFERÊNCIAS

ALAVI, M.; KARIMI, N.; SAFAEI, M. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. Advanced Pharmaceutical Bulletin, v. 7, n. 1, p. 3-9, 2017.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 65, p.36-48, 2013.

ALMEIDA, C. B. L.; CONDE E SÁ, C.; CARVALHO, R. C. D.; ALMEIDA, E. S. Estudo prospectivo da moringa na indústria de cosméticos. Cadernos de Prospecção, v. 10, n. 4, p. 905-918, 2017.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. Phytotherapy Research., v. 21, p. 17-25, 2007.

ASENSI, G. D.; VILLADIEGO, A. M. D.; BERRUEZO, G. R. *Moringa oleifera*: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 67, n. 2, p. 86-97, 2017.

AZULAY, M. M.; CUZZI, T.; PINHEIRO, J. C. A.; AZULAY, D. R.; RANGEL, G. B. Métodos objetivos para análise de estudos em dermatologia cosmética. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n. 1, p. 65-71, 2010.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. Journal of Molecular Biology, v. 13, n. 1, p. 238-252, 1965.

BARATA, E. F. Cosméticos - Arte e Ciência. Lidel, 2002.

BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. Química Nova, v. 39, p. 608, 2016.

BIERHAUS, A.; HOFMAN, M. A.; ZIEGLER, R.; NAUROTH, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovascular Research, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mecanism. Diabetes, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

DAUTH, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. Ciência e Cultura, v. 65, n. 3, 2013.

ELKHYAT, A.; AGACHE, P.; ZAHOUANI, H.; HUMBERT, P. G. A new method to measure in vivo human skin hydrophobia. International Journal of Cosmetic Science, v. 23, p. 347-352, 2001.

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

FILGONA, J.; DUNAH, C.; WAKSHAMA, P. An in vitro study of the antimicrobial activity of the root extract of *Calotropis procera* and *Moringa oleifera*. Ife Journal of Science, v. 7, p. 43-46, 2005.

FISHER, G. J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J. J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Archives of Dermatology, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

FLYNN, T. C.; COLEMAN, W. P. Topical revitalization of body skin. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 14, p. 280-284, 2002.

FOIDL, N.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: Proceedings of the International Workshop "What development potential for Moringa products", Dares-Salaam, Tanzania. p. 47-67, 2001.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. Pharmaceutical Science & Technology Today, v. 3, p. 417-25, 2000.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? Clinical Biochemist Reviews, v. 26, n. 4, p. 123-34, 2005.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A; ROCHA, O, G, F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. Química Nova, v. 28, p. 511-518, 2005.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. Ciências Biológicas e da Saúde Ponta Grossa, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. Clinics in Dermatology, v. 26, p. 614-26, 2008.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHIMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C. L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v, 28, n. 2, 2007.

GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. Part 2, New England Journal of Medicine, v. 295 p.765-770, 1976.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. FEBS Letters, v. 14, n. 2, p. 95-99, 1971.

GREGORIADIS, G.; SENIOR, J. The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. FEBS Letters, v. 119, n. 1, p. 43-46, 1980.

GUPTA, R.; DUBEY, D.; KANNAN, G.; FLORA, S. Concomitant administration of Moringa oleifera seed powder in the remediation of arsenic-induced oxidative stress in mouse. Cell Biology International, v. 31, p. 44-56, 2007.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology Rockville, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HARRIS, M. I. N. C. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento. São Paulo: Senac, 2003.
HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and medical sciences. In: STOREY, K. B. (Ed.). Functional metabolism: regulation and adaptation. USA: Wiley, p. 369-382. cap. 13, 2004.

HIRATA, L; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. Acta Farm. Bonaerense, v. 23, p. 418-424, 2004.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. Toxicology, v. 15, p. 21-39, 2003.

JAHAN, H.; CHOUDHARY, M. I. Glycation, carbonyl stress and AGEs inhibitors: a patent review. Expert Opinion on Therapeutic Patents, v. 25, p. 1267, 2015.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. Physiological Research, v. 53, n. 2, p.131-42, 2004.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. Free Radical Biology and Medicine, v. 40, n. 2, p. 183-92, 2006.

JESUS, A.; MARQUES, N. D. S.; SALVI, E.; TUYUTY, P. L. M.; PEREIRA, S. A. Cultivo da *Moringa oleifera*. Instituto Euvaldo Lodi–IEL/BA, 2013.

JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de alzheimer. Química Nova, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. Histologia básica: texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KARTHIVASHAN, G.; ARULSELVAN, P.; ALIMON, A.; SAFINAR ISMAIL, I.; FAKURAZI, S. Competing role of bioactive constituents in *Moringa oleifera* extract and conventional nutrition feed on the performance of cobb 500 broilers. BioMed Research International, 2015.

KOUL, B.; CHASE, N. *Moringa oleifera* Lam.: panacea to several maladies. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v. 7:6, 687-707, 2015.

KÜLKAMP, I. C.; RABELO, B. D.; BERLITZ, S. J.; ISOPPO, M.; BIANCHIN, M. D.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. "Nanoencapsulation improves the in vitro antioxidant activity of lipoic acid". Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 7, n. 598, 2011.

LAPOLLA, A.; FEDELE, D.; TRALDI, P. Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. Clinica Chimica Acta, v. 357, n. 2, p. 236-50, 2005.

LODÉN, M. Moisturizers: Treatment of Dry Skin Syndrome and Barrier Defects, Cosmeceuticals and Active Cosmetics, Third Edition, p. 235-260, 2015.

LODÉN, M.; ANDERSSON, A. C.; LINDBERG, M. Improvement in skin barrier function in patients with atopic dermatitis after treatment with a moisturizing cream (Canoderm). British Journal of Dermatology, v. 140, p. 140-142, 1999.

MARINHO, J. B. M.; ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, R. T. V.; MELO, A. S.; SOUZA, R. F.; SANTOS, L. O. G.; FIGUEIRÊDO, L. C.; FERNANDES, R. T. V.; MESQUITA, A. C. N. Uso da moringa na alimentação animal e humana: Revisão. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 10, n. 08, p. 580-635, 2016.

MCCONNACHIE, G.; FOLKARD, G.; MTAWALI, M.; SUTHERLAND, J. Field trials of appropriate hydraulic flocculation processes. Water Research, v. 33, p. 1425-1434, 1999.

MELO, M. O.; MAIA CAMPOS, P. MBG. Função de Barreira da Pele e pH Cutâneo. Cosmetics & Toiletries (Brasil), v. 28, 2016.

MICHALUN, N.; MICHALUN, V.; SILVA, M. Dicionário de Ingredientes Para Cosmética e cuidados da pele. Brasil, Cengage Learning, 2011.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. "Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics". Progress in Materials Science, v. 57, n. 875, 2012.

MORTON, J. F. The horseradish tree, Moringa pterygosperma (Moringaceae) - A boon to Arid Lands? Economic Botany, v. 45, n. 3, p. 318-333, 1991.

NAZ, R.; AYUB, H.; NAWAZ, S.; ISLAM, ZU.; YASMIN, T.; BANO, A.; WAKEEL, A.; ZIA, S.; ROBERTS, T.H. Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 8, n. 17, p. 302, 2017.

NDHLALA, A. R.; MULAUDZI, R.; NCUBE, B.; ABDELGADIR, H. A.; DU PLOOY, C. P.; VAN STADEN, J. Antioxidant, Antimicrobial and Phytochemical Variations in Thirteen *Moringa oleifera* Lam. Cultivars. Molecules, v. 19, p. 10480-10494, 2014.

NOUVEAU-RICHARD, S.; ZHU, W.; LI, Y. H.; ZHANG, Y. Z.; YANG, F. Z.; YANG, Z. L.; LIAN, S.; QIAN, B. Y.; RAN, Y. P.; BOUILLON, C.; CHEN, H. D.; DE LACHARRIÈRE, O. Oily skin: specific features in Chinese women. Skin Research and Technology, v. 13, p. 43-48, 2007.

NOHYNEK, G. J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. "Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients". Toxicology and Applied Pharmacology, v. 243, n. 239, 2010.

OLSON, M. E.; FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. Revista mexicana de biodiversidad, México, v. 82, n. 4, p. 1071-1082, 2011.

PAULA, M. E. N. Simulação e potencialização da função barreira. Cosmetics Toiletries, v. 13, p. 60-63, 2001.

PAWLACZYK, M.; LELONKIEWICZ, M.; WIECZOROWSKI, M. Age-dependent biomechanical properties of the skin. Postepy Dermatologii I Alergologii, v. 30, p. 302-306, 2013.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. Clinical Diabetes, v. 21, n. 4, p. 186-187, 2003.

PEREIRA, F. S. G.; BRITO NETO, E. X.; WEI, S.; GALVÃO, C. C.; LIMA, V. F.; SILVA, V. L.; LIMA FILHO, N. M. Produção de Biodiesel Metílico com Óleo Purificado de *Moringa oleifera* Lamarck. Rev. Revista Virtual de Química, v. 8, p. 873-888, 2016.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V. G.; OPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera* a multipurpose Indian vegetable. Economic Botany, v. 34, n. 3, p. 276-283, 1980.

RAWLINGS, A. V. Sources and role of stratum corneum hydration. In: Elias e Feingold (Eds.). Skin Barrier. New York, Taylor&Francis, p. 399-421, 2006.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?". Free Radical Biology and Medicine, v. 49, n. 11, 2010.

RWEYEMAMU, L. M.; YUSUPH, A.; MREMA, G. Physical properties of extruded snacks enriched with soybean and moringa leaf powder. African Journal of Food Science and Technology, v. 6, p. 28-34, 2015.

SANDEEP, G.; ANITHA, T.; VIJAYALATHA, K. R.; SADASAKTHI, A. Moringa for nutritional security (*Moringa oleifera* Lam.). International Journal of Botany Studies, v. 4, p. 21-24, 2019.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA,; COELHO, L. C. B. B. *Moringa oleifera*: resource management and multiuse life tree. Advances in Research, v. 4, p. 388-402, 2015.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B., Lipossomas: A bala mágica acertou? Química Nova, v. 25, n. 6, p. 1181-1185, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. "Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation". International Journal of Pharmaceutics, v. 289, n 209, 2005.

SHARMA, P.; KUMARI, P.; SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, S. Removal of cadmium from aqueous system by shelled *Moringa oleifera* Lam. seed powder. Bioresource Technology, v. 97, p. 299-305, 2006.

SIMPSON, E.; BÖHLING, A.; BIELFELDT, S.; BOSC, C.; KERROUCHE, NABIL. Improvement of skin barrier function in atopic dermatitis patients with a new moisturizer containing a ceramide precursor. Journal of Dermatological Treatment, v. 24, p. 122-125, 2012.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. Ciência e Cultura, v. 66, n. 1, 2014.

SILVA, A. R.; KERR, W. E. Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil. Uberlândia: UFU/DIRIU, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidante defence. Review. European Journal of Biochemistry, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. Ciência e Cultura, v. 66, n. 1, 2014.

SINGH, A.; DAYAL, R.; OJHA, R. P.; MISHRA, K. P. Promising Role of *Moringa oleifera* (Lam.) In Improving Radiotherapy: An Overview. Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences, v. 2, n. 2, p. 182-192, 2015.

SONAWANE, P. R. AND SUVARNA, A. K. Natural polymers: carriers for transdermal drug delivery system. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry , v. 6, n. 3, p. 534-542, 2016.

SOUSA, E. O.; MIRANDA, C. M. B. A.; NOBRE, C, B.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. I.; COSTA, J. G. M. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. Industrial Crops and Products, v. 70, p.7-15, 2015.

SOUZA, T. M. A.; SOUSA, T. A.; NETO, H. T. O.; SOUTO, L. S.; FILHO, J. A. D.; MEDEIROS, A. C. Crescimento e desenvolvimento inicial da cultura da moringa (*Moringa oleifera* Lam.) submetida à fertilização orgânica. Revista Verde, v. 10, n. 5, p. 103-107, 2015.

SOWA, P.; RUTKOWSKA-TALIPSKA, J.; RUTKOWSKI, K.; KOSZTYŁA-HOJNA, B.; RUTKOWSKI, R. Optical radiation in modern medicine. Postepy Dermatologii I Alergologii, v. 30, p. 246-251, 2013.

SVOBODOVA, A.; PSOTOVA, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. Biomedical Papers is an official journal of the Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic, v. 147, p. 137-145, 2003.

TAGAMI, H. Epidermal hydration: measurement of high frequency electrical condutance. In: Serup, Jemec e Grove (Eds.). Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin. 2ª ed. New-York, Taylor&Francis, p. 329-336, 2006.

TORRES, N. M. P. O.; XAVIER, J. A.; GOULART, M. O. F.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. A Química dos Produtos Finais de Glicação Avançada. Revista Virtual de Química, v. 10, n. 2, p. 375-392, 2018.

These leaves could save millions of lives. https://treesforlife.org/sites/default/files/documents/Moringa%20Presentation%20(General)%20print.pdf, Distribuição geográfica da *M. oleifera*. Acessado em 01/08/2019.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 39, n. 1, 2007.

WARNER, R. R., LILLY, N.A. Correlation of water content with ultrastructure in the stratum corneum. In: Flhur, et al. (Eds.). Bioengineering of the skin: water and the stratum corneum. 1 ed. Boca Raton, CRC Press, p. 3-11, 1994.

WU, X.; GUY, R. H. "Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics". Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 19, n. 371, 2009.

YANG, Q.; LIU, M.; LI, X.; ZHENG, J. The benefit of a ceramide-linoleic acid-containing moisturizer as an adjunctive therapy for a set of xerotic dermatoses. Dermatologic Therapy, v. 32, 2019.

ZHANG, Q.; AMES, J. M.; SMITH, R. D.; BAYNES, J. W.; METZ, T. O. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. Journal of Proteome Research, v. 8, p. 754, 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante e antiglicante do extrato das folhas de *Moringa oleifera* e a obtenção de lipossomas com o extrato incorporado para testes de biometrologia cutânea, para possível aplicação na indústria de cosméticos e farmacêutica, visando a melhoria da qualidade da pele.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o conteúdo de polifenóis e flavonoides totais do extrato das folhas de *M. oleifera* e analisar fitoquimicamente as frações do extrato por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectro de massas;

Determinar a atividade antioxidante do extrato pelos testes DPPH, FRAP, TBARS, NO e ORAC;

Avaliar a atividade antiglicante do extrato pelos testes da Mobilidade Relativa em eletroforese (MRE), determinação do grupo de aminas livres e fluorescência de AGES;

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato;

Encapsular, caracterizar e avaliar a estabilidade dos lipossomas contendo o extrato;

Analisar a eficácia hidratante *in vivo* dos lipossomas contendo o extrato por meio da biometrologia cutânea.

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGLICANTE E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera* L.

Resumo

Neste estudo foi realizada a avaliação da atividade antioxidante, antiglicante e de citotoxicidade do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Moringa oleifera* por diferentes metodologias. O extrato foi preparado por maceração com agitação. Utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa para determinar o perfil de compostos fenólicos. A quercetina e formas glicosídicas de quercetina foram os mais representados compostos entre os flavonoides, e de polifenóis, o ácido clorogênico. Além disso, as atividades antioxidantes *in vitro* do extrato das folhas de moringa também foram investigadas com o método de sequestro do radical livre DPPH, redução do ferro (FRAP), análise da lipoperoxidação (TBARS), avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO), e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC). Foi possível observar que o extrato avaliado possui atividade antioxidante em todas as metodologias empregadas. A atividade antiglicante foi realizada pelo teste da mobilidade relativa em eletroforese (MRE), determinação do grupo de aminas livres e fluorescência de AGES e nestas metodologias utilizadas o extrato apresentou atividade antiglicante. Foi realizada avaliação da citotoxicidade do extrato em linhagem de queratinócitos humanos e em linhagens tumorais humanas, onde foi possível observar menor toxicidade do extrato em linhagens não tumorais.

Palavras chaves: Polifenóis; Glicação; Antitumoral, Radicais Livres.

1 Introdução

Moringa oleifera LAM é uma planta que pertence à família *Moringaceae*, que abriga 13 espécies distintas, *M. arborea*, *M. borziana*, *M. concanensis*, *M. drouhardi*, *M. hildebrandtii*, *M. longituba*, *M. oleifera*, *M. ovalifolia*, *M. peregrina*, *M. pygmaea*, *M. rivae*, *M. ruspoliana* e *M. stenopetala*. No entanto, toda a atenção se concentra especificamente na *Moringa oleifera* devido às suas propriedades medicinais, curativas e nutricionais, cientificamente comprovadas (Abd Rani et al., 2018, Farooq e Koul, 2019). Sua principal riqueza está no altíssimo valor nutricional das suas folhas, com altas concentrações de compostos antioxidantes. As folhas são ricas em antioxidantes naturais como o ácido ascórbico, flavonoides e compostos fenólicos (Siddhuraju e Becker, 2003). Estes antioxidantes protegem as células dos radicais livres e diminuem o dano oxidativo dos compostos moleculares tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Tshabalala et al., 2019).

O dano oxidativo devido ao estresse oxidativo ocasionado por altos níveis de radicais livres é associado a doenças crônicas como doenças cardíacas e diabetes tipo 2. Espécies reativas do oxigênio (ROS) resulta em estresse oxidativo, o que leva a depleção de antioxidantes no organismo e promove a geração de radicais livres que causam apoptose de células beta pancreáticas e hiperglicemia (Jaiswal et al., 2013; Al-Malki e El Rabey, 2015). Diante disso, os produtos naturais de plantas são preferidos

na regulação dos níveis de glicose, devido a menos complicações decorrentes dos efeitos colaterais (Ivorra et al., 1989). Compostos fenólicos em Moringa contribuem para as propriedades antioxidantes e estes podem combinar com as ROS e prevenir a apoptose das células do pâncreas.

Devido à importância nutricional e medicinal da moringa, a demanda por moringa e seus produtos de valor agregado estão aumentando e a pesquisa precisa ser focada para desenvolver a indústria da moringa, a fim de salvaguardar a saúde e a segurança de todas as partes interessadas.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta e preparação do extrato

As folhas de *Moringa oleifera* foram coletadas no Campus da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista (22º39'00,66''S e 50º26'15,86''O, altitude 845m). As folhas foram primeiramente selecionadas, limpas, e depois submetidas ao processo de secagem, em estufa de ar circulante (Cienlab, Brasil) e à temperatura média de 40°C, até obter a propriedade da cor própria para a trituração. As folhas foram trituradas em moinho de facas (Cienlab, CE-430, Brasil) e o pó resultante foi utilizado para obtenção do extrato. O extrato das folhas secas da *M. oleifera* foi preparado na proporção de 1:10 (p/v) com solução de etanol a 70% em água destilada, por maceração com agitação e ao abrigo da luz por 24 horas. Após este período, o extrato obtido foi filtrado a vácuo e o resíduo vegetal reextraído por duas vezes. Os volumes resultantes de três repetições foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato foi congelado a -18ºC e posteriormente liofilizado. Após a eliminação completa do solvente, a massa total de extrato seco obtido do preparo de 85 g de pó seco das partes folhas com 850 mL de solução de etanol a 70% em água destilada foi de 9,785 g.

2.2 Fracionamento do extrato

O extrato foi submetido a um sistema de fracionamento constituído por uma fase móvel polar (Metanol (MeOH) e água) e uma fase estacionária apolar sílica LiChroprep® RP-18 (40-63 μm) (Merck®), realizando as separações em fase reversa.

Primeiramente, 1 g do extrato foi adicionado em 10 mL de metanol e esta solução foi submetida a banho-ultrassônico 50 Hz por 5 minutos. Após a completa dissolução, o extrato foi colocado em um balão volumétrico juntamente com a sílica. A incorporação entre a solução de extrato e a sílica foi realizada com movimentos circulares do balão e em seguida a mistura foi submetida a rotaevaporação para remoção do solvente. Então prosseguiu-se com o fracionamento em funil com placa filtrante contendo uma camada de sílica C18 pura (corpo) e outra contendo a sílica com extrato incorporado (cabeça), acoplado a um kitassato com bomba a vácuo, passando os solventes (250 mL)

por ordem decrescente de polaridade (H_2O 100%, MeOH 20%, MeOH 40%, MeOH 60%, MeOH 80%, MeOH 100% e Diclorometano 100%. A fração H_2O 100% foi congelada e posteriormente liofilizada; as demais frações foram submetidas ao rotaevaporador e posteriormente liofilizadas por 48h, com exceção das frações Diclorometano 100% e Metanol 100%, que foram secas em capela de exaustão por 24 horas. Após liofilização, as frações foram pesadas e armazenadas em frasco âmbar a temperatura ambiente.

2.3 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado no extrato diluído na concentração de 10000 μg/mL em álcool etílico absoluto, de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (Singleton e Rossi, 1965) utilizando ácido gálico como padrão de referência. Inicialmente foi adicionado 0,1 mL das amostras a 5 mL de água deionizada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau. No tubo branco, foram misturados 5,1 mL de água deionizada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau. Depois de misturadas, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos, em seguida, foi adicionado 1,4 mL de solução de carbonato de sódio 25% e 3 mL de água deionizada. A mistura permaneceu por 1 hora à temperatura ambiente no escuro e a absorbância foi mensurada a 765 nm em espectrofotômetro UV-visível. O teor de polifenóis totais foi determinado a partir de uma curva de calibração de ácido gálico e expressos como mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato seco. Cada amostra foi testada em triplicada.

2.4 Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram mensurados pelo método de ensaio colorimétrico de acordo com a metodologia de Christ e Mueller (1960). Foi misturado 1 mL das amostras na concentração de 10000 μg/mL com 4 mL de etanol a 70% e 0,5 mL de solução de $NaNO_2$ a 5%. Após 6 minutos, foi adicionado 0,5 mL de solução $AlCl_3$ a 10% e 3 mL de solução NaOH 1M, seguido por adição de água deionizada até obter o volume de 10 mL. A mistura foi agitada e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente; em seguida, submetida à leitura em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 510 nm. O tubo branco controle continha todos os reagentes exceto a amostra. O teor de flavonoides foi calculado a partir da curva de calibração de rutina e expresso como mg equivalente rutina (ER) por grama de extrato seco. Cada amostra foi testada em triplicada.

2.5 Análise em HPLC-DAD/MS

2.5.1 Preparo do extrato e das amostras obtidas pelo fracionamento em C18.

O extrato hidroetanólico de *M. oleifera* foi previamente preparado para análise em HPLC-DAD/MS. Em balança analítica, foram pesados 28 mg do extrato e dissolvidos em 1 mL de Metanol PA grau HPLC e 500 µL de água Mili-Q, respectivamente. A solução foi levada ao banho ultrassônico por 5 minutos. Após dissolução do extrato, a amostra passou por um processo de *clean up*, sendo aplicada em cartucho de SPE de 0,45 µm (Macherey-Nagel Chromabond® C18 EC). Primeiramente foram passados 5 volumes mortos de 5 mL de metanol puro grau HPLC, seguidos de 6 volumes de 5 mL de metanol HPLC:água Mili-Q (95:5) para equilíbrio do cartucho e por último foi aplicada 3 mL de amostra, e passados 4 volumes de metanol HPLC:água Mili-Q (95:5). Uma alíquota de 2 µl do extrato foi injetada no sistema de análise LC/DAD/MS para coleta dos dados cromatográficos.

As amostras obtidas no fracionamento em C18 foram dissolvidas em 1,5 mL de MeOH:H_2O50%. Todas as amostras foram diluídas para um volume final de 1,5 mL, utilizando-se MeOH:H_2O50% como diluente. Para as amostras de extrato e as frações MEOH20%, MEOH40%, MEOH60%, MEOH80% e MEOH100% 150,0 µL das amostras diluídas foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL onde se adicionou 1350,0 µL de MeOH:H_2O 50%. No caso da amostra água 100%, transferiu-se 15,0 µL da solução para um microtubo de 1,5 mL, adicionando-se posteriormente 1485,0 µL de MeOH:H_2O 50%.

As amostras obtidas no processo de diluição descrito acima foram centrifugadas em minicentrífuga Eppendorf ® MiniSpin a 10000 rpm por 3 min. Posteriormente, transferiu-se 1,0 mL de cada amostra para um vial de 2,0 mL para posterior análise. Foram injetados 5 µL de cada amostra para análise LC-MS.

2.5.2 HPLC-DAD-MS

A análise foi realizada utilizando um HPLC Shimadzu® Prominence: sistema modular binário, contendo: duas bombas LC-20AD, desgaseificador de fase móvel DGU-20A3R, amostrador automático SIL-20AHT, forno para colunas CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software BrukerDaktonics, DataAnalysis, Versão 4.1. Acoplado a um espectrômetro de massas: Bruker® Amazon, com configuração ESI-IT-MS.

2.5.3 Condições para análise HPLC-DAD-MS

A separação por HPLC foi realizada em uma coluna Luna C18 (250x4.6 mm 5 µm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Fase móvel: acetonitrila + 0,1% Ác. Fórmico (A) e Água + 0,1 % de Ác. Fórmico. Gradiente exploratório: 05-100% de A em B em 40 min. A cromatografia foi

realizada a 40°C com fluxo de 1 mL/min. As amostras foram monitoradas por detector PDA na faixa de 200-800 nm. Frequência de amostragem: 4,1667Hz e Tempo de aquisição: 50,0 minutos.

2.5.4 Condições espectrofotométricas de massa

Os parâmetros de ionização foram os seguintes: tensão capilar 4500V, tensão da placa final -500 V, nebulização de gás de nitrogênio a 50,0 p.s.i., gás de secagem de 10L/min de nitrogênio a 300°C. A faixa de aquisição foi de 50 a 1500 m/z. Os espectros de MS-MS foram gravados no modo auto-MS-MS. A amplitude de fragmentação foi ajustada para 1,0 V. Os espectros de massa foram adquiridos simultaneamente usando ionização por eletrospray nos modos de ionização positiva e negativa.

2.6 Avaliação da atividade antioxidante

2.6.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH

Para a avaliação da capacidade antioxidante no sequestro do radical livre DPPH foi utilizada a metodologia descrita por Blois (1958) e Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. Uma mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato (100 mM / pH 5,5), 1,25 mL de etanol absoluto, 250 µL de solução etanólica de DPPH (500 µM) e 50 µL do extrato diluído em etanol nas concentrações 500, 1000, 3000, 5000 e 10000 µg/mL, foi agitada em vórtex e permaneceu em repouso por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade. O DPPH apresenta máxima absorbância à 517 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H+, indicado pela mudança da coloração roxa para amarelo. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm.

Todas as determinações foram realizadas em triplicada e a atividade sequestradora do radical DPPH foi expressa em porcentagem, sendo calculada de acordo com a seguinte equação: Atividade antioxidante (%) = [(Acontrole-Aamostra) / Acontrole] x 100. Onde, Acontrole é a absorbância do controle (contém tudo exceto a amostra) e Aamostra é a absorbância da amostra após 30 minutos. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

2.6.2 Potencial redutor de ferro (FRAP)

Para a determinação da capacidade antioxidante por meio do teste FRAP foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) baseada na capacidade do composto antioxidante em reduzir o Fe (III) em Fe (II).

No escuro, o reagente FRAP foi preparado com 25 mL de tampão acetato (300 mM / pH 3.6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM) em solução de HCl (40 mM) e 2,5 mL de FeCl3 (20 mM). Foram

misturados 90 µL das amostras nas concentrações de 500, 1000, 3000, 5000 e 10000 µg/mL com 270 µL de água ultrapura e 2,7 mL do reagente FRAP. Em seguida, foram agitados em vórtex e mantidos em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Depois de resfriadas, as amostras foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro UV- visível. Uma curva de calibração padrão foi construída utilizando-se Trolox e os resultados foram expressos em µM equivalente de Trolox (ET) por g de extrato seco. As determinações foram realizadas em triplicada.

2.6.3 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

Para a avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica foi empregada a metodologia do TBARS (tiobarbituric acid reactive species), descrita por Guimarães et al. (2010), com algumas modificações. A gema de ovo foi homogeneizada (1%, p/v) em tampão PBS (20 mM / pH 7,4). Deste homogenato, 1 mL foi sonicado e homogeneizado com 0,1 mL do extrato diluído em diferentes concentrações (3000, 5000 e 10000 µg/mL) ou controle positivo (Trolox 140 µg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH; 0,12 M), durante 30 min em banho-maria a 37ºC. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi adicionada a reação 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecido em banho-maria a 97ºC por 15 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e em seguida incubadas em banho de gelo por mais 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 532 nm e os resultados expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle positivo de lipoperoxidação).

2.6.4 Atividade sequestradora de óxido nítrico (NO)

Para a avaliação da capacidade sequestradora de óxido nítrico (NO) foi utilizada a metodologia descrita por Marcocci et al. (1994) com algumas modificações. O NO foi gerado por decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato salino (PBS) e quantificado pela reação colorimétrica de Griess, onde ocorre a formação de um cromóforo róseo durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletilenodiamino. Uma mistura reacional contendo 320 µL de solução de extrato diluído em diferentes concentrações (3000, 5000 e 10000µg/mL), 360 µL NPS (25 mM/ PBS pH 7,4) e 215 µL do reagente de Griess foram adicionadas em tubos de ensaio e incubadas em banho-maria 37°C por 2 horas, na ausência de luz. A absorbância do teste foi determinada em espectrofotômetro UV-visível a 540 nm. Os resultados obtidos foram colocados em uma equação da reta, obtida pela regressão linear de uma curva de calibração padrão de nitrito de sódio, obtida sob as mesmas condições do teste e os resultados expressos em quantidade de nitrito formado (µM/mL).

2.6.5 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL)

O ensaio ORAC-FL foi realizado como previamente descrito por Dávalos e colaboradores (2004), utilizando um leitor de fluorescência em microplacas Synergy HT- Biotek Instruments (comprimento de excitação 470nm e emissão 520nm). Radicais peroxil foram gerados pela decomposição do AAPH a 37ºC. A fluoresceína foi utilizada como sonda fluorescente, onde a perda da fluorescência indica dano a fluoresceína pela reação com radicais peroxil. Neste ensaio, 20µL de amostra (50 e 12,5 µg/mL) ou padrão Trolox (0,1µmol/mL) foram misturados com 130µL de solução de fluoresceína a 0,1µmol/mL em microplaca escura de 96 poços, em seguida, foi adicionado 50µL de solução AAPH a 80mM, dando início à reação. Foi preparado também um controle utilizando tampão fosfato 75mM em substituição a amostra. A intensidade da fluorescência foi lida a cada 5 minutos por 120 minutos. A área sob a curva (AUC) de cada amostra e padrão foi calculada e o valor de ORAC foi determinado pela divisão do slope da curva de regressão linear da amostra pelo slope da curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em Equivalente Trolox.

2.7 Avaliação da atividade antiglicante

2.7.1 Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)

Para determinação da atividade antiglicante, o método utilizado foi adaptado de Ledesma-Osuna et al. (2008). Para tal, 600 µl de diluição de extrato na concentração de 10000 µg/mL ou 600 µL de aminoguanidina (22,1 mg/mL) (controle), foram misturados com 600 µl de BSA (30 mg/mL), 600 µL de Ribose (200 mg/mL) e 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,01 M, pH 8,0). Em seguida as amostras foram aquecidas a 40ºC por 2 dias. Após o aquecimento, as amostras foram dialisadas para remover os sais e açúcar não ligado e mantidas congeladas a -20 °C até à sua utilização, tratamentos foram realizadas em duplicada. BSA não tratado (sem ribose) foi utilizado como controle. Alíquotas das amostras foram analisadas em SDS-PAGE, com gel de corrida a 10% e empacotamento 4%. Após a finalização da eletroforese, os géis foram revelados por Comassie-Blue (R-250). A mobilidade relativa em eletroforese foi definida como a taxa de distância migrada da origem pelo BSA com diferentes tratamentos versus BSA não tratado ou controle.

2.7.2 Determinação de grupos de amina livres

Os grupos de aminas livres da amostra glicada foram determinados pelo método de ortoftalaldeído (OPA) (Fayle et al., 2001; Ledesma-Osuna et al., 2008). O reagente OPA foi preparado com 25 mL de borato de sódio 0,1 M; 2,5 mL de SDS a 20%; 100 uL de 2-mercaptoetanol; 40 mg de OPA (dissolvido em 1 mL de metanol) e ajustado a um volume de 50 mL com água destilada. Uma alíquota da amostra, depois de aquecida, passada por diálise por 24 horas e contendo

50 µg de proteína foi misturada com 1 mL de reagente OPA, incubada durante 2 minutos à temperatura ambiente; em seguida, mensurou-se a absorção a 340 nm contra um branco contendo o reagente OPA. O BSA tratado com ribose foi considerado tendo máxima redução de grupos amina disponíveis. Para a determinação da atividade utilizou-se a fórmula, expressa em porcentagem de redução de glicação, $RG\% = (Abs_{amostra} - Abs_{controle}) / (Abs_{controle}) \times 100$, onde $Abs_{amostra}$ é o tratamento que inclui BSA com ribose e o agente antiglicante (Aminoguanidina ou extrato), e $Abs_{controle}$ é o tratamento com BSA e ribose apenas.

2.7.3 Determinação da fluorescência dos AGEs

A mesma mistura reacional utilizada para a determinação de aminas livres foi incubada em estufa a 37ºC por 7 dias. A formação dos AGEs foi determinada pela medida de suas características fluorescentes utilizando a excitação e emissão máxima de 360 e 460 nm, respectivamente. A leitura foi realizada em duplicada e os resultados expressos por porcentagem de inibição de formação dos AGEs.

2.8 Avaliação da citotoxicidade do extrato

2.8.1 Atividade antiproliferativa em cultura de células

Para avaliação da atividade antiproliferativa em cultura de células do extrato de *M. oleifera*, realizou-se o teste em linhagens celulares humanas tumorais (glioma; mama; ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; rim; pulmão, tipo não pequenas células; próstata; ovário e cólon) e não tumoral (queratinócitos - CLS Cell Line Service).

Os experimentos de atividade antiproliferativa foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks et al. (1991). O crescimento celular foi determinado por espectrofotometria UV-visível, utilizando-se o corante protéico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich®) e as análises foram baseadas na metodologia de triagem *in vitro* para drogas anticâncer realizada pelo NCI, EUA, que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006; Monteiro et al., 2017).

2.8.2 Cultivo e preparo das suspensões celulares

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 (Corning®) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e com solução de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 10 mL/L RPMI 1640, Vitrocell®) (denominado meio completo) e mantidas a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO2. Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de

cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato salina (PBS 0,2 mM, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de solução tripsina/EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®), a 37ºC, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada por meio da adição de meio de cultura completo. No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com meio completo, em suas respectivas densidades de inoculação. Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 compartimentos (Corning®), que foram incubadas por 24 horas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T0), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

2.8.3 Preparo e aplicação das amostras

Alíquotas da amostra do extrato foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Para adição à cultura de células, esta solução foi diluída pelo menos 400 vezes em meio completo, o que evitou a toxicidade do DMSO. A amostra do extrato foi adicionada às microplacas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 horas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina (cloridrato de doxorrubicina, Eurofarma) nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento), em triplicata.

No momento de adição da amostra, as células inoculadas na placa controle T0, foram fixadas com a adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA, SigmaAldrich®) a 50% para determinação da quantidade de células presentes no momento em que a amostra foi aplicada, sendo este o valor basal no tempo 0. Após 48 horas de tratamento, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% e incubadas por 1 hora, a 4ºC. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após isso, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 µL/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich®) a 0,4 % (p/v) dissolvido em ácido acético a 1 % (v/v) e, a seguir, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 mM, pH 10,5, Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

2.8.4 Análise dos resultados

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e foi determinado o crescimento celular (em porcentagem) de cada linhagem celular em função das concentrações da amostra testada. Se T > T1, a amostra estimulou o crescimento. Se T0 ≤ T < T1, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi 100 x [(T-T0) / (T1-T0)]. Se T< T0, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi 100 x [(T- T0) / (T0)]. Sendo T a média das absorbâncias das células tratadas, T1 a média das absorbâncias das células não tratadas ao final do tempo de exposição e T0 a média das absorbâncias das células no tempo 0 (início do tempo de exposição). Esses resultados foram expressos em curvas de crescimento celular para cada linhagem em função da concentração da amostra e, a partir deles, foi calculada a concentração efetiva GI50 (concentração necessária para inibição de 50% da viabilidade celular), através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software Origin 8.0 (OriginLab Corporation).

2.8.5 Viabilidade Celular – MTT

Entre os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade de um composto, destaca-se o ensaio pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) proposto por Mosmann em 1983, o qual tem sido amplamente utilizado para determinar a viabilidade e proliferação de células após a exposição a substâncias tóxicas, e também para a caracterização da toxicidade de novos fármacos (Mosmann, 1983; Berridge et al., 2005).

O ensaio com MTT é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem no meio intracelular o sal solúvel de tetrazólio dando origem a cristais de formazan, que é um produto de cor roxa, insolúvel em água. O método envolve a conversão, pelas células, do MTT de coloração amarela em cristais de formazan de coloracão roxa. Após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), os cristais são solubilizados, liberados e quantificados colorimetricamente, através de espectrofotometria tipo ELISA (Collier e Pritsos, 2003; Vellonen et al., 2004).

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados pelo software BioEstat versão 5.0 por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey como post hoc teste. Em todos os casos, as diferenças puderam ser consideradas significativas quando $p<0,5$.

3. Resultados

Avaliação da atividade e determinação do conteúdo de polifenóis e flavonoides totais

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante do extrato das folhas de *M. oleifera*. Na avaliação antioxidante pelo teste DPPH foi observado que o extrato nas concentrações de 3000 e 5000 µg/mL apresentaram maior atividade antioxidante sequestradora do radical DPPH, 63,17% e 80,84% respectivamente. O extrato demonstrou atividade dose-dependente nas maiores concentrações (5000 e 100000 µg/mL) e não diferiu significativamente do ácido gálico padrão, que na concentração de 100 µg/mL apresentou 87,06% de atividade.

A atividade antioxidante avaliada pelo teste FRAP demonstrou maior potencial redutor do extrato na concentração de 3000 µg/mL, 3814,00 µM ET/g de extrato seco. Neste ensaio as concentrações de 5000 e 10000 µg/mL ficaram fora da curva padrão, evidenciando um *plateau* da atividade redutora de ferro pelo extrato na concentração de 3000 µg/mL.

No teste de inibição de peroxidação lipídica os níveis de TBARS na concentração de 3000 µg/mL apresentou a menor formação de espécies reativas ao ácido barbitúrico 34%, e diferiu estatisticamente das demais concentrações utilizadas. Quanto ao controle positivo (trolox), o mesmo apresentou 61,82% em uma concentração de 140 µg/mL.

Para a avaliação da capacidade sequestradora do radical óxido nítrico (NO), na concentração de 5000 µg/mL, o extrato apresentou significativamente a menor formação de nitrito, 0,09 µM/mL de nitrito. O padrão Trolox, no mesmo meio reacional, na concentração de 10 mg/mL apresentou a formação de 8 µM/mL de nitrito.

Tabela 1 - Atividade antioxidante do extrato das folhas de *Moringa oleifera* e controle positivo ácido gálico e trolox por meio dos testes DPPH, FRAP, TBARS e NO.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	DPPH[1]	FRAP[2]	TBARS[3]	NO[4]
Extrato Hidroetanólico	500	-	73,67±02,25a		
	1000	28,62±1,76a	488,33±19,39b	-	
	3000	63,17±0,65b	3814,00±35,15c	34±0,17a	0,91±0,33a
	5000	80,84±0,88c	-	45±0,05b	0,09±0,15b
	10000	77,88±0,93c	-	48±0,01b	-
Ácido gálico	100	87,06±0,24c			
Trolox	140[a]/1000[b]			61,82±0,38c	8.00±0.00c

[1]% Atividade Antioxidante; [2]µM Equivalente Trolox/g de extrato; [3]% TBARS; [4]nitrito (µM/mL); *Extrato, [a]concentração utilizada no teste TBARS, [b]concentração utilizada no teste NO. Médias e desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

O conteúdo total de polifenóis e flavonoides foi determinado na concentração de 10000 µg/mL. Foi observado 596,89 µg/mL de polifenóis e 111,03 µg/mL de flavonoides ER/g no extrato de *M. oleifera*.

Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ORAC-FL

A figura 1 mostra a curva de decaimento da fluorescência induzida por AAPH, tanto para o controle como para as amostras. O aumento nos valores da AUC no teste ORAC-FL reflete um maior potencial antioxidante em prevenir aos danos dos radicais peroxil induzidos por AAPH (Sáenz et al., 2009). As curvas de decaimento da fluorescência de *Moringa oleifera* revelaram atividade antioxidante comparados ao controle, sendo que maior AUC foi obtida para o extrato na concentração de 12,5 µg/mL.

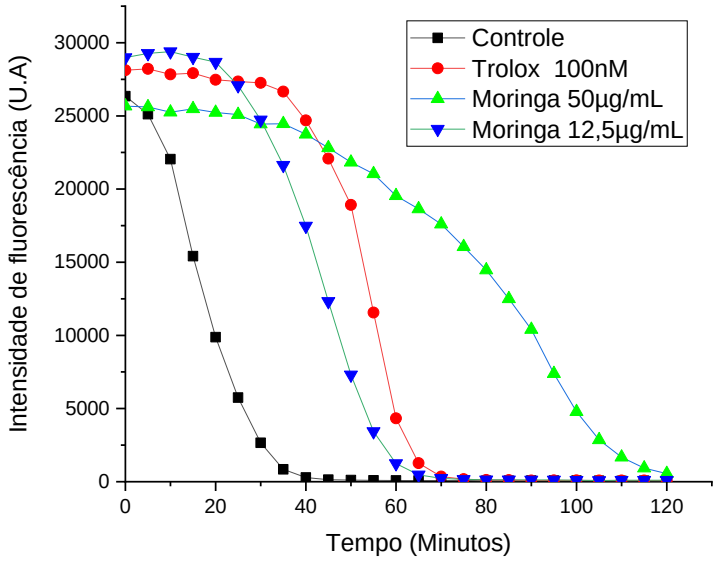


Figura 1 - Curva cinética do ensaio ORAC-FL na presença de extrato de *Moringa oleifera.*

Análise em HPLC-DAD/MS

A caracterização do extrato por HPLC-DAD/MS foi exploratória e teve como objetivo a visualização dos perfis e composição do extrato, buscando identificar os possíveis compostos polifenólicos. As amostras foram monitoradas por detector PDA na faixa de 200-800 nm, e foi escolhida para análise o comprimento de onda de 340 nm e realizada para o extrato no modo positivo. A figura 2 mostra os resultados obtidos na análise por HPLC-DAD/MS, com o cromatograma BPC +All MS (*Base peak chromatogram positive mode*) para o extrato de *M. oleifera.*

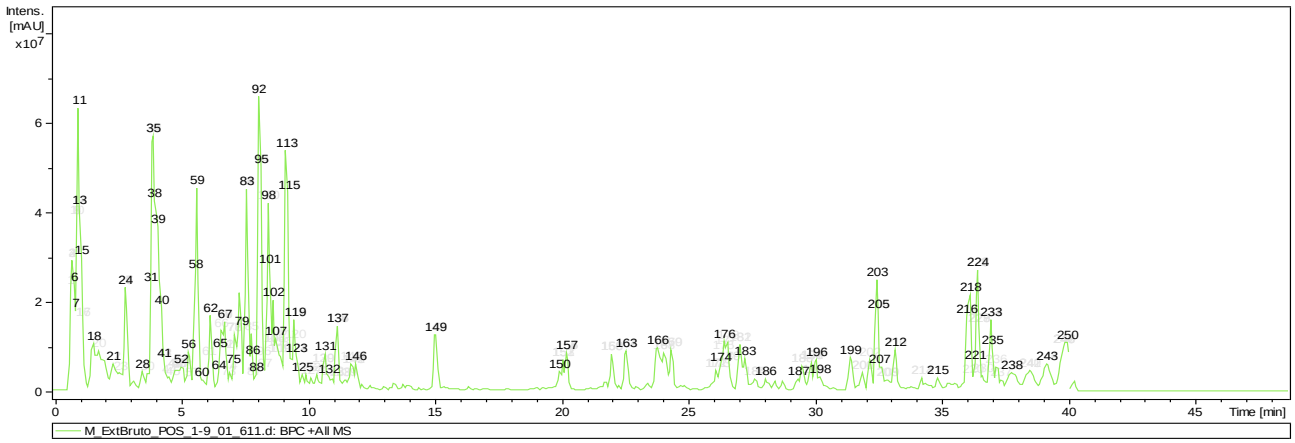


Figura 2 - Cromatograma de pico base (BPC +All MS), no modo positivo, de compostos presentes no extrato de *Moringa oleifera.*

A análise do BPC+All MS mostrou a presença de compostos glicosídeos derivados de quercetina e kaempferol e ácido clorogênico. Foram extraídos espectrômetros de massas dos picos de interesse e de acordo com padrões de fragmentação de flavonoides glicosídeos, foram identificadas as frações cromatográficas descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Frações cromatográficas identificados no extrato das folhas de *M. oleifera*.

Pico	Rt (min)	Frações cromatográficas	$[M + H]^+$ (m/z)	Fragmentos (MS2)
32	2,9	Derivado de ácido clorogênico	355	162
52	4,4	Derivado de ácido clorogênico	355	162
72	5,7	Kaempferol – 3 – *O* – rutinosídeo*	595	
100	7,6	Glicosídeo de Quercetina (Isoquercitrina)*	465	303
112	8,1	Glicosídeo de Quercetina (Q-Rhamnose-Malonyl) *	551	303
121	8,5	Glicosídeo de Kaempferol (K – glicose)	449	287
122	8,5	Glicosídeo de Kaempferol (K – glicose)	287	287
138	9,2	Glicosídeo de Kaempferol (K – glicose – Malonyl) *	535	287

*Composto sugerido

Os compostos 32 e 52, apresentaram a fragmentação do íon protonado $[M + H]^+$ de m/z 355, o que sugere derivados do ácido clorogênico de massa molecular 354,31 g/mol. A fragmentação leva a formação de MS2 m/z de 162, pela perda do ácido quínico $(M+H -193)^+$ (Figuras 3 e 4).

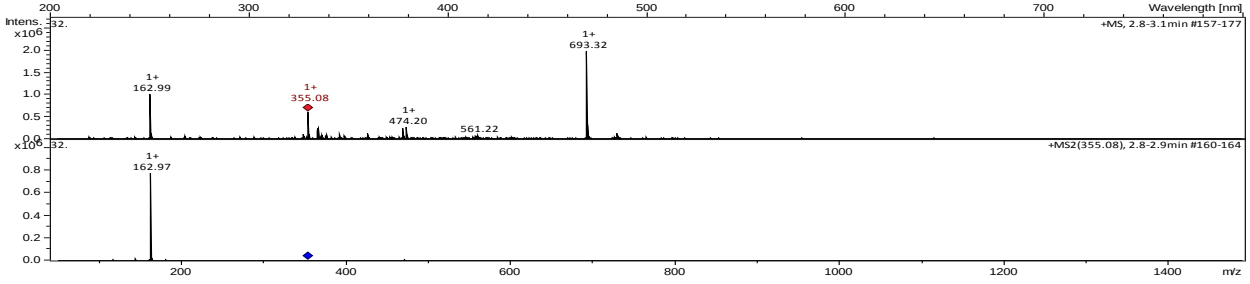


Figura 3 - Espectro MS composto 32.

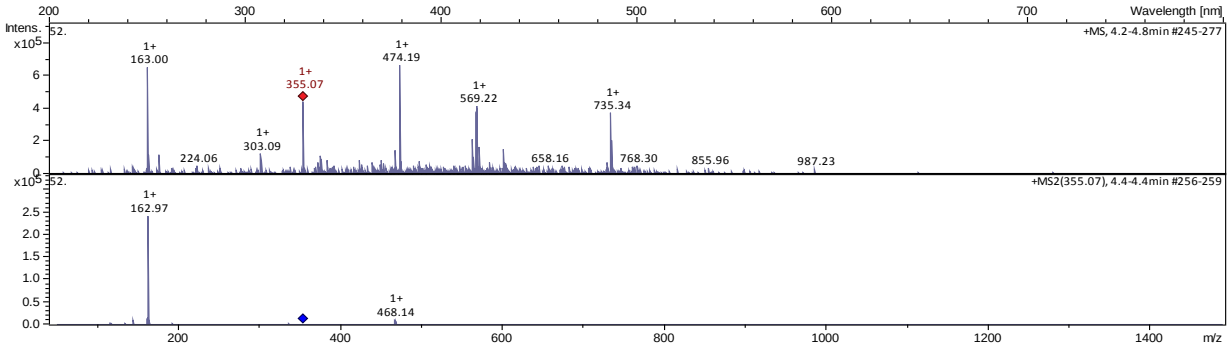


Figura 4 - Espectro MS composto 52.

A fragmentação do composto 72, de íon m/z 595,17, sugere um flavonol, o kaempferol-3-O-rutinosídeo, de peso molecular 594,52 g/mol (Figura 5).

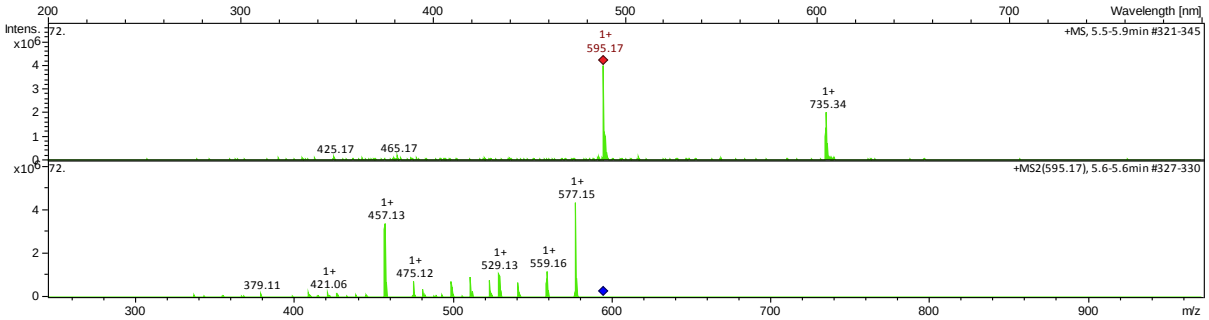


Figura 5 - Espectro MS composto 72.

A fragmentação do composto 99, de m/z 464,55, sugere o derivado de quercetina, denominado isoquercitrina, de peso molecular 463,371g/mol (Quercetina 3-O-glicosideo) (Figura 6).

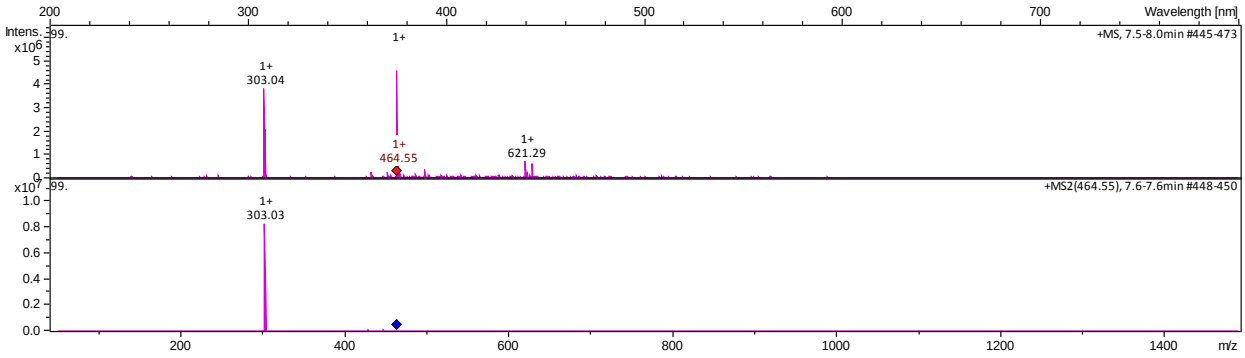


Figura 6 - Espectro MS composto 99.

Composto número 100, de m/z 465, fragmenta-se com a perda de uma glicose, formando o íon m/z 303, o que sugere um glicosídeo de quercetina (Figura 7).

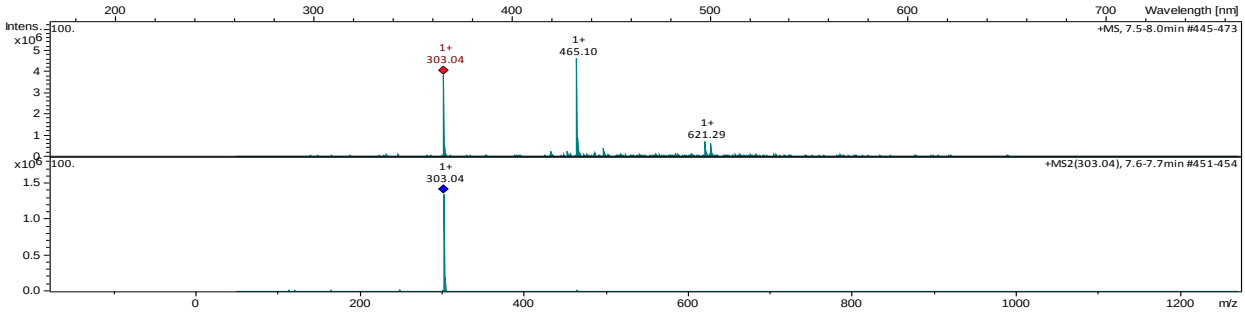


Figura 7 - Espectro MS composto 100.

Composto número 112, íon m/z 551, forma MS2 303. Possível derivado de quercetina. Q-Rha-M (Figura 8).

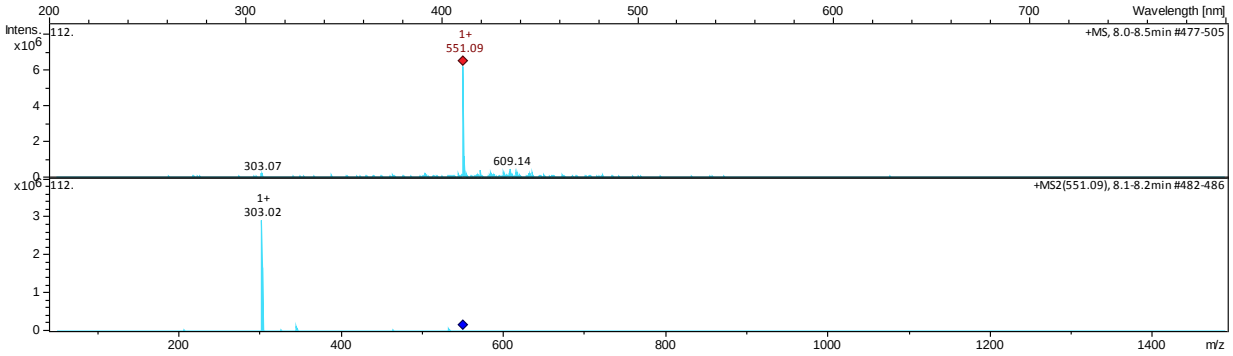


Figura 8 - Espectro MS composto 112.

Compostos 121 e 122 - Apresentaram fragmentação do íon m/z 449,09, com a formação do íon m/z 287,03 pela perda de uma molécula de glicose, o que sugere um glicosídeo derivado de kaempferol (Figuras 9 e 10).

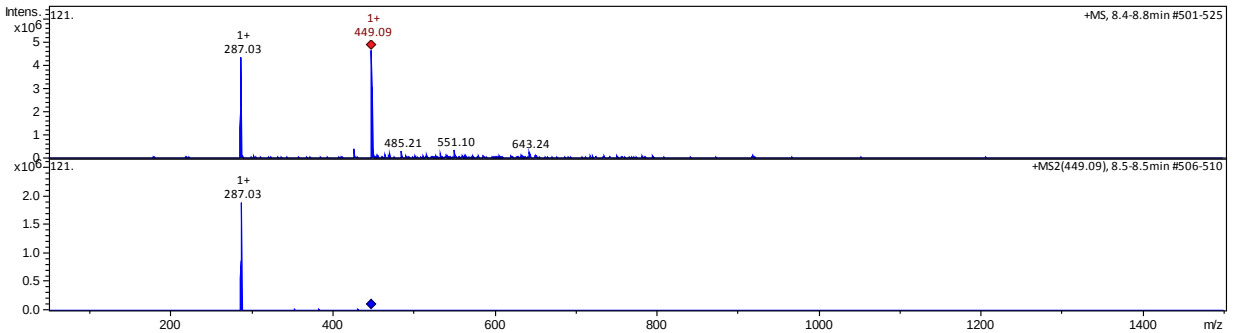


Figura 9 - Espectro MS composto 121.

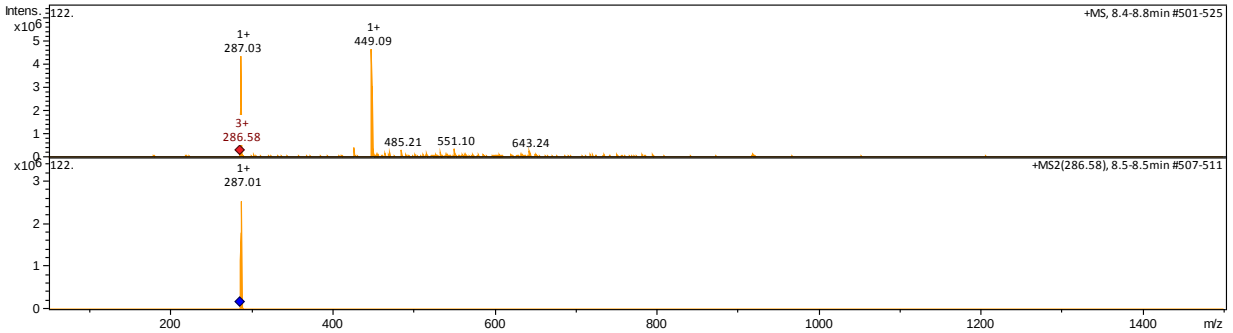


Figura 10 - Espectro MS composto 122.

Composto número 138, de m/z 535, fragmenta-se e forma MS2 287. Sugere um glicosídeo de kaempferol. K – G – Malonyl (Figura 11).

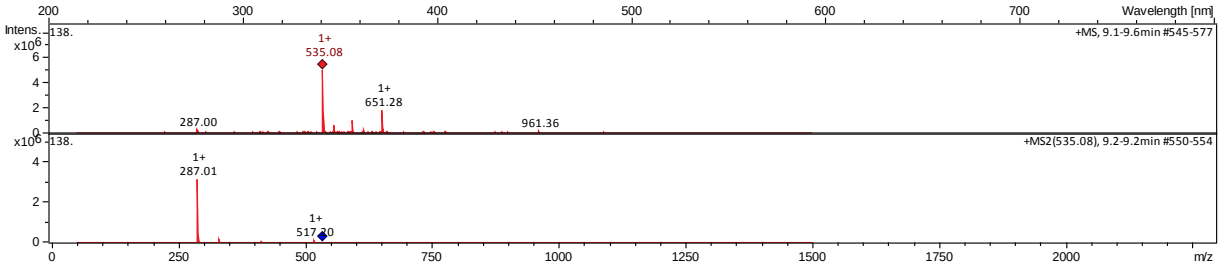


Figura 11 - Espectro MS composto 138.

Na análise qualitativa exploratória, foi escolhido o comprimento de onda 340 nm para a obtenção do espectro UV dos compostos (Figura 12).

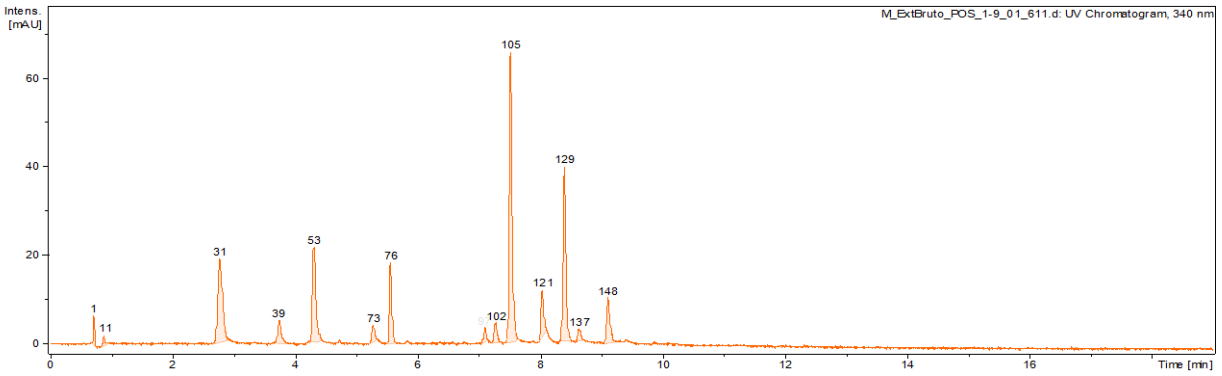


Figura 12 - Cromatograma UV 340 nm do extrato de *M. oleifera.*

A partir do cromatograma UV a 340 nm foram extraídos os espectros com comprimento de absorção máxima dos picos. Os picos 31, 53, 76, 105 121, 129 e 148 apresentaram absorção nas bandas características de flavonoides (Figura 12). O tempo de retenção para cada composto está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Tempo de retenção dos picos do cromatograma UV 340nm.

Pico	Tempo de retenção (Rt) minutos
31	2,7 – 2,9
53	4,2 – 4,4
76	5,5 – 5,6
105	7,5 – 7,6
121	8,0 – 8,1
129	8,3 – 8,5
148	9,0 – 9,2

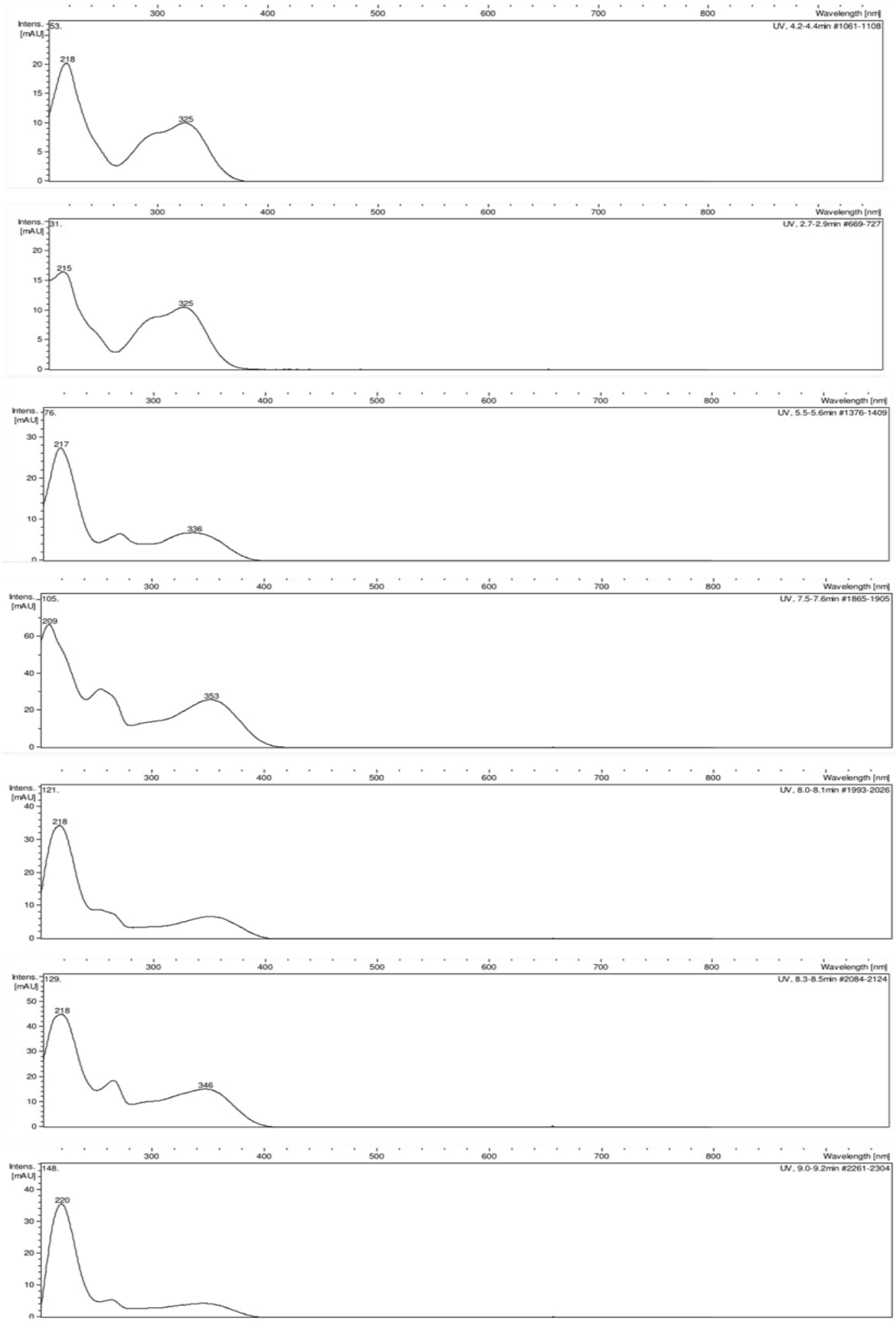


Figura 13 - Espectro UV dos picos obtidos no cromatograma UV 340 nm do extrato de *M. oleifera.*

Atividade antiglicante

Mobilidade proteica relativa em eletroforese (MRE)

Na Figura 14 estão apresentados os perfis eletroforéticos do extrato em contraponto à ação glicante da Ribose e antiglicante da Aminoguanidina. É possível observar que o extrato, de acordo com esta metodologia apresentada, apresentou atividade antiglicante.

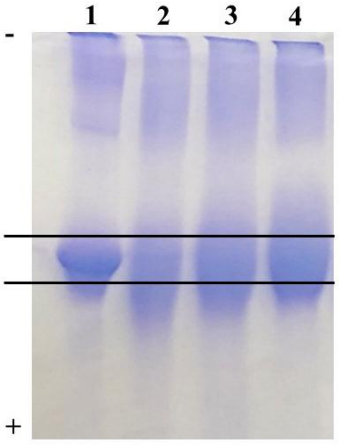


Figura 14 - Teste de mobilidade relativa em eletroforese para avaliação da capacidade antiglicação. 1=BSA, 2=BSA+Ribose, 3=BSA+Ribose+Aminoguanidina e 4= BSA+Ribose+Aminoguanidina e extrato das folhas *M. oleifera*. Onde BSA=Albumina Sérica Bovina.

Determinação de grupos de amina livres (OPA)

Na Figura 15 estão apresentados os valores em porcentagem de aminas livres determinadas pelo método do OPA, realizado com o extrato de *M. oleifera* (EMO) em associação com BSA, como proteína; Ribose (RB), como agente glicante e Aminoguanidina (AMG), como antiglicante. É possível observar que 65% das aminas se encontram livres da glicação na presença da Ribose em associação com o extrato de *M. oleifera*, refletindo, assim, no valor real de aminas livres do grupo tratado com o extrato.

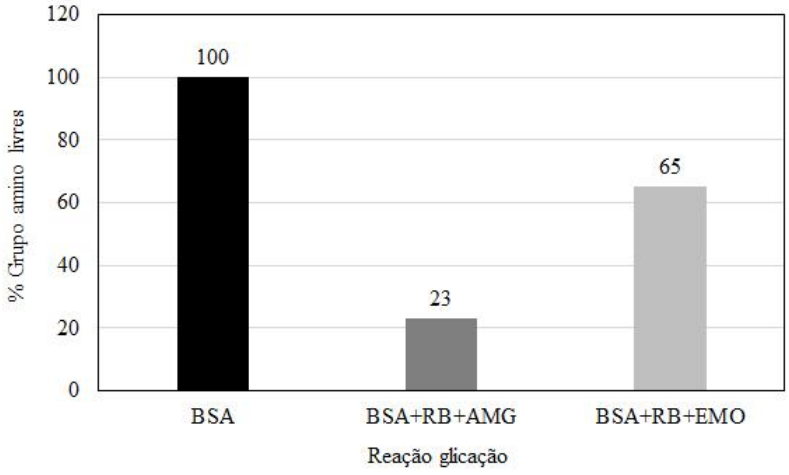


Figura 15 - Porcentagem de aminas livres determinada pelo método do OPA.

Na figura 16 estão apresentados os resultados da determinação de aminas livres expressos por intensidade de fluorescência e porcentagem de inibição de glicação, onde é possível observar, que o extrato inibiu a glicação em aproximadamente 83%, enquanto que o controle tratado com Aminoguanidina apresentou 78% de inibição. Estes resultados estão de acordo com a fluorescência determinadas para as amostras reacionais avaliadas.

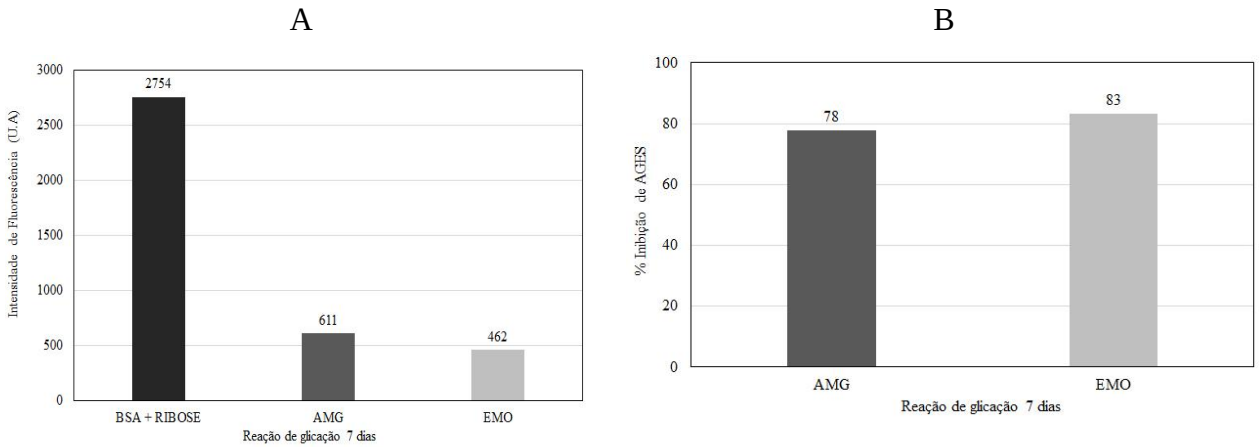


Figura 16 - Resultados da formação dos AGEs determinada por intensidade de fluorescência (A) e porcentagem de inibição dos AGEs (B).

Avaliação da citotoxicidade do extrato - Ensaio de Sulforrodamina B e MTT

Para o ensaio de Sulforrodamina B a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. O extrato foi testado em diluição seriada, em triplicata. O estudo da atividade citotóxica do extrato foi realizado em linhagens tumorais humanas (glioma, mama, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, rim, pulmão-tipo não pequenas células, próstata, ovário e cólon), e comparadas com linhagem não tumoral humana (queratinócito). Observa-se o efeito da doxorrubicina nas linhagens celulares testadas e o efeito do extrato de *M. oleifera*, nas mesmas linhagens celulares (Figura 17). De acordo com os gráficos apresentados é possível observar que o extrato apresentou potencial citostático para todas as linhagens celulares estudadas. De acordo com a Tabela 4, verifica-se que o extrato foi menos citostático para a linhagem de queratinócitos humanos (q =HaCaT).

Tabela 4 - Atividade antiproliferativa

	2	M	a	7	4	p	o	h	q
Doxorrubicina	0,026	<0,025	0,16	<0,025	<0,025	0,23	0,14	0,26	<0,025
Ext. Moringa	208,31	193,52	44,20	37,51	102,20	34,79	32,34	*	16,61

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-O (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); h = HT-29 (cólon). Linhagem não tumoral humana: q = HaCaT (queratinócito). GI_{50}: *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular. * GI_{50} > 250 µg/mL- Atividade antiproliferativa expressa como concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular (GI_{50}, µg/mL)

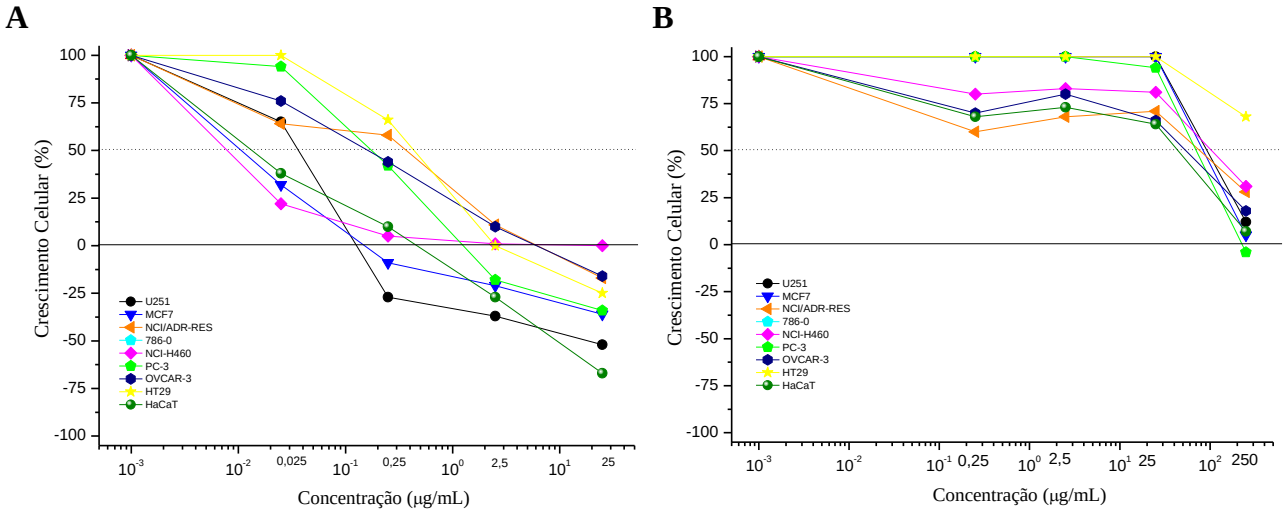


Figura 17 - Efeito da doxorrubicina (A) e do extrato de *M. oleifera* (B) em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos.

Para o ensaio do MTT foi utilizada linhagem de células de queratinócitos humanos (HaCaT). Foi possível verificar que o extrato se mostrou citotóxico desde a menor concentração testada (1,56 mg/mL) (Figura 18).

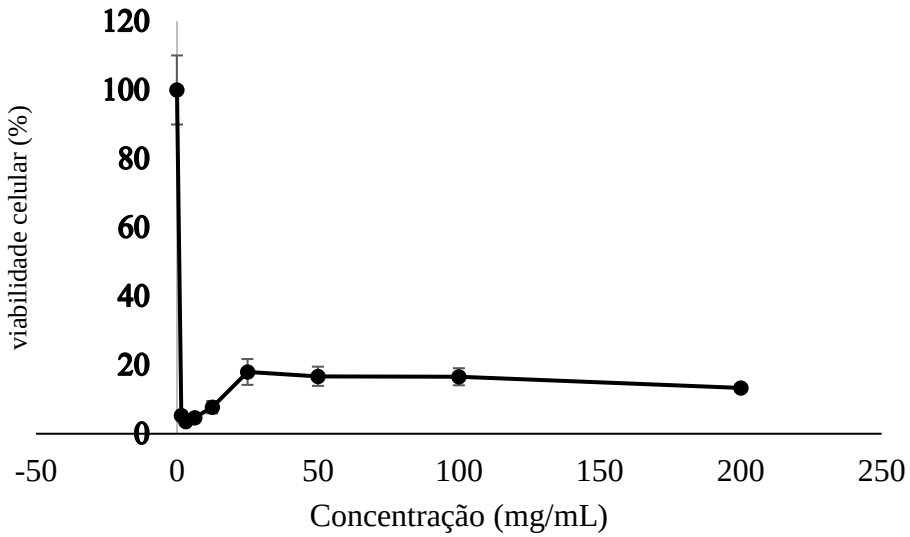


Figura 18 - Efeito do extrato de *M. oleifera* na viabilidade celular.

4. Discussão

A atividade antioxidante avaliada no presente estudo demonstrou que o extrato de *M. oleifera* representa uma importante fonte de compostos antioxidantes presente em suas folhas. Isto pode ser observado pelos métodos de avaliação adotados, como a avaliação do sequestro do íon DPPH, o efeito quelante do ferro (FRAP), a peroxidação lipídica (TBARS), o sequestro do óxido nítrico (NO) e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL). Estes dados reforçam e corroboram aos encontrados por Nambiar et al. (2013), Rodríguez-Pérez et al. (2015), Gimenis et al. (2018) e Thomson et al. (2018). Porém no presente estudo são apresentados resultados do potencial antioxidante avaliado por diferentes métodos, os quais não foram realizados concomitantemente nos estudos até o momento publicado.

Diante do potencial antioxidante apresentado pelo extrato de *M. oleifera* e sabendo que os compostos fenólicos, mais precisamente a classe dos flavonoides, representam os compostos com tal atividade, foi determinado o conteúdo fenólico e flavonoídico total no mesmo. Os resultados obtidos estão de acordo com Coppin et al. (2013) e Jaiswal et al. (2013), onde os mesmos demonstraram a presença de diferentes compostos fenólicos e flavonoides como compostos ativos do extrato.

Por meio da análise em cromatografia líquida de alta eficiência das frações do extrato de *M. oleifera* foi possível constatar a presença de ácido clorogênico e compostos flavonoídicos nas mesmas. Em análise semelhante realizada Amaglo et al. (2010), indicaram a presença de compostos como açúcares, principalmente ramnose (glucosinolatos e isotiocianatos) e compostos flavonoídicos relativamente complexos, consistindo de glicosídeos, rutinosídeos, malonilglucosídeos, kaempferol, quercetina e isoramnetina no extrato das folhas *M. oleifera*. Somado a isso, Van Dijk et al. (2009) e Tunnicliffe et al. (2011) demostraram em seus estudos a importância do ácido clorogênico em

controlar os níveis de açúcar no sangue e Edwards et al. (2007) e Larson et al. (2012) demostraram que o composto flavonoídico quercetina apresenta expressiva atividade antioxidante e pode influenciar na pressão arterial, reduzindo a mesma em pacientes hipertensos. Estes estudos estão concernentes com as atividades atribuídas à utilização da *M. oleifera* na alimentação e tratamento de diferentes doenças, assim como também foi observado a presença destes compostos no presente estudo e sua possível relação com a atividade antioxidante.

Na avaliação antiglicante pelo teste de MRE, OPA e determinação de AGEs por fluorescência, utilizando o BSA padrão como proteína, e Ribose como agente glicante, foi possível constatar que o extrato apresentou atividade antiglicante, pois diminuiu a degradação da estrutura molecular do BSA na presença de ribose, resultando na diminuição da mobilidade da proteína em gel de poliacrilamida. A atividade antiglicante do extrato também pôde ser observada pelo aumento da porcentagem de aminas livres no BSA em associação com extrato de *M. oleifera* evitando assim a glicação da ribose sobre o BSA. Esta constatação foi evidenciada também pela determinação da formação dos AGEs, tanto avaliado pela fluorescência como na porcentagem de inibição dos AGEs.

Estudos realizados por Lunceford e Gugliucci (2005) e Ramkissoon et al. (2013), têm demonstrado a importância da investigação da capacidade antiglicante de compostos naturais de origem vegetal, por suas ações preventivas e para tratamento de doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento. Apesar disso, e de acordo com Peng et al. (2008) é difícil decidir exatamente em que sentido ou em qual fase há intervenção do extrato para reduzir a formação de produtos finais da glicação avançada. No entanto, Gugliucci et al. (2009) e Beaulieu et al. (2010) consideraram que a alta capacidade antioxidante está correlacionada com a atividade antiglicação e esta pode ser provocada pela eliminação de radicais livres e/ou atividades de captura de íons de metais.

Para a avalição da citotoxicidade do extrato, sabe-se que uma ampla gama de produtos de origem natural pode apresentar toxicidade ao nível genético e celular ou sistêmico. Neste contexto, a utilização de ensaios preliminares com células que permitam a avaliação inicial acerca da toxicidade de um produto é amplamente recomendada devido ao baixo custo, rápida obtenção de resultados, visando também evitar o uso desnecessário de animais. Entre estes estão os testes com sulforrodamina B e, ainda mais utilizado, o teste do MTT, que possibilita verificar, por espectrofotometria, o efeito de produtos sobre a viabilidade celular (Mosmann, 1983; Alley et al., 1988).

De acordo com o guideline da OECD (2010) (Organization for Economic Cooperation and Development) para testar substâncias químicas usando os testes *in vitro*, devem ser avaliadas no mínimo três concentrações diferentes. Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para se verificar a toxicidade de novos compostos, principalmente quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (Melo et al., 2000).

Os resultados de citotoxicidade obtidos demonstram que o extrato das folhas de *M. oleifera* tem efeito inibitório em diferentes linhagens celulares. Anwar e colaboradores (2007) demonstram que as folhas são uma fonte potencial para atividade antitumoral. Patel e Pande (2018), sobre citotoxicidade da *M. oleifera*, reforçam que o extrato de folhas de *Moringa oleifera* tem um significativo efeito inibitório em diferentes linhagens celulares, porém não induzem citotoxicidade em células normais. Em outros estudos, Ghosh e Gaba (2013) e Muhammad et al. (2013) demonstraram que *M. oleifera* é exemplo de planta rica em flavonoides e utilizada no tratamento de feridas pois contribuiu para o aumento na proliferação e migração de fibroblastos, assim como proliferação em células Hacat. Os autores atribuem estes resultados à presença de derivados de ácidos fenólicos no extrato avaliado.

5. Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que *Moringa oleifera* possui potencial para ser utilizada como fonte de compostos antioxidantes, antiglicantes e citotoxicidade em linhagens de células tumorais, refletindo na possibilidade da utilização desta espécie em diversas aplicações na área da saúde, cosmética e alimentação.

REFERÊNCIAS

ABD RANI, N. Z.; HUSAIN, K.; KUMOLOSASI, E. *Moringa* Genus: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. Frontiers in Pharmacology, v. 9, 2018.

ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; AND BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Research, v. 48, p. 589-601, 1988.

AL-MALKI, A. L.; EL RABEY, H. A. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. BioMed Research International, 2015.

AMAGLO, N. K.; BENNETT, R. N.; LO CURTO, R. B.; ROSA, E. A. S.; LO TURCO, V.; GIUFFRIDA, A.; LO CURTO, A.; CREA, F.; TIMPO, G. M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chemistry, v.122, p. 1047-1054, 2010.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. Phytotherapy Research, v. 21, p. 17-25, 2007.

BEAULIEU, L.F.; HARRIS, C.S.; SALEEM, A.; CUERRIER, A.; HADDAD, P.S.; MARTINEAU, L.C.; BENETT, A.I.; ARNASON, J.T. Inhibitory effect of the creetradicional medicine wiishichimanaanh (Vacciniumvitis-idaea) on Advanced glycation end product formation: Identification of active principles. Phytotherapy Research, v. 24, p. 741-747, 2010.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry, v. 239, n.1, p. 70-76, 1996.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: 377 new insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review, v. 11, p. 127-152, 2005.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT - Food Science and Technology, v. 28, p. 25-30, 1995.

CHRIST, B.; MUELLER, K. H. On the serial determination of the content of flavonol derivatives in drugs. Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges, v. 293, n. 65, p. 1033-1042, 1960.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. Biochemical Pharmacology, v. 66, n. 2, p. 281-287, 2003.

COPPIN, J. P.; XUA, Y.; CHENA, H.; PANB, MIN-HSIUNG; HOC, CHI-TANG; JULIANIA, R.; JAMES E. SIMONA, QINGLIWUA. Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. Journal of Functional Foods, v. 5, p. 1892-1899, 2013.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, p. 48-54, 2004.

EDWARDS, R. L.; LYON, T.; LITWIN, S. E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J. D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. Journal of Nutrition, v. 137, p. 2405-2411, 2007.

FAYLE, S. E.; HEALY, J. P.; BROWN, P. A.; REID, E. A.; GERRARD, J. A.; AMES, J. M. Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins. Electrophoresis, v. 22, p. 1518-1525, 2001.

FAROOQ, B. KOUL, B. Comparative analysis of the antioxidant, antibacterial and plant growth promoting potential of five Indian varieties of *Moringa oleifera* L. South African Journal of Botany, 2019.

GIMENIS, J. M.; GOMES, A. C.; SANTOS, V. H. M.; FERREIRA, P. C.; OLIVEIRA, C. A.; BABY, A. R.; SILVA, R. M. G. Antioxidant and photoprotective potential of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). Bioscience Journal, v. 34, n. 5, 2018.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-Extracts in Wound HealingJournal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.16, n.5, p. 760 - 820, 2013.

GUGLIUCCI, A.; KOTANI, K.; TAING, J. Short-term low calorie diet intervention reduces serum advanced glycation end products in healthy overweight or obese adults. Annals of Nutrition and Metabolism, v. 54, p. 197-201, 2009.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. Basic & Clinical Pharmacolology & Toxicology, v. 107, p. 949-957, 2010.

IVORRA, M. D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. Journal of Ethnopharmacology, v. 27, p. 243-275, 1989.

JAISWAL, D.; RAI, P. K.; MEHTA, S.; CHATTERJI, S.; SHUKLA, S.; RAI, D. K.; SHARMA, G.; SHARMA, B.; KHAIR, S.; WATAL, G. Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidetive stress. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, p. 426-432, 2013.

LARSON, A. J.; SYMONS, J. D.; JALILI, T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. Advances in Nutrition,v. 3, p. 39-46, 2012.

LEDESMA-OSUNA, A. I.; RAMOS-CLAMONT, G.; VÁZQUEZ-MORENO, L. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. Acta Biochimica Polonia, v. 55, n. 3, p. 491-497, 2008.

LUNCEFORD, N., GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. Fitoterapia, v. 76, p. 419-431, 2005.

MARCOCCI, L.; MAGUIER, J. J.; DROY-LEFAIX, M. T.; PACKER, L. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract. Biochemical Research Communications, v. 201, n. 2, p. 748-755, 1994.

MELO, P. S. Derivados da desidrocrotonina: síntese, atividade antiulcerogênica e citotoxicidade. 116 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MONKS A.; SCUDIERO D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER R.; PAULL K.; VISTICA D.; HOSE C.; LANGLEY J.; CRONISE P.; VAIGRO-WOLFF A.; GRAY-GOODRICH M.; CAMPBELL H.; MAYO J.; BOYD M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. Journal of the National Cancer Institute, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTEIRO, P. A.; ZELIOLI, I. A. M.; DE OLIVEIRA SOUSA, I. M.; RUIZ, A. L. T. G.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Chemical composition and antiproliferative activity of Croton campestris A.St.-Hil. essential oil. Natural Product Research, v. 9, p. 1-4, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays. The Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, A. A.; PAUZI, N. A. S.; ARULSELVAN, P.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. In vitro wound healing potential and identification of bioactive compounds from Moringa oleifera Lam. BioMed research international, v. 2013, p.1-10, 2013.

NAMBIAR, V.; MATELA, H.; BAPTIST, A. Total antioxidant capacity using ferric reducing antioxidant power and 2, 2diphenyl1picrylhydrazylmethods and phenolic composition of fresh and dried drumstick (*Moringa oleifera*) leaves. International Journal of Green Pharmacy, v. 7, p. 66-72, 2013.

OECD Test. 487: in vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, v. 4, 2010.

PATEL, V.; PANDE, V. Screening of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Various Human Cancerious Cell Line Using Microtiter Plate Based Assay. Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences, v. 14, n. 1, 2018.

PENG, X.; CHENG, K.-W.; MA, J.; CHEN, B.; HO, C.-T.; LO, C. *Cinnamon* bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation end products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 1907-1911, 2008.

RAMKISSOON, J. S.; MAHOMOODALLY, M. F.; AHMED, N.; SUBRATTY, A. H. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, p. 561-569, 2013.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉB, R.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. Industrial Crops and Products, v. 66, p. 246-254, 2015.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. Nature Reviews: Cancer, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 2144-2155, 2003.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. The American Journal of Enology and Viticulture, v. 16, p. 144-158, 1965.

THOMSON, J. C.; WILLIS, S.; VERGHESE, M. Antioxidant Content and Capacity of Moringa Leaf. Nutrition and Food Toxicology, v. 3, 2018.

TSHABALALA, T.; NDHLALA, A. R.; NCUBE, B.; ABDELGADIR, H. A.; VAN STADEN, J. Potential substitution of the root with the leaf in the use of *Moringa oleifera* for antimicrobial, antidiabetic and antioxidant properties. South African Journal of Botany, 2019.

TUNNICLIFFE, J. M.; ELLER, L. K.; REIMER, R. A.; HITTEL, D. S.; SHEARER, J. Chlorogenic acid differentially affects postprandial glucose and glucose-dependent insulinotropic polypeptide response in rats. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism., v. 36, p. 650-659, 2011.

VAN DIJK, A. E.; OLTHOF, M. R.; MEEUSE, J. C.; SEEBUS, E.; HEINE, R. J.; VAN DAM, R. M. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. Diabetes Care, v. 32, p. 1023-1025, 2009.

VELLONEN, K. S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to 77 underestimation of drug toxicity. European journal of pharmaceutical sciences, v. 23, n. 2, p. 181-188, 2004.

CAPÍTULO 2

Análises por Biometrologia cutânea de lipossomas contendo extrato de folhas de *Moringa oleifera* L.

Resumo

Neste estudo foi obtido lipossomas e aplicado o extrato hidroetanólico das folhas de *Moringa oleifera* Lam para análise instrumental da integridade da barreira cutânea. Para a análise instrumental da eficácia das formulações foram utilizados os equipamentos de biometrologia cutânea Corneometer® CM825, Tewameter® TM300 e pHmeter® pH900. Foi observado que os lipossomas incorporados com o extrato *Moringa oleifera* apresentou melhor estabilidade quando comparado aos lipossomas sem extrato, o que sugere que o extrato teve efeito positivo na formação dos lipossomas. Com relação aos testes biofísicos realizados foi possível observar que as formulações com os lipossomas incorporados com o extrato mantiveram a hidratação da pele.

1 Introdução

Moringa oleifera Lam é uma planta com diversas propriedades já comprovadas e devido a estas propriedades, muitas indústrias estão desenvolvendo vários produtos com moringa, como cápsulas, chás, óleos, sabões, shampoos, cremes anti-rugas, suplementos de saúde, medicamentos, dentre outros (Anwar et al., 2007; Thurber e Fahey, 2009; Koul e Chase, 2015; Oyeyinka e Oyeyinka, 2018).

O mercado cosmético brasileiro apresentou nos últimos 10 anos um crescimento de 8,2% e o setor fechou 2017 com um crescimento de 3,2%. Atualmente o Brasil ocupa a quarta colocação no ranking mundial, atrás somente do Japão, China e dos Estados Unidos (ABIHPEC, 2019). Considerando a imensa segmentação do setor em produtos para cuidado da pele e anexos cutâneos, os cosméticos com hidratação comprovada são extensamente comercializados e garantem posição de destaque no mercado (Chaves et al, 2014).

Em dermocosmética, os lipossomas constituem, atualmente, uma tecnologia de ponta, que vem, de certa forma consolidar as bases dos cosméticos. A pele, maior órgão do corpo humano, é atraente para a aplicação com ação tópica ou sistêmica, em caso de entrega de medicamentos no tratamento de uma ampla variedade de doenças. No entanto, o estrato córneo é uma barreira eficaz que dificulta a penetração na pele. Dentro deste contexto, os lipossomas emergem como um transportador potencial para melhorar a distribuição tópica de agentes para cuidados da integridade da pele e com ação terapêutica (Carita et al., 2018).

Sabe-se que a membrana celular é composta, entre outros constituintes, de fosfolipídeos, proteínas e pequena quantidade de colesterol. Com o envelhecimento há um aumento progressivo de colesterol, que vai provocando o enrijecimento da membrana e tornando mais lento o intercâmbio celular com o exterior. Quando os fibroblastos diminuem sua atividade, o colapso na síntese de

colágeno e elastina determina o aparecimento de rugas e flacidez. Por isso, a utilização de lipossomas como transportadores de substâncias para cuidado da pele é intensa em diversas formulações, pois além de serem capazes de encapsular compostos biologicamente ativos, eles interagem com a membrana celular restituindo sua fluidez (Oliveira, 1993). Algumas das vantagens do emprego de lipossomas são evidenciadas ao fato de que podem transportar substâncias hidro e lipossolúveis; apresentam alta afinidade pelas membranas biológicas devido à sua estrutura de bicamada, são constituídos de anfifílicos naturais biocompatíveis e biodegradáveis, além de acentuarem a hidratação natural da pele e de anexos cutâneos (Chorilli et al., 2004).

A pele possui diversas funções como a homeostase e a proteção, porém estas funções são desempenhadas com excelência quando o tecido tegumentar apresenta condições normais e plenas de funcionamento e cuidado (Jacobi, 1959). Para que a pele esteja em estado adequado de funcionamento, dois processos básicos agem em conjunto: a limpeza e a hidratação cutânea (Draelos, 2005). Com a perda de integridade da barreira cutânea e desequilíbrio na descamação corneocítica, há um aumento da perda de água transepidérmica (TEWL) resultando em xerose, com seus sinais e sintomas característicos (Lóden, 1997; Addor, 2010). A desidratação cutânea pode ser tratada ou prevenida com o uso de formulações hidratantes, que agem sobre a pele por diferentes mecanismos de ação.

Nas últimas décadas graças aos avanços científicos relacionados com a pesquisa cutânea ao desenvolvimento de vários equipamentos, tem-se avaliado *in vivo* e de modo não invasivo, a eficácia e a segurança de formulações tópicas para o cuidado e tratamento da pele. Em resultado do avanço tecnológico na área da cosmética e de forma a obterem-se resultados precisos e reprodutíveis, surge a ciência da biometria cutânea que tem por objetivo estudar as características biológicas, mecânicas e funcionais da pele (Roberts et al., 2019). Com os métodos biofísicos existentes é possível mensurar as propriedades mecânicas da pele. Algumas das mais comumente avaliadas incluem a hidratação, a perda de água transepidérmica e o pH cutâneo (Agache et al., 1980; Elkhyat et al., 2001; Shai et al., 2001; Azulay et al., 2010; Benson et al., 2019).

2 Material e Métodos

2.1 Coleta e preparação do extrato

As folhas de *Moringa oleifera* foram coletadas no Campus da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista (22º39’00,66’’S e 50º26’15,86’’O, altitude 845m). As folhas foram primeiramente selecionadas, limpas, e depois submetidas ao processo de secagem, em estufa de ar circulante (Cienlab, Brasil), à temperatura média de 40°C, até obter a propriedade

organoléptica da cor própria para a trituração. As folhas foram trituradas em moedor elétrico (Cienlab, CE-430, Brasil) e o pó resultante foi utilizado para obtenção do extrato.

O extrato das folhas secas da *M. oleifera* foi preparado na proporção de 1:10 (p/v) com solução de etanol a 70% em água destilada, por maceração com agitação e ao abrigo da luz por 24 horas. Após este período, o extrato obtido foi filtrado a vácuo e o resíduo vegetal reextraído por duas vezes. Os volumes resultantes de três repetições foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato foi congelado a -18ºC e posteriormente liofilizado.

Após a eliminação completa do solvente, o rendimento total de extrato seco obtido do preparo de 85 g de pó seco das partes folhas com 850 mL de solução de etanol a 70% em água destilada foi de 9,785 g.

2.2 Lipossomas

2.2.1 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados com dipalmitoilfosfatidilcolina de soja (DPPC) e colesterol (Chol), ambos da Sigma-Aldrich, de acordo com as quantidades relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição lipídica dos lipossomas utilizados.

Formulação	DPPC (mg)	Chol (mg)
	40	2

A mistura de lipídeos foi dissolvida em clorofórmio e após transferida para quatro tubos de ensaio. Em seguida o solvente dos tubos foi evaporado lentamente sob fluxo de nitrogênio, para a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o solvente residual foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 20h. A ressuspensão do filme lipídico foi feita utilizando 1 mL de água milli-Q em cada tubo para a obtenção dos lipossomas vazios e para a obtenção dos lipossomas contendo o extrato de *M. oleifera* foi utilizada 1 mL em cada tubo da solução preparada com 40 mg de extrato e 4 mL de água milli-Q. Para o desprendimento total do lipídeo das paredes do tubo, foram feitas agitações mecânicas em agitador tipo Vórtex, obtendo desta forma uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV´s) que foi submetida ao processo de extrusão para sua homogeneização e padronização de tamanho. Para a técnica de extrusão foi utilizado extrusor Avanti Polar Lipids®, equipado com membrana de policarbonato Nuclepore®, GE Healthcare Life Science, com poros de 100 nm de diâmetro. O equipamento foi aquecido até aproximadamente 60°C e foram realizados 30 ciclos de extrusão afim de se obter lipossomas com tamanho homogêneo (Sharm e Sharma, 1997; Carneiro e Santana, 2004).

2.2.2 Caracterização física dos lipossomas

Após a preparação dos lipossomas, a caracterização física das vesículas foi realizada por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (light scattering), o qual determinou o tamanho médio das vesículas, potencial zeta e índice de polidispersividade (IPD). Tais parâmetros estão relacionados com as características físico-químicas dos lipossomas produzidos. Esta técnica fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, calculado pela equação de Einsten-Stokes. A técnica consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. Esta é captada em sinal que é enviado ao correlator, no qual é feito o processamento dos dados, fornecendo os valores de diâmetro médio e índice de polidispersividade (BERBEL MANAIA et al., 2017). Foi utilizado o equipamento ZetaSizer Nano NS; Malvern Instruments UK, com fonte de laser He-Ne 4,0 mW, 633 nm. O potencial zeta, que indica a carga de superfície dos lipossomas, também foi analisado pelo mesmo equipamento. As amostras de lipossomas foram diluídas em 1:10 antes das análises em água milli-Q.

2.2.3 Estabilidade dos lipossomas

Para realizar o estudo da estabilidade, os lipossomas produzidos foram armazenados em refrigerador em temperatura de 2-8°C durante todo o período de análise. Nos tempos de 24 horas, 15, 30 e 60 dias foram analisados o tamanho médio, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta.

2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante dos lipossomas

Para a avaliação da capacidade antioxidante dos lipossomas vazios e com o extrato incorporado, foi utilizada a metodologia da atividade sequestradora do radical livre DPPH. Para esta avaliação foi utilizada a metodologia descrita por Blois (1958) e Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. Uma mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato (100 mM / pH 5,5), 1,25 mL de etanol absoluto, 250 µL de solução etanólica de DPPH (500 µM) e 50 µL do extrato diluído em etanol na concentração de 10 mg/mL, foi agitada em vórtex e permaneceu em repouso por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade. O DPPH apresenta máxima absorbância à 517 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H^+, indicado pela mudança da coloração roxa para amarelo. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm.

Todas as determinações foram realizadas em triplicata para análises estatísticas e a atividade sequestradora do radical DPPH foi expressa em porcentagem, sendo calculada de acordo com a seguinte equação: Atividade antioxidante (%) = [(Acontrole-Aamostra) / Acontrole] x 100. Onde, Acontrole é a absorbância do controle (contém tudo exceto a amostra) e Aamostra é a absorbância da amostra após 30 minutos. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

2.3 Preparo das formulações

Foi usada a hidroxietilcelulose para a preparação dos géis. Esta goma é utilizada em bases dermatológicas pois possui bom espalhamento, não é gordurosa e pode veicular ingredientes ativos hidrossolúveis e também lipossomas. Foram desenvolvidas bases gel com extrato de *M. oleifera* e lipossomas, com e sem extrato de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Desenvolvimento das formulações BS (base gel), EX (base com o extrato), LV (base com lipossomas sem extrato) e LE (base com lipossomas com extrato incorporado).

Nome Químico	**INCI NAME**	**Função**	**BS (%)**	**EX (%)**	**LV (%)**	**LE (%)**
Hidroxietilcelulose	*Hydroxyethylcellulose*	Agente de consistência	2,0	2,0	2,0	2,0
Propilenoglicol	*Propyleneglycol*	Umectante	8,0	8,0	8,0	8,0
Metilisotiazolinona e fenoxietanol	*Methylisothiazolinone and phenoxyethanol*	Conservante	0,5	0,5	0,5	0,5
* Extrato líquido de M*oringa oleifera*	-	Hidratante		5		
Lipossomas	Liposomes	Vetor para transporte de substâncias			5	
Lipossomas com extrato de M*oringa oleifera*	-	Hidratante				5
Glicerina	Glycerin	Umectante	2,0	2,0	2,0	2,0
Água purificada	*Aqua*	Veículo	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p

* Extrato líquido de *Moringa oleifera*: o extrato foi preparado utilizando-se 200mg do extrato de *Moringa oleifera,* solubilizado em 20mL de água destilada.

O método de preparo das formulações consistiu em primeiramente pesar e medir os componentes da formulação. Em um béquer foram transferidos a água, a hidroxietilcelulose, o propilenoglicol e a glicerina. Em banho-maria foi aquecido à 70º até a formação de um gel espesso. Em seguida foi retirado do aquecimento e com 30º foi adicionado a metilisotiazolinona e fenoxietanol. Após resfriamento da formulação em temperatura ambiente, foram adicionados os lipossomas e o extrato de acordo com a tabela acima e envasados.

Após a incorporação do extrato e dos lipossomas, foi medido o valor de pH de todas as formulações, e o valor encontrado nas mesmas foi 5,5, antes e após a adição do extrato ou das formulações de lipossomas.

2.4 Delineamento experimental

Tratou-se de um estudo randomizado, no qual métodos biometrológicos foram utilizados para mensurar a hidratação, perda de água transepidérmica e pH cutâneo, importantes para avaliação de função barreira da pele (Silva et al., 2009). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista – UNIP através da Plataforma Brasil (parecer número 2.920.018).

Foram selecionados doze voluntários adultos do sexo feminino e masculino, com idade entre 18 e 50 anos, que não apresentavam nenhum tipo de lesão cutânea, nem qualquer relato de alergia a géis hidratantes. Os participantes foram devidamente informados sobre o experimento e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

No laboratório, foi realizado controle de temperatura, mantida em (22ºC ± 2), e de umidade relativa, que se manteve em (45% ± 5).

Os participantes foram previamente orientados a não utilizar nenhum tipo de creme quarenta e oito (48) horas antes do experimento e chegar ao laboratório com meia hora de antecedência para ambientação.

Estando os antebraços limpos e na região sem pelos, foram demarcados quadrados de 3cm², distantes 3cm entre si. Em cada quadrado, foi realizada a aplicação de uma das amostras, em ordem aleatória, no antebraço dos participantes, na concentração de 2mg de creme por cm^2 de pele. Um desses quadrados foi a área controle, onde nada foi aplicado. O quadrado de número 1 correspondeu à aplicação do gel BS; o quadrado 2, do gel EX; o quadrado 3, do gel LV e o quadrado 4, do gel LE. O quadrado 5 foi utilizado como controle, sem aplicação de produto.

Depois de aplicadas todas as amostras, foram realizadas as medidas de hidratação através do Corneometer®, de perda de água transepidérmica através do Tewameter®, e pH da pele com o pHmeter®, ambos da marca Courage – Khazaka® (Colónia, Alemanha).

Os tempos para leitura das amostras foram antes da aplicação do produto, 1 hora após, 2 horas após, 3 horas após e 4 horas após aplicação. A partir das medidas realizadas nos intervalos de tempo citados, calculou-se o valor médio de hidratação e o valor médio de perda de água transepidérmica dos voluntários e o valor médio da variação de pH.

2.5 Avaliação por Biometrologia Cutânea

2.5.1. Avaliação *in vivo* da hidratação cutânea - Corneometer®CM825

Desde sua primeira fabricação comercial em 1982, o Corneometer® tornou-se um dos dispositivos mais utilizados para a avaliação quantitativa da hidratação epidérmica. O Corneometer® é um método convencional e simples que determina o conteúdo em água da epiderme (Sotoodian e Maibach, 2012). Baseia-se no princípio da capacitância, já que o estrato córneo seco é um meio

dielétrico, e esta propriedade é alterada conforme a quantidade de água presente. A medida consiste na comparação da constante dielétrica da água com a de outras substâncias. O capacitor, formado entre a base da sonda Corneometer® e a pele, apresenta alterações no valor da capacitância conforme o conteúdo de água (Chaves et al., 2014). A medição da capacitância da superfície cutânea é convertida em unidades arbitrárias, que correspondem ao grau de hidratação, e que variam teoricamente de 0 a 120 UA (Holm et al., 2006; Leonardi et al., 2002). No entanto, *in vivo* esta técnica apresenta um intervalo de sensibilidade de 20 a 110 UA (Takiwaki, 2006). O Corneometer® tem uma variedade de aplicações na prática dermatológica e cosmética, onde é usado para avaliar efeitos dos produtos cosméticos na pele, na hidratação, e no estudo de condições como psoríase e dermatite atópica (Werner, 1986; Berardesca et al., 1990; Borzdynski et al., 2017).

2.5.2. Avaliação *in vivo* da perda de água transepidérmica - Tewameter®TM300

É importante avaliar a integridade da barreira cutânea com aparelhos capazes de medir a porcentagem de água que se evapora à superfície da pele, uma vez que existe um aumento da perda de água transepidérmica (TEWL – Transepidermal Water Loss) quando a barreira se encontra danificada (Buraczewska et al., 2007).

A água encontra-se na derme na forma de um reservatório e segue uma direção do interior para o exterior da pele. Quando chega à superfície cutânea, sofre evaporação e estabelece-se um fluxo constante de água. Esse fluxo varia consoante os indivíduos sendo maior numa pele bem hidratada do que numa pele insuficientemente hidratada em que o estrato córneo aparece seco. A média de fluxo de água que evapora à superfície da pele é de 5g de água/m^2 /hora, e corresponde a uma perda de água de 300 a 400ml/24horas (Martini, 2005). No entanto, apesar de ser uma evaporação permanente, a água é renovada por um processo de difusão a partir das camadas mais profundas da pele e também é compensada por um aporte nutricional, denominando-se este processo por perda de água transepidérmica (Martini, 2005; Rosado et al., 2009).

O Tewameter® mede a taxa de evaporação de água na superfície da pele, em mg/(cm^2 h). Baseia-se no processo da evaporimetria e compreende o princípio de avaliação do gradiente de pressão de vapor de água sobre a superfície. O Tewameter® consiste numa sonda cilíndrica, aberta nas duas extremidades, ligada a um dispositivo de processamento de sinal. A sonda compreende dois pares de sensores, dois sensores de humidade emparelhados com dois sensores de temperatura. Os dois pares de sensores são colocados sobre a superfície da pele a distâncias diferentes, 4,5mm e 10,5mm respetivamente para os sensores de humidade e os sensores de temperatura (Rogiers, 2001; Serup, 2006). A medida da TEWL, e consequente qualidade da função barreira da pele, é um parâmetro básico a determinar, uma vez que condiciona a aplicação de produtos tanto em áreas médicas como cosméticas. A medida do parâmetro da TEWL é assim considerada de grande

importância, uma vez que permite avaliar se um produto provoca distúrbio na integridade da barreira cutânea ou não. Salienta-se que a avaliação deste parâmetro encontra-se muitas vezes associada à avaliação da hidratação, isto porque a hidratação cutânea encontra-se muito intimamente ligada à TEWL que se verifica a nível cutâneo.

2.5.3. Avaliação *in vivo* do pH cutâneo – pHmeter®PH900

O pH cutâneo varia consoante o indivíduo e a zona corporal, situando-se geralmente entre 4 e 7, representando uma média de 5,5. O pH da superfície cutânea é assim um pH ácido, no entanto passa a pH neutro na derme (cerca de 7). Esta diferença deve-se ao aumento da atividade dos íons H+ devido a hidrolases presentes na epiderme e que originam vários ácidos hidrossolúveis, principalmente o ácido urocânico, o ácidopirrolidinona-5-carboxílico e o ácido lático. Estes ácidos provêm na sua maioria da desintegração da filagrina, e o valor de pH vai decrescendo à medida que ocorre o processo de queratinização. O pH da pele é um parâmetro crucial a considerar uma vez que se observa que praticamente todas as dermatoses são acompanhadas de uma alcalinização da superfície da pele. O seu valor é influenciado por fatores como a idade (há um aumento do pH cutâneo com a idade), o gênero (pH é mais alcalino nas mulheres) e fatores externos (o uso de detergentes aumenta o pH) (Martini, 2005).

A avaliação do pH da superfície da pele constitui um importante parâmetro de medição da bioengenharia da pele, uma vez que fornece informações sobre a sua capacidade tampão. Este mecanismo de regulação é de extrema importância para a manutenção da integridade e coesão do estrato córneo, bem como da homeostasia e função antimicrobiana. Assim, é essencial proceder à medição do pH cutâneo para proceder à avaliação geral do estado fisiológico da pele (Fluhr et al., 2006).

O método mais comum para determinar o pH cutâneo baseia-se no princípio da potenciometria, como o aparelho de medida o pH meter® da Courage Khazaka. A determinação da acidez cutânea é efetuada por potenciometria direta através de eletrodos especiais (Barata, 2002). Constitui um método rápido, fácil e económico para determinar o pH da superfície da pele ou do couro cabeludo. O aparelho baseia-se numa sonda constituída por um eletrodo de medida, sensível aos íons H+, e por um eletrodo de referência. A sonda encontra-se ligada a um cabo que contém o sistema eletrônico de medição.

Medidas da variação do pH cutâneo tem grande relevância em campos de aplicação farmacêuticos e cosméticos nomeadamente para o desenvolvimento de produtos específicos tais como produtos para cuidados da pele e do couro cabeludo, detergentes e produtos farmacêuticos. A determinação do pH é também muito útil para o diagnóstico e monitorização de doenças da pele relacionadas com variações nos valores de pH. É também importante a determinação da acidez da

superfície da pele quando se pretende promover produtos como champôs, sabonetes ou ainda produtos de cuidados para a pele.

3. Resultados

3.1 Caracterização física dos lipossomas

A caracterização físico-química de nanocarreadores como os lipossomas é essencial para se conhecer seu comportamento, o que garantirá a qualidade do sistema produzido, além de conferir segurança para seu uso futuro em meio biológico. Para os lipossomas, a técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light scattering – "DLS") é a mais utilizada e determina o tamanho médio dos lipossomas, índice de polidispersividade (IPD), além do potencial zeta. A medida do tamanho médio dos lipossomas está relacionada com o movimento de suas flutuações brownianas. O equipamento concentra um feixe de luz laser na solução dos lipossomas, e um detector de fótons mede a intensidade do deslocamento da radiação incidente, dependendo do tempo das flutuações. A equação de Stokes-Einstein relaciona a escala de tempo das flutuações das vesículas com o diâmetro hidrodinâmico equivalente da partícula, tornando possível o cálculo de seu tamanho médio. A medida do índice de polidispersividade (IPD) está relacionada com a medida de tamanho médio, e indica a homogeneidade da solução de lipossomas. Valores abaixo de 1 são requeridos para nanocarreadores e são aceitos valores na faixa de 0,01 até 0,7 para lipossomas. Quando menor o valor de IPD, mais homogênea é a solução de lipossomas analisadas. Já o potencial zeta, representa a diferença de potencial entre a superfície da vesícula e o potencial elétrico da solução, e pode ser usado para prever a estabilidade da solução dos lipossomas.

Assim, para conhecer as características do sistema lipossomal produzido, as formulações desenvolvidas foram analisadas em DLS e os resultados são evidenciados na Tabela 3. Foram realizadas novas leituras para verificar a estabilidade do sistema lipossomal produzido nos dias 15, 30 e 60 para todas as formulações.

Tabela 3 - Determinação do tamanho médio (TM), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (Zeta) dos lipossomas contendo extrato de *M. oleifera*.

Dia de Análise	**Lipossomas não encapsulados**			**Lipossomas encapsulados**		
	TM (nm)	IPD	Zeta (mV)	TM (nm)	IPD	Zeta (mV)
24h após	736,4±107,9	0,930±0,09	1,37±0,07	153,9±1,41	0,170±0,01	6,60±0,1
15º dia	1427±274,1	0,930±0,07	0,84±0,09	177,4±1,92	0,356±0,02	4,66±0,11
30ºdia	148,2±2,15	0,066±0,02	-29,7±2,06	174,1±2,44	0,333±0,02	4,46±0,13
60º dia	150,7±0,96	0,094±0,03	-8,88±0,67	-	0,967±0,06	0,43±0,02

Dados apresentados por média ± desvio padrão

Após 24 horas da elaboração dos lipossomas, o tamanho médio dos lipossomas sem extrato foi de 736,4 nm e o tamanho médio dos lipossomas com o extrato foi de 153,9 nm. Pode-se observar que diminuiu o tamanho médio dos lipossomas com o extrato, o que evidencia que o extrato pôde ter contribuído na formação dos lipossomas. O potencial zeta dos lipossomas produzidos foi positivo, para todas as formulações preparadas. O potencial zeta é um dado importante na caracterização dos lipossomas pois pode ser utilizado para prever a estabilidade físico-química das vesículas. O valor padrão de potencial zeta utilizado para isto é de ± 30 mV, ou seja, valores maiores que +30 mV e menores que –30 mV estão relacionados com boa estabilidade dos sistemas produzidos. Como os lipossomas sem extrato incorporado e com extrato incorporado possuem potencial zeta na faixa de 1,37 e 6,60 respectivamente, são então, formulações estáveis. O valor de IPD determina a distribuição de tamanho dos lipossomas produzidos. Valores de IPD que variam de 0,05 a 0,08 indicam amostras monodispersas e com distribuição monomodal, indicando a presença de vesículas em uma só faixa de tamanho médio. Valores de IPD nesta faixa foram encontrados para as formulações obtidas contendo o extrato. Para os lipossomas sem o extrato o valor encontrado foi 0,930 e para os lipossomas com extrato foi 0,170. Valores intermediários de IPD, na faixa de 0,08 a 0,7 são considerados ideais e indicam homogeneidade da amostra analisada, porém, podem indicar a presença de vesículas em outras faixas de tamanho. A adição do extrato à formulação de lipossomas tornou-a mais homogênea. De forma geral, os parâmetros obtidos após caracterização dos lipossomas indicaram que a metodologia empregada produziu lipossomas de qualidade com a incorporação do extrato. Para os lipossomas com extrato incorporado, observa-se que após o 15º e 30º de preparo, estes mantiveram a estabilidade, enquanto os lipossomas sem o extrato não mantiveram a estabilidade.

3.2 Atividade antioxidante dos lipossomas

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante das vesículas com e sem o extrato *M. oleifera*. Na avaliação antioxidante pelo teste DPPH foi observado que os lipossomas sem o extrato apresentaram 14,73% de atividade antioxidante. Já os lipossomas com o extrato apresentaram 69,98% de atividade antioxidante sequestradora do radical DPPH. Esses dados demonstram que os lipídeos utilizados para preparar os lipossomas possuem atividade antioxidante, porém com o extrato, os lipossomas apresentam maior atividade antioxidante.

Tabela 4 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos lipossomas sem e com o extrato incorporado.

Amostras	Concentração (mg/mL)	% AA
Lipossomas sem extrato	-	14,73%
Lipossomas com extrato	10,0	69,98%
Ácido gálico	0,10	87,06

% AA = % de Atividade Antioxidante

Quanto ao controle positivo (ácido gálico), o mesmo apresentou 87,06% em uma concentração de 100 µg/mL.

3.3 Biometrologia Cutânea

3.3.1 Análise do conteúdo de água da pele por Corneometria

A análise do conteúdo de água na pele foi determinada com o aparelho Corneometer® CM825. Para a análise estatística foram comparados os valores da corneometria em relação aos tempos de leitura e em relação aos produtos avaliados.

Comparação dos valores de Corneometer versus Tempo

Foi realizada análise de variância de um fator para comparar as médias dos valores de hidratação (corneometer) de cada produto (BS, EX, LV e LE) e área controle – CT, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, agrupados conforme mostrado na Figura 1 e os valores de significância "p" estão na Tabela 5. É possível observar que valores de significância (p>0,05), não há diferença significativa entre as médias dos valores de hidratação entre os produtos no tempo T0 e nos demais tempos.

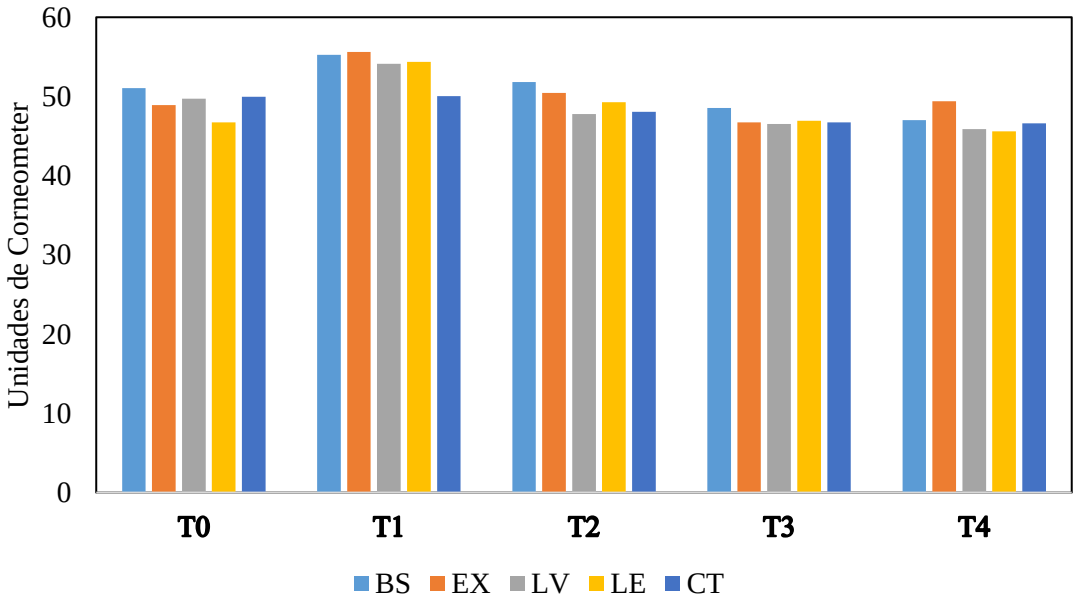


Figura 1 - Comparação dos valores de Corneometer versus Tempo

Tabela 5 - Valores de significância de Corneometer versus Tempo (p>0,05)

Tempo	Valor de p
T0	0,8237
T1	0,5986
T2	0,6747
T3	0,9765
T4	0,7419

Comparação dos valores de Corneometer versus Produto

Foi realizada análise de variância de um fator para comparar as médias dos valores de hidratação (corneometer) de um produto nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, agrupados conforme mostrado na Figura 2, de forma a avaliar se há diferença significativa, por exemplo, entre os valores de hidratação do produto BS nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4 e, e os valores de significância "p" estão na Tabela 6.

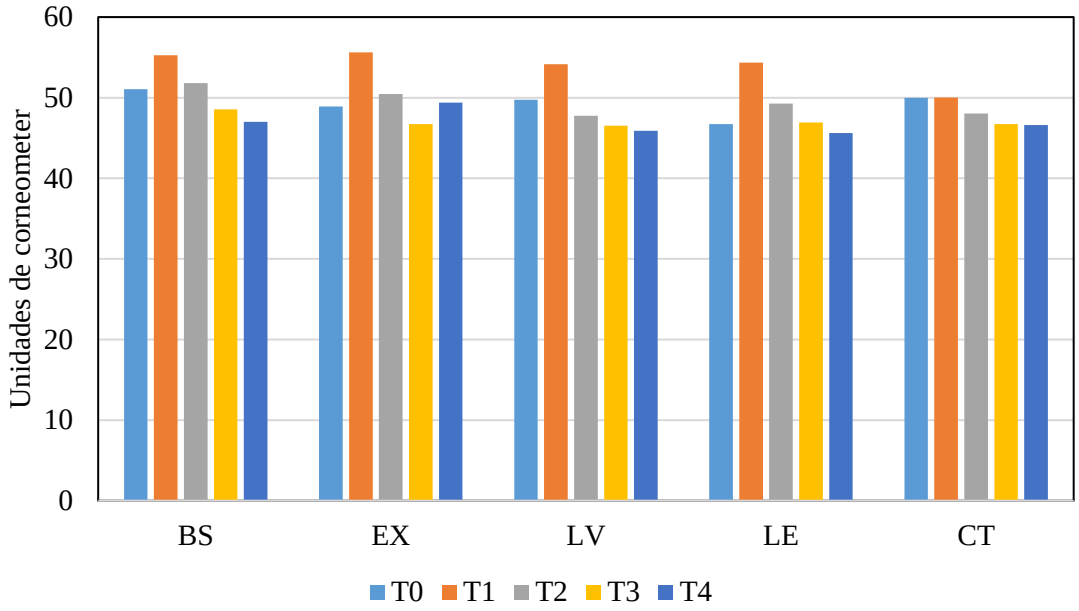


Figura 2 - Comparação dos valores de Corneometer versus Produto

Tabela 6 - Valores de significância de Corneometer versus Produto (p>0,05)

Produto	Valor de p
BS	0,1599
EX	0,0636
LV	0,3108
LE	0,0499
CT	0,7076

Para os produtos BS, EX, LV e área controle - CT, foram encontrados valores de p > 0,05, portanto não há diferença significativa entre as médias dos valores de hidratação de cada um desses produtos e área controle entre os tempos T0 e T4.

O produto LE apresentou valor de p < 0,05, havendo, portanto, diferença significativa entre os valores de hidratação desse produto entre os tempos T0 e T4. Dessa forma, foi aplicado o teste de Tukey para verificar qual média é diferente das demais, conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Análise estatística do produto LE

		Grupos	
Tempo	**Médias**	**a**	**b**
T1	54,3563	****	
T2	49,2552	****	****
T3	46,9218	****	****
T0	46,7333	****	****
T4	45,6031		****

De acordo com essa tabela, é possível inferir que há diferença significativa entre os valores de hidratação do produto LE entre os tempos T1 e T4, ou seja, um valor maior de hidratação na 1ª hora, que depois reduz e, em 4 horas é significativamente menor que na 1ª hora.

Análise da perda de água transepidérmica – TEWL

A análise da perda de água transepidérmica foi determinada com o aparelho Tewameter®TM300. Para a análise estatística foram comparados os valores de TEWL em relação aos tempos de leitura e em relação aos produtos avaliados.

Comparação dos valores de TEWL versus Tempo

Foi realizada a análise de variância de um fator para comparar as médias dos valores de TEWL de cada produto (BS, EX, LV e LE) e área controle - CT nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, agrupados conforme mostrado na Figura 3, e na Tabela 8 estão os valores de "p" obtidos.

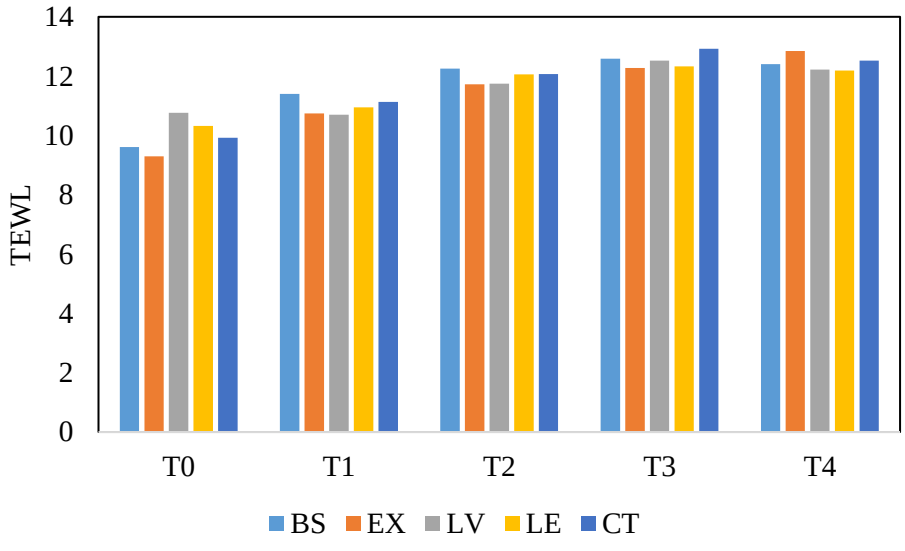


Figura 3 - Comparação dos valores de TEWL versus Tempo

Tabela 8 - Valores de significância de TEWL versus Tempo (p>0,05)

Tempo	Valor de p
T0	0,8467
T1	0,8234
T2	0,9531
T3	0,9579
T4	0,8954

É possível observar os valores de p > 0,05, portanto não há diferença significativa entre as médias dos valores de TEWL entre os produtos no tempo T0 e nos demais tempos.

Comparação dos valores de TEWL versus Produto

Foi realizada a análise de variância de um fator para comparar as médias dos valores de TEWL de um produto nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, agrupados conforme apresentado na Figura 4, de forma a avaliar se há diferença significativa, por exemplo, entre os valores de TEWL do produto BS nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4. Na Tabela 9 estão os valores de "p" obtidos.

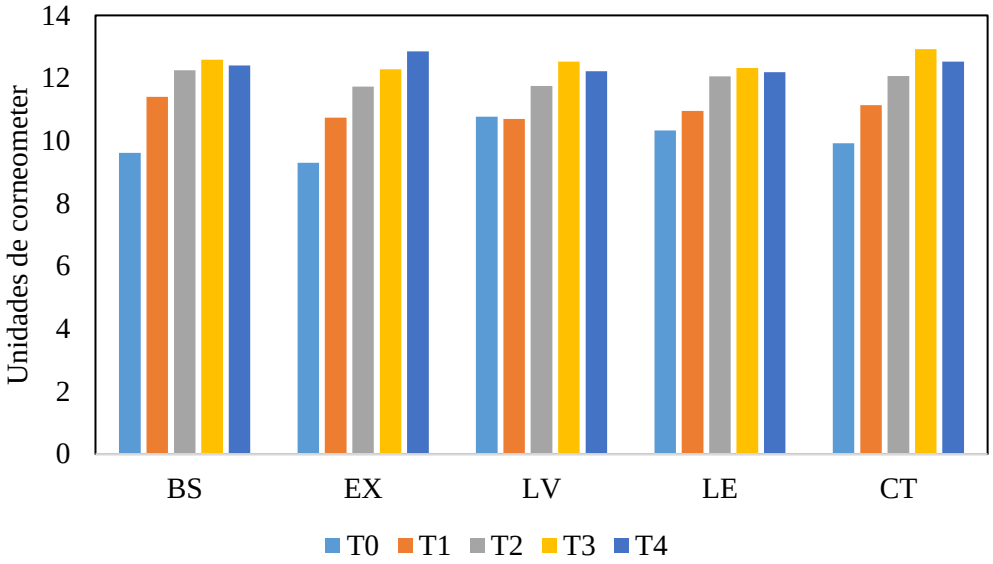


Figura 4 - Comparação dos valores de TEWL versus Produto

Tabela 9 - Valores de significância de TEWL versus Produto (p>0,05)

Produto	Valor de p
BS	0,0012
EX	0,0002
LV	0,4436
LE	0,1453
CT	0,0153

Para os produtos LV e LE os valores de $p > 0,05$, não havendo, portanto, diferença significativa entre os valores de TEWL de cada produto nos tempos analisados.

Para os produtos BS, EX e área controle CT, foram encontrados valores de $p < 0,05$, havendo, portanto, diferenças significativas entre os valores de TEWL de cada produto em relação ao tempo. Foi aplicado o teste de Tukey, de forma a verificar qual ou quais valores de TEWL é (são) diferente(s) dos demais, conforme apresentado nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 - Análise estatística do produto BS

BS			
		Grupos	
Tempo	**Médias**	**a**	**b**
T3	12,58	****	
T4	12,40	****	
T2	12,25	****	
T1	11,40	****	****
T0	9,60		****

De acordo com a Tabela 10, para o produto BS, não há diferença significativa entre os valores de TEWL nos tempos T1, T2, T3 e T4. No entanto, o valor de T0 é significativamente menor que os de T2, T3 e T4, não sendo possível afirmar que é significativamente diferente do valor de T1. De acordo com a Tabela 11, para os dados de EX, a conclusão é a mesma relatada para o produto BS.

Tabela 11 - Análise estatística do produto EX

EX			
		Grupos	
Tempo	**Médias**	**a**	**b**
T4	12,85	****	
T3	12,28	****	
T2	11,73	****	
T1	10,74	****	****
T0	9,29		****

Na Tabela 12, para a área controle CT, pode-se afirmar apenas que o valor de T0 é significativamente menor que o valor de T3.

Tabela 12 - Análise estatística da área controle - CT

CT			
		Grupos	
Tempo	**Médias**	**a**	**b**
T3	12,93	****	
T4	12,53	****	****
T2	12,06	****	****
T1	11,13	****	****
T0	9,91		****

Análise do pH cutâneo

Os valores de pH dos indivíduos em função do tempo apresentaram uma variação média de pH=5,14±0,53 antes da aplicação para pH=5,02±0,50 após 4 horas da aplicação dos géis contendo extrato e/ou lipossomas com e sem extrato.

4. Discussão

Trabalhos realizados por Codevilla et al. (2015) e Taylor et al. (2005) ressaltaram a vantagem da nanotecnologia para a encapsulação de compostos bioativos extraídos de plantas. As pesquisas demonstram os benefícios de associar estes compostos a sistemas nanoestruturados, tanto prevenindo ou promovendo a saúde do consumidor, quanto trazendo benefícios para o produto, melhorando sua qualidade e segurança. Nanoencapsulação envolve a incorporação, absorção ou dispersão de compostos bioativos em pequenas vesículas, com diâmetros nanométricos. Desta forma, os compostos bioativos incorporados podem ser protegidos contra a degradação, melhorar a estabilidade e a solubilidade e, portanto, pode aumentar a disponibilidade e entrega a células e tecidos.

De acordo com os resultados apresentados na encapsulação do extrato em lipossomas, foi possível verificar que o extrato contribuiu na formação dos lipossomas, pois a incorporação do mesmo diminuiu o tamanho médio dos lipossomas, indicou homogeneidade das vesículas, e que favorece a estabilidade do extrato encapsulado, o que corrobora com Berbel Manaia e colaboradores (2017). A incorporação de extratos vegetais com atividade antioxidante parece ser uma maneira eficiente de aumentar a estabilidade de lipossomas de fosfatidilcolina. Estudo conduzido por Atrooz (2007) avaliou os efeitos na estabilidade de lipossomas de três extratos (*Canna indica, Hordium sativum e Capsicum annuum*) que apresentaram atividade doadora de H+ ao radical DPPH e quantidades significativas de flavonoides e polifenóis. Os resultados demonstraram que a adição do extrato aumentou a estabilidade prevenindo a oxidação e a agregação dos lipossomas. Desta forma, a encapsulação do extrato de *M. oleifera* em lipossomas é uma estratégia promissora, pois poderá proporcionar um aumento da disponibilidade do extrato no local de ação, fazendo com que seu efeito

antioxidante seja preservado e intensificado por um período maior, conferindo maior estabilidade do extrato e otimizando assim potencial melhora na qualidade da pele.

Para avaliar o potencial antioxidante dos lipossomas sem e com o extrato incorporado foi utilizado o método de sequestro de radicais livres por DPPH. Desta forma, foi realizado um comparativo entre os lipossomas sem e com extrato, afim de se observar a atividade antioxidante dos lipossomas com *M. oleifera*. Os lipossomas sem extrato apresentaram 14,73% de atividade antioxidante e os lipossomas com extrato apresentaram 69,98% de atividade. Estes resultados demonstram que os lipídeos utilizados para a elaboração dos lipossomas possuem atividade antioxidante, porém inferior aos lipossomas com o extrato incorporado. Diante desses resultados e de acordo com trabalhos realizados por Suzuki & Sakon (1990) e Chorilli e colaboradores (2007), sabe-se que o etanol utilizado na metodologia do teste de DPPH pode ter rompido os lipossomas e liberado o conteúdo encapsulado, já que a porcentagem de atividade antioxidante para estes lipossomas com o extrato incorporado apresentou um valor aproximado de atividade antioxidante semelhante ao extrato bruto. Assim, deve-se avaliar a utilização de lipossomas em bases com altas concentrações de etanol, como os cosméticos que promovem crescimento capilar, pois as estruturas podem ser dissolvidas pelo álcool. Além disso, a solubilização também ocorre quando lipossomas são adicionados a bases com altas concentrações de tensoativos.

Sabe-se que formulações cosméticas hidratantes influenciam as propriedades da barreira cutânea, reduzindo a perda de água transepidérmica e aumentando a hidratação. A partir das análises da perda de água, hidratação e pH cutâneo, foi possível verificar que a presença de *M. oleifera* na formulação não provocou alteração na integridade da barreira cutânea, uma vez que os valores da TEWL foram os mesmos quando medidos antes e após a aplicação dos mesmos. Assim, os produtos com *M. oleifera* não alteraram o normal funcionamento do processo de perda de água transepidérmica. Já sobre o parâmetro da hidratação, a formulação com o extrato em lipossomas causou um aumento imediato da mesma logo após a aplicação do produto. Em relação ao pH cutâneo, foi observado que as formulações com o extrato de *M. oleifera* livre e encapsulado não alteraram o pH da pele. Desta forma, em relação à área controle, o produto com os lipossomas com a *M. oleifera* demonstrou atividade hidratante, não alterou a TEWL e o pH cutâneo, sugerindo a integridade da barreira cutânea. Trabalhos realizados por Ali et al. (2013a, 2013b, 2014) com extrato bruto das folhas da *M. oleifera* em formulações tópicas por biometrologia cutânea demonstraram eficácia em melhorar a umidade da pele e ação fotoprotetora. De acordo com os mesmos autores, supõe-se que a melhoria nos parâmetros da superfície da pele pode ser atribuída aos compostos fenólicos da *M. oleifera* que incluem kaempferol, quercetina, ácido clorogênico, dentre outros. Assim, em formulações tópicas a *M. oleifera* é um ingrediente com atividade potencial para melhorar a hidratação da pele e que apresenta características atrativas para aplicação tópica na prevenção e tratamento de disfunções

mediadas pelo estresse oxidativo e, conforme apontado acima, em lipossomas pode apresentar benefício adicional da sua aplicação em bases tópicas apropriadas e seguras.

5. Conclusão

Os resultados obtidos nesta investigação sugerem que *M. oleifera* possui potencial para ser utilizada como fonte de compostos antioxidantes encapsulados em lipossomas para aplicação em fórmulas cosméticas e farmacêuticas, pois são capazes de aumentar a hidratação e manter a função barreira, reduzindo os sinais de envelhecimento, principalmente os danos causados pelo estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/> Acessado em: 26/06/2019.

ADDOR F. Skin barrier in atopic dermatitis. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, p. 184-94, 2010.

AGACHE, P. G.; MONNEUR, C.; LEVEQUE, J. L.; DE RIGAL, J. Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. Archives for Dermatological Research, 269, p. 221, 1980.

ALI, A.; AKHTAR, N.; CHOWDHARY, F. Enhancement of human skin facial revitalization by moringa leaf extract cream. Postępy Dermatologii i Alergologii, v. 31, p. 71-76, 2014.

ALI, A.; AKHTAR, N.; KHAN, M. S.; RASOOL, F.; IQBAL, F. M.; KHAN, M. T.; DIN, M.; ELAHI, E.Moisturizing effect of cream containing *Moringa oleifera* (Sohajana) leaf extract by biophysical techniques: *In vivo* evaluation. Journal of Medicinal Plants Research, v. 7, p. 386-391, 2013a.

ALI, A.; AKHTAR, N.; MUMTAZ, A. M.; KHAN, M. S.; IQBAL, F. M.; ZAIDI, S. S. *In vivo* skin irritation potential of a cream containing *Moringa oleifera* leaf extract. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 7, p. 289-293, 2013b.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. Phytotherapy Research, v. 25, p. 17-25, 2007.

ATROOZ, O. M. The incorporation effects of methanolic extracts of some plant seeds on the stability of phosphatidylcholine liposomes. Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 10, n. 10, p. 1643-1648, 2007.

AZULAY, M. M.; CUZZI, T.; PINHEIRO, J. C. A.; AZULAY, D. R.; RANGEL, G. B. Métodos objetivos para análise de estudos em dermatologia cosmética. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n. 1, p. 65-71, 2010.

BARATA, E. A. F. Cosméticos - Arte e Ciência. Lidel, 2002.

BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S.; LEITE-SILVA, V. R.; WALTERS, K. Cosmetic formulation: principles and practice. CRC Press, 2019.

BERARDESCA, E.; FIDELI, D.; BORRONI, G.; RABBIOSI, G.; MAIBACH, H. *In vivo* hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. Acta Dermato-Venereologica, v. 70, p. 400-404, 1990.

BERBEL MANAIA, E.; PAIVA ABUÇAFY, M.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; LALLO SILVA, B.; SHIRO-JÚNIOR, J. A.; CHIAVACCI, L. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. International Journal of Nanomedicine, v.12, p. 4991-5011, 2017.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT - Food Science and Technology, v. 28, p. 25-30, 1995.

BORZDYNSKI, C. J.; MCGUINESS, W.; MILLER, C. Emerging Technology for Enhanced Assessment of Skin Status. Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing, v. 44, p. 48-54, 2017.

BURACZEWSKA, I.; BROSTROM, U. B.; LODÉN, M. Artificial reduction in transepidermal water loss improves skin barrier function. British Journal of Dermatology, v. 157, p. 82-86, 2007.

CARNEIRO, A. L.; SANTANA, M. H. A. Production of liposomes in a multitubular system useful for scaling-up of processes. In: GALEMBEK, F. (Ed.). Progress in Colloid & Polymer Science, Surface and Colloid Science. New York: Springer, v. 128, p. 273-276, 2004.

CARITA, A. C.; ELOY, J. O.; CHORILLI, M.; LEE, R. J.; LEONARDI, G. R. Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. Current Medicinal Chemistry, v. 13, p. 606-635, 2018.

CHAVES, C. A. C.; D'AGOSTINO, M. C.; BABY, A. R.; LEITE SILVA, V. R. Biometrological methods to evaluate *in vivo* the skin hydratation of different commercial moisturizers containing 10.0% urea as the main claim. Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research, p. 101-110, 2014.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; DE OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2007.

CHORILLI, M. et al. Lipossomas e suas aplicações dermocosméticas. Infarma, v. 16, n. 7-8, p. 75-79, 2004.

CODEVILLA, C. F.; BAZANA, M. T.; SILVA, C. B.; BARIN, J. S.; MENEZES, C. R. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. Ciência e Natura, v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 142-151, 2015.

DRAELOS, Z. D. Cosmecêuticos. Elsevier: Rio de Janeiro 2005.

ELKHYAT, A.: AGACHE, P.; ZAHOUANI, H.; HUMBERT, P. G. A new method to measure in vivo human skin hydrophobia. International Journal of Cosmetic Science, 23, p. 347-352, 2001.

FLUHR, J. W.; BANKOVA, L.; DIKSTEIN, S. Skin Surface pH: Mechanism, Measurement, Importance. In: Serup, Jemec e Grove (Eds.). Handbook of Non Invasive Methods and the Skin. 2ª ed. New York, Taylor&Francis, pp. 411-417, 2006.

HOLM, E. A.; WULF, H. C.; THOMASSEN, L.; JEMEC, G. B. Instrumental assessment of atopic eczema: validation of transepidermal water loss, stratum corneum hydration, erythema, scaling, and edema. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 55, p. 772-780, 2006.

KOUL, B.; CHASE, N. *Moringa oleifera* Lam.: panacea to several maladies. Journal of Chemistry and Pharmaceutical Research., v. 7, p. 687-707, 2015.

JACOBI, O. K. Moisture regulation in the skin. Drug and Cosmetic Industry, v. 84, p. 732-812, 1959.

LODÉN, M. Barrier recovery and influence of irritant stimuli in skin treated with a moisturizing cream. Contact Dermatitis, v. 36, p. 256-60, 1997.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. Application of a noninvasive method to study the moisturizing effect of formulations containing vitamins A or E or ceramide on human skin. International Journal of Cosmetic Science, v. 53, p. 263-268, 2002.

MARTINI, M. C. Hidratación cutánea y productos hidratantes. In: Martini (Ed.). Introdución a la dermofarmácia y a la cosmetologia. Zaragoza, Acribia, S.A., p. 39-45, 2005.

OLIVEIRA, A. G., Lipossomas: Aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras. Caderno de Farmácia, v. 9, n. 2, p. 71-76, 1993.

OYEYINKA, A. T.; OYEYINKA, S. A. *Moringa oleifera* as a food fortificant: recent trends and prospects. Journal of Saudi Society of Agriculture Sciences, v. 17, p. 127-136, 2018.

ROGIERS, V. EEMCO guidance for the assesment os transepidermal water loss in cosmetic sciences. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol., v. 14, p. 117-128, 2001.

ROSADO, C.; RAIMUNDO, H.; RODRIGUES, L. M. Acerca da Medição da Hidratação "profunda" da Pele. Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, n. 6, p. 65-75, 2009.

SERUP, J. How to choose and use non-invasive methods. In: Serup, Jemec e Grove (Eds.). Handbook of Non Invasive Methods and the Skin. 2ª ed. New York, Taylor&Francis, p. 9-13, 2006.

SHAI, A.; MAIBACH, H. I.; BARAN, R. Handbook of Cosmetic Skin Care. London, Martin Dunitz, 2001.

SILVA, V. R. L.; SCHULMAN, M. A.; FERELLI, C.; GIMENIS, J. M.; RUAS, G. W.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; TAQUEDA, M. E. S.; KANEKO, T. M. Hydrating effects of moisturizer active compounds incorporated into hydrogels: *in vivo* assessment and comparison between devices. Journal of Cosmetic Dermatology, v. 8, n. 1, p. 32-39, 2009.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. Int. J. Pharm., v. 154, p.123-140, 1997.

SOTOODIAN, B.; MAIBACH, H. Noninvasive test methods for epidermal barrier function. Clin Dermatol, v. 30, p. 301-310, 2012.

SUZUKI, K.; SAKON, K. The application of liposomes to cosmetics. Cosm. Toil., v. 105, n.5, p.65-78, 1990.

TAKIWAKI, H. Color measurement from digital images. In: Serup, Jemec e Grove (Eds.). Handbook of Non Invasive Methods and the Skin. 2ª ed. New York, Taylor&Francis, p. 649-651, 2006.

TAYLOR, T. M.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D.; WEISS, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 45, p. 587-605, 2005.

THURBER, M. D.; FAHEY, J. W. Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the "Diffusion of innovations" theory. Ecology of Food and Nutrition, v. 48, p. 212-225, 2009.

WERNER, Y. The water content of the stratum corneum in patients with atopic dermatitis. Measurement with the Corneometer CM 420. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh), v. 66, p. 281, 1986.