



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO

**DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DE  
FITOCOSMÉTICOS CONTENDO EXTRATOS DE *Morus  
nigra* L. (Moraceae): avaliação da atividade fotoprotetora e  
antioxidante**

Recife – PE

2019

RAFAELA SANTOS DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DE  
FITOCOSMÉTICOS CONTENDO EXTRATOS DE *Morus  
nigra* L. (Moraceae): avaliação da atividade fotoprotetora e  
antioxidante**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito do Programa de Doutorado em Biotecnologia para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.

Recife – PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M528d Melo, Rafaela Santos de  
Desenvolvimento e estabilidade de fitocosméticos contendo  
extratos de *Morus nigra* L. (Moraceae): avaliação da atividade  
fotoprotetora e antioxidante / Rafaela Santos de Melo. – Recife,  
2019.  
136 f.: il.

Orientador(a): Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.  
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2019. Ponto focal em  
Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Inclui referências e anexo(s).

1. Antioxidantes 2. Cosméticos 3. Matéria médica vegetal  
4. Essências e óleos essenciais 5. Amora 6. Pele - Cuidado e  
higiene I. Almeida, Jackson Roberto Guedes da Silva, orient.  
II. Título

CDD 620.8

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**RENORBIO**

**TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:**

**RAFAELA SANTOS DE MELO**

**Desenvolvimento e estabilidade de fitocosméticos contendo extratos de *Morus nigra* L. (Moraceae): avaliação da atividade fotoprotetora e antioxidante**

**BANCA EXAMINADORA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 14 de agosto de 2019.

**Orientador:**

---

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
Colegiado de Farmácia – UNIVASF

**Examinadores:**

---

Prof. Dr. Marigilson Pontes de S. Moura - UNIVASF  
Colegiado de Farmácia – UNIVASF

---

Prof. Dr. Mário Adriano Ávila Queiroz - UNIVASF  
Colegiado de Zootecnia– UNIVASF

---

Profa. Dra. Lívia Macedo Dutra – UNIVASF  
Colegiado de Farmácia – UNIVASF

---

Profa. Dra. Larissa Araújo Rolim – UNIVASF  
Colegiado de Farmácia – UNIVASF

Dedico este trabalho à minha mãe, grande inspiração e modelo de amor, luta e vitória. Sem o seu apoio não seria possível chegar até aqui. Para as minhas filhas Mariana e Melissa que são a minha razão de existir e minha maior e mais prazerosa missão. Para meu esposo, Márcio, grande parceiro de vida.

## AGRADECIMENTOS

Em nossa caminhada muitas vezes precisamos de mãos que nos confortam, apoiam e conduzem o caminho. **Deus** é o nosso maior guia e **Jesus**, nosso Mestre que não só nos conduz, mas muitas vezes nos sustenta quando parece que não há mais forças para continuar. Meu agracimento inicial a Eles por fazer acreditar que sempre é possível.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida**, que acreditou em mim desde o início e foi fundamental até os últimos instantes, compartilhando seu aprendizado e exemplo.

Ao Programa de Pós-Graduação **RENORBIO**, nas pessoas de Sandra, Profa. Dra. Áurea e todos os outros pelo apoio, orientação, atenção e carinho.

À minha mãe **Cremilda**, que sempre esteve ao meu lado, me oferecendo carinho, apoio e ensinamento. Obrigada por estar com minhas filhas e me acompanhar nas jornadas de finais de semana e tardes da noite de trabalho. Sendo fortaleza ou se mostrando frágil, ela sempre teve e terá minha admiração e amor para sempre.

Às minhas **filhas Mariana e Melissa** meu obrigada por compreender que a ausência da mamãe foi necessária (e muitas vezes sofrida) e que tudo o que faço é sempre por vocês.

Ao meu esposo **Marcio**, obrigada por compreender e apoiar nos momentos de crise, incentivando diariamente e fazendo acreditar sempre. A toda minha **família** meu agradecimento por todo o apoio.

À toda comunidade acadêmica da **UNIVASF**, servidores e terceirizados que diariamente apoiam e colaboram de alguma forma, em especial a todos os professores que integram o **Colegiado de Enfermagem e Clenilda**. Agradeço ainda aos colaboradores **Jussya, Maica, Lurdinha e Socorro**, que com seu trabalho permitiram que o nosso fosse desenvolvido da melhor forma possível.

Aos membros da UNIVASF, **Profa. Dra. Larissa Rolim, Prof. Dr. Marigilson Moura e Prof. Dr. Mario Queiroz** pelo apoio e atenção.

Aos amigos **Silvio Bonfim** e **Amanda Leite**, que estiveram comigo em tantos momentos colaborando e compartilhando seu valioso conhecimento.

A todos os colegas de doutorado, em especial, **Katia, Noelly, Naiane, Susana**. Ao Neplame, especialmente **Anne, Ana Ediléia, Celuane, Cristiane, Layanne, Raira, Michele, Mayara, Mariane, Mariana**. Aos colegas da CAFMA, em especial **Manu e Bela** pelo trabalho e exemplo de dedicação. Aos amigos **Ana Paula, Andressa, Juninho e Livia** obrigada pelo companheirismo e ensinamentos.

Agradeço ainda meus amigos que sempre me deram apoio, seja com seu conhecimento ou apenas com seu conforto e incentivo: **Sara, Yes, Ju, Sicilia, Tâmara, Stefania, Michele, Adriana, Sydney, Cris, Vitor** e tantos outros que diariamente contribuem e desejam ver a concretização deste sonho.

Nesses momentos temos a certeza de que só existimos porque fazemos parte de um todo. Sozinhos, não chegamos em lugar algum. Por esta razão, todos vocês têm uma parcela de vitória a compartilhar comigo.

*Muito obrigada!!!*

**Viver é ter a chance de acreditar que a cada dia podemos mais do que imaginamos... É buscar nas pequenas coisas um motivo para ser feliz. Deus na frente sempre.**

Autor desconhecido



## RESUMO

A pesquisa por ativos naturais incrementados em cosméticos para prevenção ao envelhecimento cutâneo e aos outros prejuízos provocados pelos danos oxidativos cresce, na medida em que se observam extratos vegetais e óleos essenciais com notável potencial farmacológico. *Morus nigra* L., conhecida como “amoreira preta”, é amplamente usada em todo o mundo pelo valor terapêutico de seus compostos fenólicos. O presente trabalho analisou o potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos vegetais das folhas de *M. nigra*, desenvolvendo formulações fitocosméticas com a incorporação de extratos de *M. nigra* em diferentes bases autoemulsionantes. Foram preparados extratos fluidos (MnEF) por maceração com solução hidroalcoólica em diferentes concentrações de etanol 99,9% PA de 50% a 90% (v/v). Após triagem fitoquímica foi escolhida a solução hidroalcoólica a 70%, obtendo-se também extrato etanólico bruto (MnEEB). Os extratos foram submetidos à dosagem de fenóis e flavonoides e análise por CLAE-DAD. A atividade antioxidante foi avaliada segundo os métodos ABTS, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e  $\beta$ -caroteno e a atividade fotoprotetora *in vitro* segundo método de Mansur. Posteriormente os extratos foram incorporados em quatro tipos de emulsões base do tipo O/A, totalizando 36 formulações, submetidas à avaliação da estabilidade preliminar. Foram analisadas características organolépticas e físico-químicas, além de atividade antimicrobiana e estabilidade microbiológica. MnEEB apresentou maior quantidade de compostos fenólicos ( $78,87 \pm 3,29$  mg EqAG/g), porém, MnEF apresentou teores totais de flavonoides ( $64,58 \pm 0,008$  mg EqC/g). MnEF apresentou melhor atividade antioxidante do que MnEEB. A análise por CLAE-DAD dos extratos vegetais identificou rutina e isoquercetina. Na avaliação do potencial fotoprotetor, observou-se absorvância máxima de 1,438 para o MnEF e de 1,351 para o MnEEB. FPS *in vitro* variou entre  $4,292 \pm 0,012$  (MnEF 80%) e  $11,17 \pm 0,065$  (MnEF 50%). Todas as formulações acrescidas de benzofenona apresentaram instabilidade, bem como as amostras com base não iônica. O fitocosmético antioxidante (MnEEB 20%) manteve estabilidade preservada, sem variações significativas no pH, viscosidade e espalhabilidade, esta última afetada apenas pela temperatura. Com relação à atividade antioxidante, as amostras apresentaram CE<sub>50</sub> inicial de 528,50  $\mu$ g/mL e ao final do estudo 618,31  $\mu$ g/mL em temperatura ambiente. Amostra armazenada em geladeira, ao final do estudo, apresentou queda considerável na ação antioxidante. Extrato bruto de *M. nigra* e formulações apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *S. aureus*, *S. aureus* MRSA e *S. choleraesuis*. O *Challenge Test* permitiu constatar a estabilidade microbiológica das formulações. O estudo confirmou a atividade antioxidante do extrato e a partir deste obteve-se formulação com atividade antioxidante, porém não houve incremento de potencial fotoprotetor nas formulações. Foi observada estabilidade das formulações à base de extratos vegetais de *M. nigra*, sendo importante para complementar o contexto do conjunto de outros estudos desenvolvidos em âmbito local com a espécie vegetal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Extratos Vegetais. Antioxidantes. Estabilidade de Cosméticos. Atividade Fotoprotetora. Fitoterapia.

## ABSTRACT

The search for enhanced natural assets in cosmetics to prevent skin aging and other damage caused by oxidative damage is increasing as plant extracts and essential oils with remarkable pharmacological potential are observed. *Morus nigra* L., known as “black mulberry”, is widely used worldwide for the therapeutic value of its phenolic compounds. This work analyzed the antioxidant and photoprotective potential of plant extracts from the leaves of *Morus nigra*, developing phytocosmetic formulations from the incorporation of *M. nigra* extracts in different self-emulsifying bases. Fluid extracts (MnFE) were prepared by maceration with hydroalcoholic solution at different concentrations of ethanol 99.9% PA of 50% to 90% (v/v). After phytochemical screening, the hydroalcoholic solution was chosen at 70%, obtaining crude ethanolic extract (MnCE). The extracts were submitted to the dosage of phenols and flavonoids and to the HPLC-DAD method. The antioxidant activity was evaluated according to the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) and  $\beta$ -carotene and the *in vitro* photoprotective activity according to Mansur’s method. Subsequently they were incorporated into four types of O/W type base emulsions, totaling 36 formulations, submitted to preliminary stability. Organoleptic and physical-chemical characteristics, as well as antimicrobial activity and microbiological stability were analyzed. MnCE presented higher amounts of phenolic compounds ( $78.87 \pm 3.29$  mg GAE/g), but MnFE presented total flavonoid contents ( $64.58 \pm 0.008$  mg CE/g). MnFE showed better antioxidant activity than MnCE. Analysis by HPLC-DAD of the plant extracts identified rutin and isoquercetin. In the evaluation of the potential photoprotector, were observed an maximum absorbance of 1.438 for MnFE and of 1.351 for MnCE. *In vitro* SPF ranged from  $4.292 \pm 0.012$  (MnFE 80%) and  $11,17 \pm 0,065$  (MnFE 50%). All added benzophenone formulations showed instability, as well as samples made from the nonionic base. Antioxidant phytocosmetic (MnCE 20%), presented stability preserved and did not observe significant variations in pH analysis, viscosity and spreadability, this one was affected by temperature. Concerning to the antioxidant activity, the samples presented an initial  $IC_{50}$  of 528.50  $\mu$ g/ml and at the end of the study 618.31  $\mu$ g/ml at room temperature. Sample stored in the refrigerator showed a considerable drop in antioxidant power. Crude extract of *M. nigra* and formulations presented antimicrobial activity against strains of *S. aureus*, *S. aureus* MRSA and *S. choleraesuis*. Challenge Test confirmed the microbiological stability of the formulations. The study confirmed the antioxidant activity of extracts, however there was no increase of photoprotective potential in the formulations. Stability of formulations based on *M. nigra* leaf extracts was observed, being important to complement the context of the set of other studies developed locally with this plant species.

**KEY WORDS:** Plant extracts. Antioxidants. Cosmetic Stability. Photoprotective Activity. Phytotherapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Instabilidades verificadas em emulsões .....	28
<b>Figura 2:</b> Fotos das folhas (1A e 1B) e fruto (1C) - espécie <i>Morus nigra</i> L. ....	29
<b>Figura 3:</b> Estrutura da pele. ....	35
<b>Figura 4:</b> Efeito de ressonância da molécula de fenol. ....	40
<b>Figura 5:</b> Aspecto da folha de <i>Morus nigra</i> L. (Moraceae) .....	45
<b>Figura 6:</b> Obtenção dos extratos vegetais a partir das folhas de <i>Morus nigra</i> .....	47
<b>Figura 7:</b> Desenvolvimento das emulsões-base .....	58
<b>Figura 8:</b> Desenvolvimento das formulações fitocosméticas .....	60
<b>Figura 9:</b> Ensaio de atividade antimicrobiana.....	65
<b>Figura 10:</b> Distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>M. nigra</i> .....	68
<b>Figura 11:</b> Espectro de UV do padrão analítico rutina e MnEF.....	75
<b>Figura 12:</b> Espectro de UV do padrão analítico isoquercetina e MnEF .....	75
<b>Figura 13:</b> Perfil Cromatográfico de MnEF em 340 nm.....	76
<b>Figura 14:</b> Perfil Cromatográfico de MnEEB em 340 nm .....	76
<b>Figura 15:</b> Estruturas químicas de compostos identificados em extratos de <i>M. nigra</i> .....	78
<b>Figura 16:</b> Espectros de absorção UV dos diferentes extratos fluidos hidroalcoólicos (MnEF).....	79
<b>Figura 17:</b> Espectros de absorção UV de MnEF 70% e MnEEB .....	80
<b>Figura 18:</b> FPS <i>in vitro</i> de extratos vegetais de <i>Morus nigra</i> .....	81
<b>Figura 19:</b> Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação – Lote A.....	83
<b>Figura 20:</b> Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação – Lote B.....	84
<b>Figura 21:</b> Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação – Lote C .....	85
<b>Figura 22:</b> Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação – Lote D .....	85

<b>Figura 23:</b> Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote A .....	86
<b>Figura 24:</b> Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote B .....	87
<b>Figura 25:</b> Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote C .....	87
<b>Figura 26:</b> Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote D .....	88
<b>Figura 27:</b> Valores de pH inicial e final - formulações Lotes A (a), B (b) e C (c) .....	93
<b>Figura 28:</b> Viscosidade inicial e final - formulações Lotes A (a), B (b) e C (c).....	95
<b>Figura 29:</b> Espalhabilidade das formulações Lotes A (a), B (b) e C (c) .....	97
<b>Figura 30:</b> Valores de FPS das formulações – Lote A .....	98
<b>Figura 31:</b> Valores de FPS das formulações – Lote B .....	99
<b>Figura 32:</b> Valores de FPS das formulações – Lote C .....	100
<b>Figura 33:</b> Valores de FPS das formulações – Lote D .....	101
<b>Figura 34:</b> Parâmetros organolépticos das formulações com atividade antioxidante em T <sub>0</sub> (base, FMn 10 % e FMn 20 %) .....	105
<b>Figura 35:</b> Valores de pH em função do tempo de fitocosméticos .....	106
<b>Figura 36:</b> Viscosidade inicial e final de fitocosméticos .....	107
<b>Figura 37:</b> Espalhabilidade de fitocosméticos em função do tempo e da temperatura .....	108
<b>Figura 38:</b> Atividade antioxidante de fitocosméticos em função do tempo e da temperatura .....	108
<b>Figura 39:</b> Atividade antioxidante CE <sub>50</sub> (µg/mL) de fitocosméticos em função do tempo e da temperatura .....	109
<b>Figura 40:</b> Teste de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima – MnEEB e formulações .....	110
<b>Figura 41:</b> <i>Challenge Test</i> – MnEEB e formulações .....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar as principais classes de metabólitos secundários .....	48
<b>Tabela 2:</b> Gradiente de eluição do método analítico por CLAE-DAD .....	50
<b>Tabela 3:</b> Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.....	54
<b>Tabela 4:</b> Composição das emulsões-base .....	56
<b>Tabela 5:</b> Composição das formulações fotoprotetoras .....	59
<b>Tabela 6:</b> Caracterização fitoquímica de extratos de <i>Morus nigra</i> .....	70
<b>Tabela 7:</b> Teores de fenólicos totais e flavonóides totais dos extratos das folhas de <i>Morus nigra</i> .....	71
<b>Tabela 8:</b> Atividade antioxidante de MnEF das folhas de <i>Morus nigra</i> segundo método de ABTS.....	72
<b>Tabela 9:</b> Atividade antioxidante dos extratos das folhas de <i>Morus nigra</i> segundo método DPPH e $\beta$ -caroteno .....	73
<b>Tabela 10:</b> Valores de quantificação dos marcadores analíticos rutina e isoquercetina em extratos vegetais de <i>Morus nigra</i> .....	77
<b>Tabela 11:</b> Parâmetros Organolépticos das formulações fotoquímicas em T <sub>12</sub> .....	89
<b>Tabela 12:</b> Estabilidade preliminar e atividade fotoprotetora das formulações fitocosméticas .....	103
<b>Tabela 13:</b> Atividade antimicrobiana de de MnEEB e formulações .....	111
<b>Tabela 14:</b> Teste de desafio do sistema conservante - contagem de carga microbiana em placas aeróbias - período: 28 dias .....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DO	Densidade óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EB1	Emulsão-base 1
EB2	Emulsão-base 2
EB3	Emulsão-base 3
EB4	Emulsão-base 4
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FPS	Fator de proteção solar
<i>M. nigra</i>	<i>Morus nigra</i>

MnEF	Extrato fluido hidroalcoólico de <i>Morus nigra</i>
MnEEB	Extrato etanólico bruto de <i>Morus nigra</i>
NEU	Revelador 2-amil difenilborinato
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RUV	Radiação ultravioleta
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
1.1 OBJETIVOS .....	23
1.1.1 Objetivo geral .....	23
1.1.2 Objetivos específicos .....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2.1 FITOCOSMÉTICOS E ESTABILIDADE DE COSMÉTICOS .....	25
2.2 <i>Morus nigra</i> L.: ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE SEUS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	28
2.3 A PELE E A NECESSIDADE DE FOTOPROTEÇÃO .....	34
2.4 AGENTES ANTIOXIDANTES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
3.1 LOCAL DA PESQUISA E LABORATÓRIOS PARCEIROS .....	44
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL .....	44
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS: EXTRATO FLUIDO HIDROALCOÓLICO (MnEF) E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (MnEEB) .....	46
3.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR .....	47
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS .....	48
3.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS .....	49
3.7 ANÁLISE POR CLAE-DAD .....	50
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	51
3.8.1 Método do sequestro do radical DPPH .....	51
3.8.2 Teste da auto-oxidação do $\beta$ -caroteno .....	51
3.8.3 Método ABTS .....	52
3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA <i>in vitro</i> .....	53



3.9.1 Determinação do comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) e absorbância máxima ( $A_{\max}$ ) dos extratos vegetais de <i>Morus nigra</i> .....	53
3.9.2 Determinação do fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i> .....	53
3.10 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	55
3.10.1 Emulsões-base .....	55
3.10.2 Desenvolvimento das formulações fitocosméticas à base de extratos vegetais de <i>M. nigra</i> .....	58
3.11 ESTUDOS DE ESTABILIDADE .....	61
3.11.1 Parâmetros analisados .....	61
3.11.2 Estudo de estabilidade preliminar .....	62
3.11.3 Ensaio de estabilidade acelerada .....	63
3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES .....	64
3.12.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM e Concentração Bactericida Mínima – CBM. ....	64
3.12.2 Teste de desafio da eficácia do sistema conservante ( <i>Challenge Test</i> ) ..	65
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	68
4.1.1 Caracterização do pó de <i>Morus nigra</i> .....	68
4.2 EXTRATOS VEGETAIS DE <i>Morus nigra</i> : MnEF E MnEEB.....	69
4.2.1 Análise fitoquímica preliminar .....	69
4.2.2 Determinação de fenóis e flavonoides totais.....	71
4.2.3 Atividade antioxidante dos extratos vegetais .....	71
4.2.4 Análise dos extratos por CLAE-DAD.....	74
4.2.5 Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i> .....	79
4.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FITOCOSMÉTICAS CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS DE <i>M. nigra</i> .....	82

4.3.1 Estabilidade preliminar.....	82
4.4 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE .....	105
4.4.1 Parâmetros organolépticos .....	105
4.4.2 Estabilidade acelerada de fitocosmético. ....	106
4.4.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM e Concentração Bactericida Mínima – CBM. ....	110
4.4.4 Teste de Desafio do Sistema Conservante ( <i>Challenge Test</i> ).....	112
5 CONCLUSÃO .....	116
REFERÊNCIAS .....	118
Anexos.....	134

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

A procura crescente pelos fitocosméticos fez aumentar o interesse na pesquisa de ativos naturais incrementados em produtos tópicos tradicionais. Diversos metabólitos secundários presentes em compostos vegetais se apresentam com capacidade de restabelecer a homogeneidade da pele, estimulando a renovação celular e a síntese de elastina e colágeno, sendo agentes anti-envelhecimento promissores (DZIALO et al., 2016).

Atuando em sinergismo com os componentes da formulação, os extratos de plantas, com sua composição complexa, podem promover ações benéficas diversas à pele e ao organismo, sendo uma alternativa para proteção da pele e prevenção aos danos oxidativos provocados pela exposição solar e envelhecimento cutâneo (ALMEIDA CINCOTTO, 2016).

A exposição solar excessiva e desprotegida está entre os problemas de saúde que mais preocupam os sistemas de saúde na atualidade, sendo uma questão global, pois está diretamente envolvida com o câncer de pele, que é o mais frequente no Brasil (INCA, 2017), além de danos oculares, queimaduras, envelhecimento precoce dentre outros prejuízos à saúde. O sol é uma fonte de amplo espectro de radiações com características eletromagnéticas variadas conforme o intervalo de comprimento de onda ( $\lambda$ ), podendo ser: radiação ultravioleta (RUV) (100 - 400 nm), visível (400 - 780 nm) e infravermelho (> 780 nm). A RUV é subdividida, tradicionalmente, em: UVC (100 - 290 nm), UVB (290 - 320 nm) e UVA (320 - 400 nm) (BALOGH et al., 2011).

Exercendo papel importante na defesa contra a exposição solar, os compostos fenólicos, abundantes em plantas e alimentos, têm sido objeto de estudo por suas atividades farmacológicas e nutricionais, tendo importância vital para a planta. Na natureza se apresentam em flores, vegetais e frutas na forma de pigmentos coloridos, e dentre suas funções, destacam-se filtros naturais de amplo espectro de ondas ultravioleta (UV) (UVA, UVB e UVC), além da capacidade antioxidante (BABY et al., 2008; STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014).

Estruturalmente, os polifenóis podem apresentar um ou mais grupos hidroxílicos e anéis aromáticos, em forma livre ou glicosilada. O efeito de ressonância dos elétrons demonstra como a deslocalização em torno do sistema aromático confere aos substituintes da molécula de fenol um maior poder para estabilizar os radicais livres produzidos, minimizando assim seus danos (HAJJ et al., 2012). O papel dos agentes antioxidantes foi amplamente discutido na redução dos prejuízos decorrentes da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo (GRAGNANI et al., 2014).

Bioativos ricos em polifenóis e vitaminas C e E, por exemplo, surgem como aliados para incrementar o potencial antioxidante de formulações, por serem capazes de interagir com os radicais livres, atuando como desativadoras de espécies reativas, sobretudo de oxigênio (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Extratos vegetais com potencial antioxidante também são objeto de estudo de pesquisas por novos ativos em fotoproteção, sendo associados a filtros UV orgânicos e inorgânicos, considerando os benefícios demonstrados para a pele. Tais substâncias atuam ampliando a proteção UV dos filtros tradicionais, prevenindo o câncer e o envelhecimento da pele, melhorando assim sua condição (MERCURIO, et al., 2015).

Enquanto os filtros UV protegem a pele contra os efeitos deletérios da exposição à radiação, as vitaminas possuem propriedades hidratante, antioxidante e antienvhecimento, já os extratos vegetais são ricos em compostos fenólicos que possuem atividades de eliminação de ERO. Dentre as propriedades bioativas dos extratos de plantas, além da proteção UV e hidratação da pele, destacam-se a restauração da função de barreira e promoção da síntese de colágeno (MERCURIO et al., 2015). Desta forma, considera-se o uso de antioxidantes naturais associado aos fotoprotetores tradicionais como uma estratégia importante para melhorar sua eficácia e para estabilização dos compostos fotoinstáveis, gerados pela exposição à RUV (DEUSCHLE et al., 2015).

Reconhecida pelo elevado teor de compostos fenólicos, a espécie *Morus nigra*, conhecida como “amoreira preta”, “amoreira negra” e “amora miúra”, é popularmente usada como ação laxativa, sedativa, expectorante, refrescante, emoliente, calmante, diurética, hipoglicemiante, antisséptica, anti-inflamatória,

antioxidante, emética, tônico, anti-helmíntica, bem como no tratamento de eczema e inflamações orais (ANVISA, 2015a). Amplamente distribuída em todo o mundo, pertence ao gênero *Morus*, que integra a família Moraceae, uma das famílias mais abundantes em florestas tropicais (PADILHA et al., 2010a). Seu uso se deve em grande parte à elevada presença de metabólitos importantes, a exemplo de flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenoides e esteroides (QUEIROZ et al., 2012).

Observando tal importância, estudos passaram a ser desenvolvidos para avaliar algumas atividades biológicas da planta, estabelecendo associação com o teor de metabólitos secundários. As atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antinociceptiva (NADERI et al., 2004; PADILHA, 2009; PADILHA et al., 2010b; SOUZA et al., 2018), atividade anti-hiperglicêmica (KIM et al., 2003), melhora no sistema imunológico e no metabolismo hormonal (PIEKARSKI, 2013), além da baixa toxicidade pré-clínica do decocto (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013) foram analisadas em estudos *in vitro* e em modelos animais, utilizando, sobretudo a folha da planta.

Para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos, é fundamental considerar inicialmente o estudo da estabilidade preliminar, a fim de orientar seu desenvolvimento e fornecer subsídios para o aperfeiçoamento. Os estudos de estabilidade permitem conhecer o comportamento das formulações sob condições diversas, a exemplo de temperatura, vibração e umidade, podendo assim garantir a qualidade e segurança no uso do cosmético (BRASIL, 2012).

Percebendo que os compostos fenólicos estão associados com atividade antioxidante e fotoprotetora em grande variedade de plantas, a presente pesquisa se propõe a analisar o potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos vegetais de folhas de *M. nigra* e desenvolver fitocosméticos como uma alternativa cosmética para agregar valor aos produtos tradicionais.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Analisar o potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos vegetais das folhas de *Morus nigra* e desenvolver formulações fitocosméticas usando diferentes bases autoemulsionantes.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extratos vegetais a partir das folhas da espécie *M. nigra*;
- Investigar aspectos químicos dos extratos vegetais por meio de triagem fitoquímica e da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);
- Avaliar atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* de extratos vegetais de *M. nigra*;
- Desenvolver formulações fitocosméticas a partir da incorporação de extratos vegetais de *M. nigra* em diferentes bases autoemulsionantes;
- Realizar estudos de estabilidade preliminar e compatibilidade nas formulações fitocosméticas produzidas;
- Analisar o fator de proteção solar (FPS) e atividade antioxidante das formulações fitocosméticas;
- Realizar estudos de estabilidade acelerada, incluindo avaliação/manutenção da atividade antioxidante *in vitro* e estabilidade microbiológica das formulações;
- Investigar a atividade antimicrobiana do extrato vegetal e formulações.

*Revisão de  
literatura*

---



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FITOCOSMÉTICOS E ESTABILIDADE DE COSMÉTICOS

Fitocosméticos são cosméticos que apresentam em sua composição ativos naturais na forma de extrato ou óleo essencial, de origem vegetal, com atividade definida (CEFALI, 2009; ISAAC et al., 2008). Desde os primórdios, as civilizações usavam cosméticos e espécies vegetais para os cuidados com o corpo. Exemplo conhecido, no Egito antigo eram comuns banhos e rituais que utilizavam óleos vegetais e ervas aromáticas (JAZDZEWSKI et al., 2000).

Os cosméticos, por sua vez são definidos como preparações compostas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, para limpeza, perfumar, alterar sua aparência e ou correção de odores corporais e ou proteção. Eles são classificados segundo grau de risco segundo ainda segundo RDC Nº 07, de 2015 (ANVISA, 2015b), em grau 1 e grau 2 que aborda, ainda os requisitos técnicos, de rotulagem e procedimento eletrônico para regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Dentre as formas farmacêuticas para os cosméticos e fitocosméticos, destaca-se a emulsão em razão de seu aspecto visual, sensação agradável ao toque e facilidade de aplicação (CASTRO, 2014). As emulsões são formadas a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis em duas fases: uma fase aquosa e uma oleosa. Denomina-se a fase dispersa como fase interna e o meio dispersante de fase externa, sendo, portanto as emulsões óleo em água (O/A) as que têm a fase interna oleosa e a fase externa aquosa, já as emulsões água em óleo (A/O) possuem a fase interna aquosa e a fase externa oleosa (LEONARDI, 2008; SILVA; SILVA, 2009).

A mistura íntima dessas duas fases para a produção da emulsão ocorre na forma de pequenas gotas, sendo que tal mistura é termodinamicamente desfavorável e só ocorre em razão da presença do tensoativo, que reduz a tensão superficial entre os líquidos (GENNARO, 2004).

Os tensoativos sintéticos são os mais utilizados e se subdividem, de acordo com seu tipo iônico, em aniônicos, não iônicos, catiônicos e anfóteros, sendo os dois primeiros mais representativos. Os tensoativos aniônicos têm baixo custo e uso difundido, representados pelos sabões e compostos sulfonados e sulfatados, são incompatíveis com ácidos e cátions polivalentes, mas tornam-se mais efetivos quando usados em conjunto com um tensoativo não iônico. Já os tensoativos não iônicos apresentam menor toxicidade, em geral são mais compatíveis com outros constituintes da formulação e são representados pelos ésteres de glicol e de glicerol, ésteres de sorbitano, polissorbatos, ésteres de álcoois graxos, ésteres de ácidos graxos e poliglicóis (GENNARO, 2004).

É fato reconhecido que a estabilidade é o ponto crítico da emulsão. A estabilidade considera que a amostra deve manter, em determinada embalagem e durante seu tempo de uso, as mesmas características e propriedades que apresentava no momento em que foi formulada inicialmente (D'LEON, 2001). A estabilidade das emulsões pode ser avaliada por uma série de testes que observam parâmetros como viscosidade, características organolépticas, manutenção do pH, homogeneidade e integridade dos princípios ativos (CASTELLI et al., 2008).

Tais ensaios são denominados de estudos de estabilidade e contribuem para orientar o desenvolvimento da formulação e indicar o material de acondicionamento mais adequado, fornecendo subsídios para o aperfeiçoamento do produto. Da mesma forma são importantes para estimar o prazo de validade de produtos e garantir a segurança do cosmético mediante seu monitoramento (BRASIL, 2004).

Conforme Brasil (2004) apresenta, diversos fatores podem influenciar a estabilidade das formulações. Dentre os fatores extrínsecos ao produto é possível destacar:

- Tempo: o envelhecimento do produto pode causar alterações nas suas características;
- Temperatura: quando elevadas aceleram reações físico-químicas e químicas e quando baixas aceleram possíveis alterações físicas como turvação, precipitação e cristalização;

- Luz e oxigênio: geram radicais livres e reações de óxido-redução, devendo-se, portanto, atentar para forma de acondicionamento do produto;
- Umidade: provoca alterações no aspecto físico do produto e favorece a contaminação microbiológica;
- Material de acondicionamento;
- Microrganismos: sendo mais suscetíveis à contaminação formulações que apresentam água, como emulsões, géis, suspensões ou soluções;
- Vibração: pode provocar separação de fases, compactação ou alterar a viscosidade das formulações.

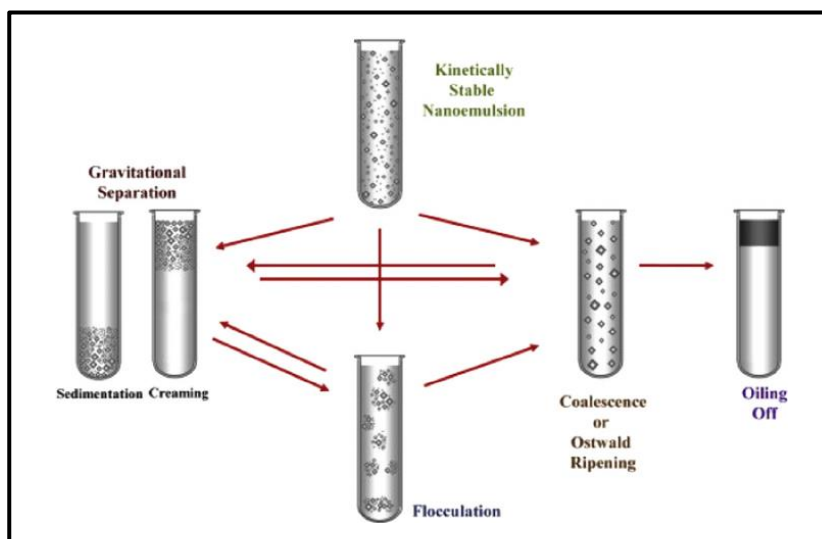
Ainda neste contexto, os fatores intrínsecos estão relacionados à própria natureza das formulações e, sobretudo à interação de seus ingredientes entre si ou com o material de acondicionamento. Destacam-se como sendo de ordem de incompatibilidade física ou incompatibilidade química, esta última envolve pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise e interação entre os ingredientes da formulação e entre estes e o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

Os aspectos considerados na avaliação da estabilidade de formulações cosméticas são:

- Físicos: envolvem propriedades físicas originais como aspecto, cor, odor, uniformidade, dentre outras;
- Químicos: mantidos dentro dos limites especificados a integridade da estrutura química, o teor de ingredientes e outros parâmetros;
- Microbiológicos: conservadas as características microbiológicas, conforme os requisitos especificados e utilizando sistemas conservantes adequados, além das Boas Práticas de Fabricação.

As instabilidades podem acontecer em emulsões, uma vez que, segundo a lei da termodinâmica, os sistemas tendem a reestabelecerem seus estados iniciais de energia mínima, havendo assim a tendência natural de diminuição da área de contato interfacial nas emulsões. Dentre as instabilidades verificadas, destacam-se a separação de fases, floculação, coalescência, cremagem, sedimentação e

maturação de Ostwald (Figura 1) (WALSTRA; VAN VLIET, 2010; BOUYER et al., 2012; HERZI et al., 2014).



**Figura 1:** Instabilidades verificadas em emulsões. Fonte: HUA TAN; ABDULLAH; NOLASCO-HIPOLITO, 2015.

## 2.2 *Morus nigra* L.: ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE SEUS COMPOSTOS FENÓLICOS

A família Moraceae compreende 38 gêneros e mais de 1.000 espécies. O grupo está mais bem representado em florestas tropicais pluviais de baixa altitude na região Neotropical e, geralmente, está entre os três primeiros em diversidade e abundância na região amazônica. Nos neotrópicos, a família é representada por cerca de 278 espécies distribuídas em 19 gêneros, 14 dos quais endêmicos da região. Dentre os principais gêneros, destacam-se os seguintes: *Morus*, *Maclura*, *Artocarpus*, *Ficus* e *Broussonetia*, sobretudo em razão de importância econômica na alimentação, cultivo de bicho da seda e produção de papel e de móveis (ZHEKUN; GILBERT, 2003).

O gênero *Morus* reúne uma gama de espécies vegetais de 16 espécies comumente conhecidas como “amoras” e dentre as mais conhecidas estão a *Morus alba* (amora branca), *Morus rubra* (amora vermelha) e *Morus nigra* (amora negra). (ERCISLI ORHAN, 2007; NAIK et al., 2015; THABTI et al., 2011). Estudos indicam alta variabilidade genética entre as espécies, mesmo dentro de uma mesma região (OZRENK et al., 2010). Considerando diferenças moleculares entre as principais

espécies, *Morus nigra* e *Morus rubra* mostram diferenças da *Morus alba*, sendo a menor variação morfológica de *Morus nigra* (KAFKAS et al., 2008).

Conhecida popularmente como “amora”, “amoreira”, “amoreira preta” e “amora miúra”, *Morus nigra* (Figura 2) se apresenta como uma das espécies mais importantes do gênero *Morus* e foi trazida para a região do Vale do São Francisco por imigrantes japoneses, sendo plenamente adaptada no Brasil. A espécie apresenta crescimento rápido e sob diferentes condições climáticas (PADILHA, 2009), tendo como origem o extremo oriente, sendo que sua frutificação é verificada de maneira mais intensa e abundante na Ásia Menor (PADILHA et al., 2010a).



**Figura 2:** Fotos das folhas (1A e 1B) e fruto (1C) - espécie *Morus nigra* L. Fonte: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (ANVISA, 2015a).

O uso mais comum para a planta na medicina popular tem relação com as folhas. Estas apresentam o limbo simples, de coloração verde escuro na face ventral

e verde claro na face dorsal, atingem em média 16 x 8 cm. A margem da folha apresenta-se serrilhada, com base arredondada e ápice acuminado. Os frutos são comestíveis, de sabor agridoce, sumosos e refrescantes (PADILHA et al., 2010a).

Avaliando o potencial de diversas espécies vegetais da Caatinga, o Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), vem desenvolvendo diversos estudos com a *M. nigra*. Dentre estes, o potencial hipoglicemiante do extrato etanólico bruto das folhas da espécie foi avaliado em ratos normoglicêmicos, não sendo observado o efeito esperado, porém a baixa toxicidade do extrato ficou constatada no ensaio de toxicidade aguda, com a ausência de sinais de mortalidade e toxicidade no modelo animal utilizado (ALMEIDA et al., 2011).

Posteriormente, a atividade acaricida do extrato etanólico bruto e das frações das folhas de *Morus nigra* foi avaliada no carrapato *Rhipicephalus microplus*. A análise por HPLC revelou a presença de compostos fenólicos (isoquercetina, rutina, kaempferol-3-O-ramnosídeo). A fração clorofórmica das folhas de *M. nigra* (25mg/mL) apresentou o melhor resultado, com 62,6% de inibição da oviposição, 39,3% da eclosão dos ovos e 65,4% de eficácia. Os resultados demonstraram que o extrato de *M. nigra* têm efeito acaricida sobre fêmeas de *R. microplus* (DANTAS et al., 2017).

Outra pesquisa analisou o potencial hipoglicemiante, hipolipidêmico e antioxidante do extrato etanólico de folhas de *Morus nigra* em modelos animais, observando-se redução da glicemia de jejum e pós-prandial, melhora de tolerância oral à glicose e redução da lipólise e proteólise em ratos diabéticos. Também foi verificada redução dos níveis sanguíneos de colesterol total, de triglicerídeos e de VLDL e o aumento do nível de HDL. A análise cromatográfica identificou a presença dos flavonóides rutina, isoquercetina e kaempferitrina. O tratamento com extrato de *M. nigra* reduziu o malondialdeído (biomarcador de oxidação lipídica) e aumentou níveis de glutathiona no fígado de ratos diabéticos, porém não teve efeito em animais de controle (JÚNIOR et al., 2017).

Cavalcante e colaboradores (2017) analisaram o efeito do extrato das folhas de *Morus nigra* durante o transporte na sobrevivência e apoptose de folículos pré-antrais *in vitro*, com pares de ovários de ovinos. Foram utilizados meio essencial

mínimo (MEM) ou extrato de *M. nigra*, armazenados a 4°C por 6, 12 ou 24 h, sendo que o extrato de *M. nigra* [0,05 mg/mL] preservou o tecido ovariano ovino a 4°C por até 6 h. A análise por HPLC no extrato confirmou a presença de compostos antioxidantes (rutina, isoquercetina e kaempferitrina).

O grupo também desenvolveu e validou método analítico para identificar e quantificar compostos fenólicos no extrato etanólico bruto (Mn-EtOH) e sua fase de acetato de etila (Mn-AcOEt) obtidos de folhas de *M. nigra* usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método indicou a presença de rutina e isoquercetina nos extratos vegetais, sendo possível assim garantir a continuação dos estudos envolvendo extratos obtidos a partir da espécie vegetal. Os parâmetros estabelecidos permitiram analisar a influência de diferentes métodos de extração no conteúdo dos compostos de interesse e sua correlação com o potencial efeito farmacológico dos mesmos (SAMPAIO et al., 2018a).

O potencial inovador da *Morus nigra* foi investigado por Sampaio e colaboradores (2018b) a partir da busca por patentes depositadas nos bancos de dados European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI). Os resultados demonstraram elevada quantidade de publicações envolvendo o termo “*Morus nigra*”, com predominância para o World Intellectual Property Organization, porém combinando os descritores “*Morus nigra* and medicament” o número caiu consideravelmente. Assim, foi observado que a *M. nigra* apresenta potencial inovador considerando-se as atividades farmacológicas atribuídas à espécie e as patentes até o momento depositadas no WIPO, EPO e INPI.

Souza e colaboradores (2018) realizaram estudo para avaliar as atividades antibacteriana, citotóxica e antioxidante de extratos de *Morus nigra*. Como resultados, os extratos mostraram atividade antioxidante importante e atividade contra a maioria dos microrganismos testados e também não mostraram nenhum efeito antiproliferativo expressivo, não apresentando, portanto, citotoxicidade em nenhuma das condições testadas.

Pela primeira vez, foi avaliado o efeito do extrato de folhas de *M. nigra*, com ou sem suplementação, como meio de cultura para folículos pré-antrais de ovinos. Foram analisados efeitos sobre a morfologia, ativação e dano ao DNA de folículos

pré-antrais em ovários de ovinos e observou-se que o meio de controle mostrou mais folículos histologicamente normais do que todas as concentrações de *M. nigra*, na ausência ou presença de suplementos, porém os folículos cultivados com extrato de *M. nigra* a 0,1 mg/mL estavam em boas condições e capazes de continuar seu desenvolvimento, com taxas de dano ao DNA e ativação folicular iguais ao meio de controle. Assim, mesmo considerando perda folicular após a cultura, o estudo sugere que os folículos restantes cultivados com extrato de *M. nigra* a 0,1 mg/mL estavam em boas condições e capaz de retomar seu desenvolvimento. Somado ao fato de maior custo do meio de cultura suplementado (cerca de 40 vezes mais caro), recomenda-se o uso do extrato vegetal na concentração testada (GOUVEIA et al. 2019).

Outro estudo publicado recentemente por pesquisadores do grupo avaliou os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do extrato etanólico de *Morus nigra* (Mn-EtOH) em lesões de pata induzidas pelo veneno de *Bothrops jararacuçu* (BjcuV) em camundongos. Foi realizado estudo fitoquímico, com o isolamento e caracterização de três compostos usando LC-MS e RMN (1D e 2D), seguidos da validação dos seus espectros com os dados disponível na literatura. Foram avaliados os flavonóides rutina e quercetina (marcadores químicos de *M. nigra*), Mn-EtOH, Mn-EtOH encapsulado em fibras eletrofiadas e partículas de Eudragit L100 (FB / Mn-EtOH) e Mn-EtOH encapsulado em micropartículas de Eudragit L100 (MP / Mn-EtOH), no teste de edema de pata induzido por BjcuV. Foram isolados  $\beta$ -sitosterol, quercetina-3-O-glucopiranosídeo e kaempferol-3-O-glucopiranosídeo. Todos os compostos testados reduziram o edema local induzido por BjcuV. O Mn-EtOH também evitou o edema provocado pela serotonina e bradicinina e reduziu o edema de pata e infiltração leucocitária peritoneal induzida por carragenina, e diminuiu ainda a hipernocicepção mecânica de BjcuV. O Mn-EtOH exerceu efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, possivelmente pela inibição de migração de leucócitos e modulação das ações de serotonina e bradicinina (RIBEIRO et al., 2019).

Considerando ainda outras publicações relevantes sobre a espécie, Souza e colaboradores (2000) analisaram raízes de *Morus nigra* e identificaram a morusina, um prenilflavonoide que foi testado para atividade antinociceptiva. Outros polifenóis foram identificados por Wang, Gong e Chen (2009) a partir do caule da planta:



mornigrol E e mornigrol F, já o ácido betulínico, o  $\beta$ -sitosterol e o germanicol foram isolados a partir das folhas da planta (PADILHA et al., 2010a).

Do extrato das folhas da espécie foram identificados ácido vanílico e ácido clorogênico e no modelo animal concluíram que o extrato protegeu todas as bandas de DNA contra os efeitos de UV e do peróxido de hidrogênio. O estudo observou ainda que houve melhora nas disfunções de aprendizagem, aumento da retenção de memória, sendo a *M. nigra* importante para amenizar os danos causados pelo envelhecimento, em parte devido ao seu poder de eliminação de radicais livres e alta capacidade antioxidante (TURGUT et al., 2016).

O uso de extratos vegetais da espécie em preparações cosméticas foi testado com extrato hidroalcoólico de frutos de *Morus alba* incorporado em cosmético, sendo observada redução nos teores de melanina da pele. Tal atividade foi atribuída à presença de compostos fenólicos no extrato, sugerindo atividade de inibição da tirosinase e ação *antiaging* (AKHTAR et al., 2012; RASUL; AKHTAR, 2011).

Naderi et al. (2004) analisaram o efeito antioxidante de três extratos diferentes de frutos de *Morus nigra* e observaram que o extrato apresentou ação protetora contra o dano peroxidativo às biomembranas e biomoléculas. Pesquisa desenvolvida por Radojkovic et al. (2016) analisou a extração com fluido supercrítico e por maceração de folhas de *M. alba* e *M. nigra* e identificou ácido palmítico, ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido linoleico, além de ácido cafeico e derivados, rutina e quercetina.

Notadamente, a rutina e a quercetina foram identificadas em diversos estudos com a espécie vegetal. Sabe-se que a prevalência de flavonoides no reino vegetal tem aplicabilidade relativa em inúmeras funções atribuídas a essa classe: proteção contra raios ultravioleta e visível; ação antioxidante; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, por inibir enzimas e precursores de substâncias tóxicas ou atuando como quelantes de metais nocivos; atração de animais para polinização; na ação de hormônios vegetais de crescimento e na expressão de genes (SMITH; BANKS, 1986).

A ação da quercetina para regular os níveis de glicose e lipídeos no sangue, além de melhorar a função das ilhotas pancreáticas foi observada em estudos que apontaram o flavonoide como provável candidato a fármaco para o tratamento do

diabetes tipo II (ZHANG et al., 2016). Medicamentos e suplementos alimentares à base de quercetina e em associação com ácido ascórbico e rutina já estão disponíveis para uso (CARVALHO, 2014).

Pesquisa com isoquercetina observou que houve inibição da replicação dos vírus influenza do tipo A e B em baixas concentrações e sua ação foi similar à amantadina, com relação à redução da replicação viral *in vitro*. O estudo concluiu que a isoquercetina pode ser agente terapêutico para o tratamento da gripe e para a supressão da resistência em terapia de combinação com drogas existentes (KIM; NARAYANAN; CHANG, 2010).

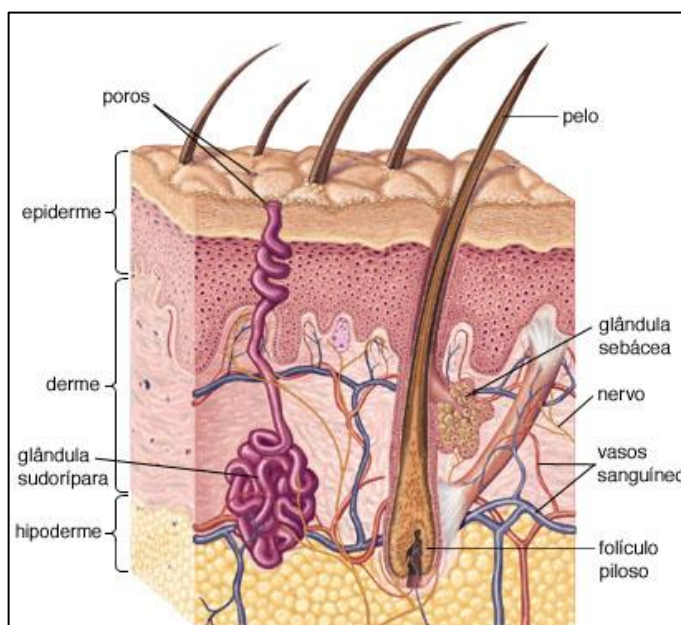
A rutina, também conhecida por rutosídeo e quercetina 3-O- $\beta$ -rutinosídeo, já foi utilizada na prevenção e tratamento da insuficiência venosa ou linfática e na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta, em razão de seu poder antioxidante (LANDIM, 2012). Dentre outras aplicações farmacológicas para a rutina, são descritos na literatura efeitos sobre o sistema nervoso central com atividade anticonvulsivante (NIEOCZYM et al., 2014), efeito neuroprotetor em isquemia cerebral (KHAN et al., 2009) e efeito antidepressivo de rutina com aumento da disponibilidade de serotonina e de noradrenalina na fenda sináptica (MACHADO et al., 2008).

Em razão do largo espectro de ação farmacológica, a rutina passou a ser objeto constante de pesquisas, como também sua associação com outros medicamentos é cada vez mais frequente na indústria farmacêutica, sobretudo em classes de fármacos com ação antioxidante e vasoprotetora (PEDRIALI, 2005).

### 2.3 A PELE E A NECESSIDADE DE FOTOPROTEÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como função primordial a proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos, constituindo-se como barreira entre o meio interno e externo. Além de defesa contra microrganismos patogênicos e radiações, a pele apresenta funções de controle da temperatura, sensorial, estética, absorção da RUV, síntese da vitamina D, absorção e eliminação de substâncias químicas (RIBEIRO, 2010; RASCHE, 2014).

O pH da pele não é neutro, situando-se em torno de 4,5 e 6,0, conforme a região do corpo e idade do indivíduo, exercendo portanto ação bactericida e fungicida (RASCHE, 2014). A pele apresenta duas camadas básicas: a epiderme e a derme, já a hipoderme situa-se logo abaixo, composta por tecido adiposo (Figura 3). Sua espessura varia dependendo da área do corpo, sendo mais espessa em regiões sujeitas a atritos constantes e pressões (RIBEIRO, 2010).



**Figura 3:** Estrutura da pele. Fonte: Encyclopædia Britannica, 2010.

A epiderme é a camada mais externa, formada por uma complexa estrutura de camadas - basal, espinhosa, granulosa e córnea e não possui circulação sanguínea e linfática (RIBEIRO, 2010; RASCHE, 2014). A derme é um tecido elástico e resistente que permite resistência física ao corpo contra agressões mecânicas e abriga os vasos sanguíneos e linfáticos, os apêndices cutâneos, células conjuntivas e sanguíneas que fornecem nutrientes à epiderme (Figura 3) (RIBEIRO, 2010).

Já a hipoderme é a camada mais profunda da pele. Altamente vascularizada, tem como funções armazenar energia, participar do isolamento térmico, absorver impactos, modelar o corpo e manter os órgãos em seus devidos lugares preenchendo espaços internos com os adipócitos, as células de gordura (RASCHE, 2014).

Dentre as inúmeras agressões sofridas pela pele diariamente, a exposição crônica à RUV está entre os fatores ambientais responsáveis por trazer mais prejuízos à saúde humana, sendo fator irritante frequente para as células da pele. A RUV ao atingir a pele desprotegida desencadeia processos complexos envolvendo reações químicas e morfológicas, com a produção de ERO, alterações histoquímicas diversas, espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermoepidérmica. Os danos ao DNA e ao material genético das células acontecem em razão da absorção da radiação podendo resultar em alterações malignas nas células (BALOGH, 2011). Outras alterações incluem oxidação dos lipídios, ativação de componentes do sistema imune cutâneo, quebra da comunicação celular, modificação da expressão dos genes em resposta ao estresse e enfraquecimento da resposta imune da pele (DZIALO et al., 2016).

A energia solar compreende ondas eletromagnéticas em comprimentos de ondas diferentes variando entre 290 até 3.000 nm, estando inclusas a radiação UV, subdividida ainda nos feixes UVC (200 a 290 nm), UVB (290 a 320 nm) e UVA (320 a 400 nm); a radiação visível (VIS), de 400 a 700 nm e a radiação infravermelha (IV), subdividida nos feixes IVA (760 a 1440 nm) e IVB (1440 a 3000 nm) (SCHALKA et al., 2014; AKHALAYA et al., 2014).

A camada de ozônio absorve totalmente a radiação UVC, que não chega à superfície da Terra. Já a radiação UVB é absorvida em cerca de 90%, enquanto que a radiação UVA chega em quase totalidade à superfície terrestre. Assim, a destruição gradativa da camada de ozônio preocupa e determina que a fotoproteção deve ser um aspecto cada vez mais discutido para o desenvolvimento de medidas eficazes de proteção e prevenção (LIU et al., 2012; SCHALKA et al., 2014).

A radiação UVA prejudica o funcionamento dos fibroblastos, tornando-os menos ativos, acarretando o aparecimento de rugas, enquanto que o dano causado pela radiação UVB tem relação com efeitos diretos no DNA e indução de expressão de metaloprotease de matriz (LUCAS et al., 2015).

As agressões provocadas pelo sol à pele não se limitam às queimaduras solares, cujas manifestações são rubor, edema, formação de bolha. As agressões à pele são na verdade cumulativas e irreversíveis, e podem levar a alterações nas fibras de colágeno, elastina e até a fotocarcinogênese (PURIM; LEITE, 2010).

A exposição solar crônica está associada principalmente ao câncer de pele espinocelular. Já as exposições durante a infância, com história de uma ou mais queimaduras solares, têm relação com os carcinomas basocelulares e melanomas (INCA, 2016). É significativamente preocupante a taxa de crescimentos dos casos de câncer de pele no Brasil e no mundo, sendo o melanoma, o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular os tipos mais frequentes da doença. Para 2018, o INCA estimou que os novos casos de câncer de pele não melanoma no Brasil estariam na marca de 165.580 casos e para o câncer de pele melanoma, 6.260 casos (INCA, 2017).

Os dados refletem a sobrecarga do sistema de saúde e os graves prejuízos à qualidade de vida dos indivíduos e grupos populacionais. Assim, vislumbra-se a importância em difundir, disponibilizar e conscientizar a população sobre os meios de prevenção deste grupo de doenças.

Neste sentido, cuidados adequados de prevenção e minimização de exposição humana aos raios UV são fundamentais, sendo recomendadas restrição da exposição solar, uso de fotoprotetores tópicos e orais, além da fotoproteção mecânica, que inclui roupas com tecidos especiais e acessórios como óculos e chapéus e vidros especiais. A esse conjunto de medidas denomina-se fotoproteção e estas são direcionadas para prevenção ao dano agudo e crônico decorrente da exposição solar (ARAÚJO; SOUZA, 2008; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012; SCHALKA et al., 2014). A proteção da pele envolve ainda atualmente o uso compostos antioxidantes - consumidos ou depositados na pele (BRENNER; HEARING, 2008; GODIC et al., 2014; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

Os protetores solares estão entre as medidas mais conhecidas para reduzir a exposição solar e prevenir danos causados pelo sol. De acordo com Urbach (2001), os primeiros protetores solares tópicos foram formulados na década de 1930. O pioneiro foi o francês Eugene Schueller que preparou uma formulação contendo salicilato de benzila e um veículo oleoso. Assim foram sendo testados os filtros à base de dióxido de titânio, petrolato, esculina e salicilato de metila. Observou-se o aumento gradativo nas pesquisas envolvendo os danos causados pela radiação solar e filtros UV, com destaque para os estudos com a Benzofenona em 1962.

Denomina-se filtro solar a substância capaz de proteger a pele da exposição ao sol, por meio da redução da quantidade de RUV que atinge a pele por absorção, refração e/ou reflexão desta radiação. O grau de proteção, ou seja, o FPS dos fotoprotetores é variável e determina o tempo necessário para provocar eritema na pele protegida, relacionando especificamente ao raio UVB (SILVA et al., 2009).

Os fotoprotetores tópicos podem ser compostos por vários filtros UV, incluindo filtros inorgânicos e orgânicos. Os filtros inorgânicos refletem e dispersam as radiações UV por meio de uma barreira opaca sobre a pele, são exemplos: óxido de zinco, dióxido de titânio, óxido de ferro, petrolato veterinário vermelho, talco, calamina e caolim. Eles apresentam relativa estabilidade, não reagem com filtros orgânicos e tendem a ser mais seguros clinicamente, porém pela sua transferência para roupas pode levar ao comprometimento de sua eficácia (BALOGH, 2011).

Ainda segundo Balogh (2011), os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos capazes de absorver radiação UV e transformá-la em radiações energéticas inofensivas ao ser humano, podem ser hidro ou lipossolúveis. Os protetores solares passaram a ser incorporados em produtos cosméticos diversos, sendo que a capacidade do protetor solar para bloquear os raios UVB é a mais importante para a prevenção de efeitos negativos da exposição solar (EBRAHIMZADEH et al., 2014).

Na pesquisa de novos ativos em fotoproteção temos ainda combinações cosméticas contendo filtros UV, antioxidantes e extratos naturais. Avalia-se que a luz ultravioleta induz o acúmulo de flavonoides e outros fenólicos absorventes desta radiação no tecido dérmico do corpo da planta, sugerindo função de proteção à luz. Em razão de tais propriedades, tem havido um crescente interesse no uso de antioxidantes em protetores solares para otimizar a fotoproteção (EBRAHIMZADEH et al., 2014).

As substâncias naturais foram consideradas como potenciais recursos de proteção solar devido à sua absorção na região UV e sua atividade antioxidante (COCKELL; KNOWLAND, 1999; BONINA et al., 1996). Radice et al. (2016) destacam que estudos desenvolvidos com aplicação tópica ou ingestão de determinados compostos fenólicos naturais demonstraram respostas importantes contra a radiação UV. Algumas das espécies estudadas foram *Theobroma cacao* L.

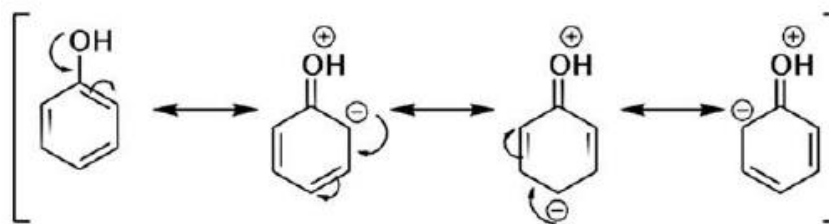
(WILLIAMS; TAMBURIC; LALLY, 2009), *Vitis vinífera* L. (FIUME et al., 2014), *Camelia sinensis* L. (KOMES et al., 2010), *Silybum marianum* (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013), *Bauhinia microstachya* var. *Massambabensis* Vaz (MANSUR et al., 2016).

Apesar da determinação da atividade antioxidante dos extratos vegetais estar bem documentada, a avaliação da capacidade de proteção solar geralmente está limitada às características do espectro UV e à concentração de compostos absorventes de UV (COCKELL; KNOWLAND, 1999).

## 2.4 AGENTES ANTIOXIDANTES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes referem-se às substâncias com capacidade de diminuir ou bloquear as reações de oxidação induzidas pelos radicais livres, podendo agir no bloqueio da propagação desses radicais na cadeia ou na hidrólise enzimática do éster, desfazendo a peroxidação lipídica de ácidos graxos, capturas de íons metálicos de transição ou ainda através da catálise enzimática na redução de peróxidos (SCOTTI; VELASCO, 2003). A aplicação tópica de tais agentes antioxidantes visa o fortalecimento das defesas na pele.

Os compostos fenólicos de plantas são amplamente reconhecidos por suas propriedades antioxidantes. Sua estrutura aromática (Figura 4) é a característica responsável pela prevenção da formação e eliminação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ALMEIDA et al., 2015b), podendo assim agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais.



**Figura 4:** Efeito de ressonância da molécula de fenol. Fonte: HAJJ et al., 2012.

Considerando que a indústria farmacêutica vem oferecendo cada vez mais espaço aos produtos naturais, reconhecendo a importância destes na busca de novos ativos a partir da observação do uso popular ou na valorização da própria fitoterapia por parte da medicina tradicional. Neste sentido, o uso de extratos de plantas, chás ou mesmo produtos medicinais acabados, já descritos em muitas farmacopeias (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006), demonstra o crescente interesse por incluir tais ativos em preparações cosméticas.

Como exposto anteriormente, a exposição da pele a agentes exógenos químicos e físicos, dentre estes a RUV e agentes biológicos, além de outros agentes endógenos, levam à produção de espécies reativas, a exemplo de “radicais hidroxila (HO<sup>•</sup>) e superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radicais peróxil e alcóxil (RO<sub>2</sub><sup>•</sup> e RO<sup>•</sup>), oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peróxidos orgânicos (ROOH) e radical óxido nítrico (•NO)” (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; SCOTTI et al., 2007).

O feixe UVA é absorvido pelos cromóforos da pele, tais como melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos como a tirosina e o triptofano, tornando-os instáveis e, retornando ao estado fundamental, liberam energia na forma de elétron para a molécula de O<sub>2</sub>, iniciando a cascata oxidativa (LIN et al., 2005; BALOGH et al., 2011).

O desequilíbrio redox e o estresse oxidativo ocorrem quando a capacidade antioxidante de remoção ou reparação é inferior ao potencial dos pró-oxidantes. Como consequência tem-se alterações na estrutura das proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além de processos patológicos que incluem doenças inflamatórias, neurodegenerativas, cardiovasculares e neoplasias (BESSADA, 2015).



Para minimizar os danos ocasionados pela RUV, o organismo apresenta defesas naturais, os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (vitaminas, minerais, cofator e polifenóis) (FRANÇA et al., 2013).

Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Os antioxidantes não enzimáticos, incluem-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente. Entre as substâncias endógenas podemos destacar alguns hormônios, como estradiol e estrógeno, e a melatonina, bem como a melanina, um pigmento formado pela oxidação e polimerização da tirosina, com papel protetor contra RUV. Destaca-se ainda o ácido lipóico (SCHALKA et al., 2014). Porém, quase sempre essas proteções naturais não são eficazes contra os malefícios causados pelas radiações solares.

Considerando os inúmeros métodos que avaliam a atividade antioxidante, tem-se a metodologia do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), uma técnica simples e de custo reduzido para extratos vegetais e frações isoladas. O DPPH é um radical estável de intensa cor roxa com absorção em comprimento de onda em torno de 517 nm, mas ao ser colocado em meio a uma solução antioxidante, é, então, estabilizado, tendo sua coloração modificada para amarela e sua absorbância, reduzida (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009; ALVES et al., 2010).

Outro método utilizado para avaliar o potencial antioxidante dos extratos e frações, é o teste de inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno, o qual forma um agente redutor biológico que age reduzindo os produtos de oxidação a menores graus de oxigênio, pois em tecidos biológicos em baixos níveis de oxigênio, há ação antioxidante dos carotenoides. Neste ensaio, utiliza-se ácido linoleico e  $\beta$ -caroteno. O ácido em presença de oxigênio forma um radical peroxil que reage com o  $\beta$ -caroteno fazendo-o deixar de ser amarelo escuro e passar a amarelo claro. Porém, se for adicionado um extrato ou molécula com atividade antioxidante, ocorre a estabilização do peroxil e ele não conseguirá modificar a cor do  $\beta$ -caroteno (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ALVES et al., 2010).

Já o método do radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) está baseado na capacidade dos antioxidantes em capturar o radical livre.

Tal sequestro reduz a absorvência da solução, o que leva a uma redução da intensidade da cor da solução do ABTS (RUFINO et al., 2007). A solução azul esverdeada do ABTS com persulfato de potássio tem absorção máxima em 645, 734 e 815 nm, porém, ao adicionar o extrato com as propriedades antioxidantes, ocorre a redução e conseqüente perda de cor do meio. Baseado no estudo do Trolox®, padrão utilizado que passa pelas mesmas condições, calcula-se então a inibição do ABTS realizada pelos extratos vegetais (SUCUPIRA et al., 2012).

Observamos que a pele é alvo de inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, que, dentre tantos danos provocados, induzem à formação de radicais livres e ERO que por sua vez provocam desequilíbrios diversos. Sendo que a pele apresenta um aparato de proteção natural contra tais agressões que incluem a ativação de sistemas de antioxidantes existentes no próprio corpo, além do espessamento da camada córnea, produção do ácido urocânico, pigmentação e mecanismos de reparação do DNA (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

O papel dos agentes antioxidantes foi amplamente discutido na redução dos danos decorrentes da produção de ERO no organismo (GRAGNANI et al., 2014), portanto os estudos envolvendo tais mecanismos e a sua inclusão em novos produtos são fundamentais.

# *Material e métodos*

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DA PESQUISA E LABORATÓRIOS PARCEIROS

O estudo foi desenvolvido na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), no Laboratório de Bioquímica em articulação permanente com o Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais (NEPLAME / UNIVASF). Outros espaços também foram utilizados conforme a necessidade, sendo fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa, dentre eles:

- Laboratório de Farmacotécnica (LABTEC – UNIVASF);
- Laboratório de Química Orgânica – UNIVASF;
- Laboratório de Microbiologia – UNIVASF;
- Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA – UNIVASF).

#### 3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas de *Morus nigra* (Figura 5) foi realizada no município de Petrolina-PE, sob as coordenadas geográficas 9°23'23.8"S 40°29'45.0"W, nos meses de maio de 2017 e em novembro de 2018. A identificação botânica da espécie foi realizada por comparação com a exsicata da planta nº 1764, que se encontra depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Todos os procedimentos de acesso ao patrimônio genético e conhecimentos tradicionais associados foram realizados e o projeto foi registrado no SisGen (Cadastro # AC34CFC).



**Figura 5:** Aspecto da folha de *Morus nigra* L. (Moraceae). Fonte: Re flora, 2017.

Após a coleta, o material botânico foi seco em estufa com circulação de ar a 45 °C, durante 5 dias. Ao final deste período, o material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas para a obtenção do pó vegetal, que foi submetido à maceração.

Foi realizada a determinação da granulometria do pó, para qual foram utilizados tamises com abertura com malha de 150, 250, 425, 600 e 850 µm. Para o ensaio, 25 g de amostras foram colocados sobre o receptor de tamises, durante 15 min, com vibração 4. As amostras retidas na superfície de cada malha foram retiradas utilizando um pincel e pesadas ao término do tempo (BRASIL, 2010). O percentual retido em cada tamis foi calculado, utilizando a equação:

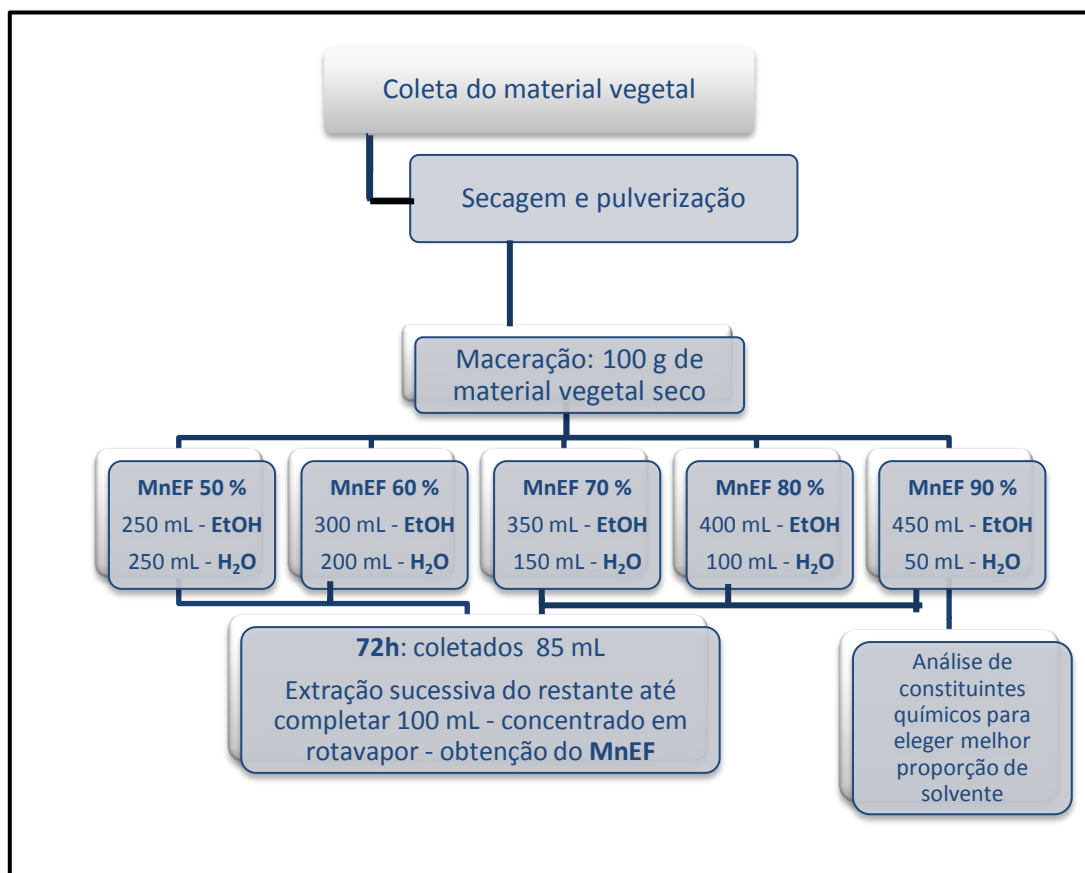
$$\text{(Eq. 1): } (\%) \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \cdot 100$$

Onde: P1 = massa da amostra retida em cada tamis (em gramas); P2 = Soma das massas retidas em cada tamis e no coletor (em gramas).

### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS: EXTRATO FLUIDO HIDROALCOÓLICO (MnEF) E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (MnEEB)

A partir do pó das folhas de *M. nigra* foram preparados dois extratos vegetais hidroalcoólicos: extrato fluido (MnEF) e extrato bruto (MnEEB). Para a obtenção do extrato fluido hidroalcoólico, 100 g do material vegetal seco e pulverizado foram submetidos à maceração em 500 mL de solução hidroalcoólica em diferentes proporções de etanol PA (50, 60, 70, 80 e 90% (v/v)) com o intuito de realizar análise do perfil de fenóis e flavonoides obtidos nos extratos em diferentes proporções e eleger a proporção ideal de solventes para extração dos compostos de interesse e obtenção do extrato bruto. Após 72 h, os primeiros 85 mL foram coletados e armazenados em recipiente âmbar, sob refrigeração (4 °C), enquanto que o restante do material foi extraído e concentrado em rotaevaporador, à temperatura máxima de 60 °C. Foram realizadas extrações sucessivas com as mesmas proporções de solvente, novamente filtradas e concentradas até o volume de 15 mL, adicionados aos 85 mL iniciais, obtendo-se ao final do processo 100 mL de extrato fluido (Figura 6).

Para a obtenção do extrato bruto (MnEEB), após a seleção da melhor proporção de solução extrativa, foi realizado o mesmo procedimento para extração, mediante maceração e trocas após 72 h, sendo que a solução final, após ser concentrada em evaporador rotativo, foi colocada em estufa com circulação de ar para a evaporação completa do solvente, em que, a partir de 100 g do pó seco, foram obtidos 16,6 g do MnEEB (16,6% de rendimento em relação ao peso seco da planta).



**Figura 6:** Obtenção dos extratos vegetais a partir das folhas de *Morus nigra*.  
 Legenda: MnEF: extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; EtOH: etanol PA; H<sub>2</sub>O: água. Fonte: autoria própria.

### 3.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A triagem fitoquímica qualitativa buscou avaliar por meio de métodos cromatográficos descritos por Wagner & Bladt (1996) apresentados na Tabela 1, procurando-se evidenciar as principais classes de metabólitos secundários, a exemplo de cumarinas, flavonoides, taninos, antraquinonas, lignanas e naftoquinonas, com destaque aos compostos fenólicos.

**Tabela 1:** Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar as principais classes de metabólitos secundários.

<b>Classe química</b>	<b>Sistema eluente</b>	<b>Padrão</b>	<b>Revelador</b>
Flavonoides	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100: 11: 11: 26)	Rutina Quercetina	NEU
Cumarinas	Tolueno: éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10 %)	Escopoletina	KOH etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100: 13,5: 10)	Aloína	KOH etanólico 10%
Lignananas	Clorofórmio: metanol: água (70: 30: 4)	Extrato de linhaça	Vanilina fosfórica
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99: 1)	Biflorina Lapachol	KOH etanólico 10%
Taninos condensados	Acetato de etila: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (100:11:11:26)	Catequina Epicatequina	Vanilina clorídrica
Taninos hidrolisáveis	n-Butanol: acetona: tampão fosfato (40:50:10)	Ácido gálico Ácido tânico	Sulfato de ferro amoniacoal (1%)
Triterpenos e esteróides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lupeol Sitosterol	Lieberman- Burchard

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt, 1996.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu segundo Singleton e Rossi (1965) com modificações. Os resultados foram plotados



em um gráfico que correlaciona a absorvância da amostra com sua concentração, sendo o teor de compostos fenólicos totais dos extratos expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g), por meio da curva de calibração do ácido gálico ( $R^2 = 0,9975$ ), obtida em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L.

Inicialmente os extratos vegetais foram solubilizados em etanol absoluto P.A. destes, foi aliquotado 40  $\mu$ L, aos quais foram adicionados 3,16 mL de água destilada e em seguida 200  $\mu$ L do reagente de Folin – Ciocalteau, homogeneizados logo em seguida. Após 6 min foi incorporado 600  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A leitura foi realizada em espectrofotômetro após 2 h de incubação a 20 °C em 765 nm. O branco foi preparado com todos os reagentes, substituindo a amostra por água destilada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para determinação do teor de flavonoides totais, foi utilizado o método colorimétrico por complexação metálica descrito por Dewanto et al. (2002), no qual 300  $\mu$ L iniciais dos extratos de *M. nigra* ou da solução padrão de (+)-quercetina foram adicionados a 1,5 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 90  $\mu$ L de uma solução de  $\text{NaNO}_2$ . Após 6 min de reação, 180  $\mu$ L de uma solução de  $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  10 % foram adicionados à mistura. Após 5 min de reação, 600  $\mu$ L de uma solução de  $\text{NaOH}$  1M foram adicionados à mistura anterior. Finalmente, completou-se o volume com 330  $\mu$ L de água destilada e o sistema foi homogeneizado por completo. A absorvância foi mensurada contra o branco em 510 nm, em espectrofotômetro, imediatamente após a obtenção da mistura final, em comparação com soluções padrões contendo (+)-quercetina em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg EqC/g) por meio de comparação com a curva padrão da quercetina ( $R^2 = 0,9775$ ). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.7 ANÁLISE POR CLAE-DAD

Foi utilizado cromatógrafo líquido modelo Shimadzu (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution 1.0 (Shimadzu, Japan). Como fase estacionária utilizada foi uma coluna C-18 Thermos Scientific Hypersil 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m. Como fase móvel foram utilizadas duas soluções: solução A - ácido trifluoracético (TFA) em água 0,01% (v/v) e solução B: acetonitrila (ACN), obedecendo ao gradiente descrito na Tabela 2. A temperatura foi mantida constante em 30 °C, o volume de injeção foi de 10  $\mu$ L para o extrato fluido hidroalcoólico (1 mg/mL), extrato etanólico bruto (1 mg/mL) e para as soluções dos padrões (200  $\mu$ g/mL), sob fluxo de 0,8 mL/min. Antes de serem analisadas as soluções foram filtradas por uma membrana filtrante de 0,22  $\mu$ m (Chromafil Xtra, EUA). As análises foram feitas no comprimento de onda de 340 nm (SAMPAIO, 2017).

**Tabela 2:** Gradiente de eluição do método analítico por CLAE-DAD.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solução de ácido trifluoracético 0,01 % (v/v) (%)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>
0-40	100-60	0-40
40-50	60	40
50-60	60-100	40-0

Fonte: SAMPAIO, 2017.

Foram analisadas 17 substâncias químicas de referência analítica (Sigma Aldrich): ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatecuico, ácido tânico, apigenina, catequina, miricetina, naringenina, quercetina, quercetina-3- $\beta$ -glicosídeo, resveratrol, rutina, cirsiolol, harmana e vitexina. Para identificar a presença desses compostos na amostra foram comparados o tempo de retenção e espectro de UV ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) das substâncias padrão com os picos presentes no cromatograma das amostras.

## 3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 3.8.1 Método do sequestro do radical DPPH

A capacidade de sequestro do radical livre foi medida utilizando o ensaio do DPPH (MENSOR et al., 2001). Soluções dos extratos foram preparadas a 0,5% e a 1% (v/v) do MnEF e a [1 mg/mL] do MnEEB, além dos padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT) e diluídas até concentrações finais de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 µg/mL em etanol. A solução de DPPH foi preparada em etanol na concentração de 50 µg/mL. Foi adicionado 1 mL dessa solução a 2,5 mL das soluções das amostras e padrões nas diferentes concentrações testadas, e deixou-se reagir por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os valores de absorvância foram medidos em 518 nm e convertidas em percentual de atividade antioxidante (% AA), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{(Eq. 2): } (\% \text{ AA}) = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde:  $A_{\text{controle}}$  indica a absorvância do controle e  $A_{\text{amostra}}$  indica a absorvância da amostra. Soluções de etanol (1,0 mL) com as amostras em estudo (2,5 mL) foram utilizadas como branco. A solução de DPPH (1,0 mL) com etanol (2,5 mL) foi usada como o controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em  $CE_{50}$ , onde os valores foram calculados por regressão não linear.

### 3.8.2 Teste da auto-oxidação do $\beta$ -caroteno

O princípio do método é a perda da cor amarela do  $\beta$ -caroteno devido à sua reação com radicais formados pela oxidação do ácido linoleico em uma emulsão, sendo que antioxidantes podem retardar a reação (WANNES et al., 2010). Para o teste, 2 mg de  $\beta$ -caroteno foram solubilizados em 10 mL de clorofórmio e a 2 mL

desta solução, foram adicionados 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado sob vácuo a 40 °C e 100 mL de água destilada foram adicionados, agitando-se vigorosamente por 2 min. Padrões foram usados como controle (ácido ascórbico, BHA e BHT) e os extratos foram preparados em etanol. A emulsão (3,0 mL) foi adicionada a um tubo contendo 0,12 mL de soluções a 1 mg/mL de compostos de referência e extratos *M. nigra*. A absorbância foi verificada em 470 nm e a emulsão teste foi incubada em banho-maria a 50 °C por 120 min e novamente verificada a absorbância. Os extratos foram substituídos por etanol no controle negativo. A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de antioxidante atividade (%) e avaliada como taxa de branqueamento do  $\beta$ -caroteno usando a fórmula:

$$\text{(Eq. 3): \% AA} = [1 - (A_0 - A) / (A_0^0 - A_t^0)] \times 100$$

Onde:  $A_0$  é a absorbância inicial e  $A_t$  é a absorbância final medido para a amostra de teste;  $A_0^0$  é a absorbância inicial e  $A_t^0$  é a absorbância final medida para o controle negativo (branco). Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.8.3 Método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS<sup>+</sup> [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi feita conforme a metodologia descrita por Rufino e colaboradores (2007). O radical ABTS<sup>+</sup> foi formado pela reação de 5 mL da solução ABTS<sup>+</sup> 7 mM com 88  $\mu$ L da solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C e na ausência de luz, durante 12 h.

Posteriormente foi preparada a solução do radical ABTS, também na ausência da luz, diluindo-se 1 mL do radical em 70 mL de etanol ou até a obtenção do valor de absorbância de  $0,700 \pm 0,020$  em 734 nm. Novamente os extratos foram diluídos em concentrações de 0,5% e 1%, dos quais foi retirado 300  $\mu$ L e colocados em cubetas aos quais foram adicionados 2,7 mL da solução do radical ABTS, sendo levadas ao ultrassom por 6 min, ainda no escuro. Para o branco, a solução do

radical ABTS foi substituída por etanol e para o controle negativo, a amostra foi substituída por etanol. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA *in vitro*

#### 3.9.1 Determinação do comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) e absorbância máxima ( $A_{\max}$ ) dos extratos vegetais de *Morus nigra*

Para determinar o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) e absorbância máxima ( $A_{\max}$ ) dos extratos, foram preparadas soluções em álcool etílico absoluto PA, sendo o extrato fluido hidroalcoólico (MnEF) a 0,25% e extrato etanólico bruto (MnEEB) a 50,0 mg/L e/ou 100 mg/L m/v e realizada varredura em espectrofotômetro (Model Nova® 1600 UV) entre os comprimentos de onda de 240 a 400 nm, com intervalos de 5 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1,0 cm caminho óptico. O álcool etílico absoluto PA foi utilizado como branco e o experimento realizado em triplicata.

#### 3.9.2 Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*

Para a determinação do FPS dos extratos vegetais foi utilizado o método *in vitro* espectrofotométrico desenvolvido por Mansur e colaboradores (1986). As soluções para leitura no espectrofotômetro (Model Nova® 1600 UV) foram preparadas a partir da solubilização dos extratos em etanol absoluto PA, na concentração final de 0,2 mg/mL (MnEEB) e a 0,5% e 1% (MnEF), e submetidos à leitura para a determinação das absorbâncias nas faixas de comprimento de onda entre 290 e 320 nm, com intervalos de 5 nm. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. O álcool etílico absoluto foi utilizado como branco e o experimento realizado em triplicata (VIOLANTE et al., 2009). Após a varredura, as absorbâncias obtidas foram

adicionadas na Equação 4 proposta por Mansur e colaboradores (1986) que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação.

$$(Eq. 4): \quad FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot i(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde: FPS = fator de proteção solar; FC = fator de correção (=10); EE ( $\lambda$ ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ ); i ( $\lambda$ ) = a intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ) e Abs ( $\lambda$ ) = a absorvância da formulação no comprimento de onda ( $\lambda$ ).

O efeito eritematogênico presente na equação acima pode ser definido como primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 h após a exposição à radiação ultravioleta (BRASIL, 2012). A intensidade desse efeito depende do tempo de exposição, do comprimento de onda da radiação e da intensidade da luz incidente. A Tabela 3 mostra a relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.

**Tabela 3:** Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda

$\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ )
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fonte: Mansur et al., 1986.

### 3.10 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

#### 3.10.1 Emulsões-base

Previamente, foi realizado o estudo dos componentes das formulações propostas no trabalho. Assim, foram considerados estudos científicos publicados sobre a toxicidade de extratos vegetais de folhas de *Morus nigra*, bem como os marcos regulatórios que incidem sobre a concentração e os componentes das formulações cosméticas no Brasil, considerando apenas os produtos aprovados para uso nas concentrações recomendadas, considerando os instrumentos normativos RDC nº 69/2016, RDC nº 29/2012 e RDC nº 30/2012 (ANVISA, 2016; ANVISA, 2012a; ANVISA, 2012b; BRASIL, 2004).

No mesmo sentido, o estudo de Oliveira Junior e colaboradores (2013), que avaliou propriedades fotoprotetoras de formulações cosméticas contendo extrato hidroalcoólico de *N. variegata* (Nv-HA) e obteve fitocosméticos com atividade e estabilidade mediante ciclos de gelo/degelo, foi o ponto de partida para o desenho da composição da emulsão-base 1 e formulações fitocosméticas do lote A. Tomando este como ponto de partida, foram sendo feitas alterações considerando o comportamento e respostas das amostras nos testes de estabilidade.

Partindo deste princípio, foram desenvolvidas duas emulsões aniônicas diferentes, uma emulsão não iônica e foi utilizada uma emulsão aniônica comercial para efeito comparativo. A tabela 4 (página 55) apresenta a composição qualitativa das emulsões-base.

Tabela 4: Composição das emulsões-base.

Composição das emulsões-base						
Componente	Função	Emulsão	Emulsão	Emulsão	Emulsão	
Nomenclatura INCI		base 1	base 2 (EB2)	base 3	base 4	
		(EB1) %	%	(EB3) %	(EB4) %	
			(Vitabase®)			
Fase Oleosa	Base	Emulsionante	Cetearyl alcohol (and) sodium lauryl sulfate 6%	Cetearyl alcohol (and) sodium cetearyl sulfate	Cetearyl alcohol (and) sodium cetearyl sulfate 12%	Cetearyl alcohol 5%; cetareth - 20 3%; cetyl alcohol 4%
	Propylparaben	Conservante	0,05%	--	0,10%	0,10%
	Oleato de Isodecila	Emoliente	5%	--	--	--
	Isopropyl Myristate	Emoliente	--	--	6%	6%
	Phenoxyethanol®	Conservante	--	NI	--	--
	Ethylhexyl Palmitate	Emoliente	--	NI	--	--
	BHT	Antioxidante	0,05%	NI	0,05%	0,05%
	Methylparaben	Conservante	0,15%	--	0,20%	0,20%
	Imidazolidinyl Ureia	Conservante	--	NI	0,30%	0,30%
	Methysothizolinone®	Conservante	--	NI	--	--
Fase Aquosa	Glycerin	Umectante	5%	--	6%	6%
	Propylene Glycol	Umectante	3%	NI	4%	4%
	Disodium EDTA	Agente quelante	0,05%	NI	0,05%	0,05%
	Aqua	Veículo	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

(Continua)

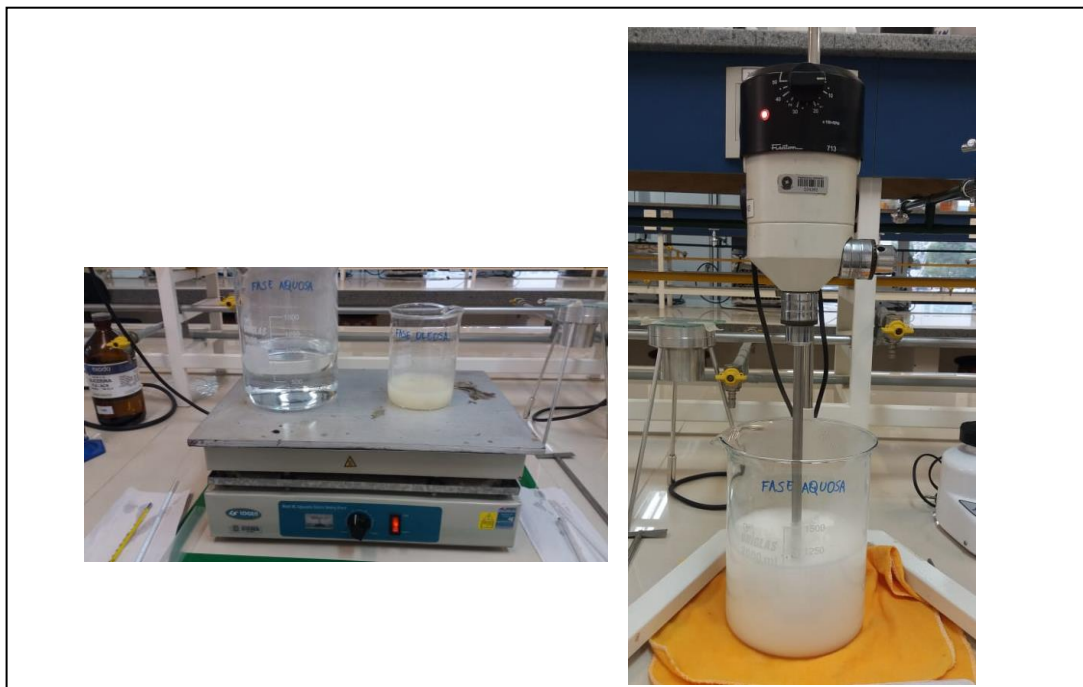


(Continuação)

Fase Complementar	Cyclomethicone	Emoliente	1%	--	2%	2%
	(and) Dimethicone					
	Crosspolymer					
	Cyclopentasiloxane	Emoliente	--	NI	3%	3%
	Cyclopentasiloxane	Emoliente	--	--	2%	2%
	Dimethiconol					
	Mineral oil	Emoliente	--	NI	--	--
	Phenyl Trimethicone	Emoliente	1%	--	--	--

Legenda: INCI: nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos; NI: quantidade não informada; q.s.p.; quantidade suficiente; (-): ausência do componente na formulação. Fonte: autoria própria.

A emulsão de partida foi a EB1 (Lote A) e após o teste com a emulsão comercial EB2 (Lote B), chegou-se à composição EB3 (Lote C). Por fim, foi desenvolvida a emulsão não iônica EB4 (Lote D). Foram mantidas apenas as proporções dos agentes antioxidantes, sendo as proporções dos demais constituintes ajustadas conforme observação do comportamento da formulação ao longo dos testes. As emulsões EB1, EB3 e EB4 foram preparadas segundo o processo de emulsificação (Figura 7) no qual as fases oleosa e aquosa foram aquecidas separadamente a 75 °C e 80 °C, sendo a fase aquosa vertida de maneira lenta e com agitação constante sobre a fase oleosa. Após a formação da emulsão, foi reduzida a velocidade de agitação, iniciando o resfriamento do sistema até a temperatura de 40 °C, quando foi adicionada a fase complementar composta de silicones. A mistura permaneceu sob agitação lenta até atingir a temperatura ambiente. Após 24 h de maturação, as bases foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar, analisando pH, resistência à centrifugação e viscosidade, sendo então incorporados os extratos vegetais e filtros UV.



**Figura 7:** Desenvolvimento das emulsões-base. Fonte: autoria própria.

### **3.10.2 Desenvolvimento das formulações fitocosméticas à base de extratos vegetais de *M. nigra***

A partir das emulsões-base, após 24 h de estabilização foram desenvolvidas 36 formulações (Tabela 5), incorporadas com filtros orgânicos (octilmetoxicinamato e benzofenona-3), que foram suspensos em propilenoglicol, além de filtros inorgânicos (óxido de zinco e dióxido de titânio) e os extratos vegetais, sendo que às formulações dos lotes A e B foram incorporados extrato fluido hidroalcoólico 70% (MnEF 70%) enquanto que às formulações dos lotes C e D foram incorporados extrato etanólico bruto (MnEEB) solubilizado previamente em propilenoglicol (Figura 8, página 59). As formulações foram preparadas a fim de serem selecionadas aquelas com melhor estabilidade macroscópica, a partir da análise das características organolépticas.

Tabela 5: Composição das formulações fotoprotetoras

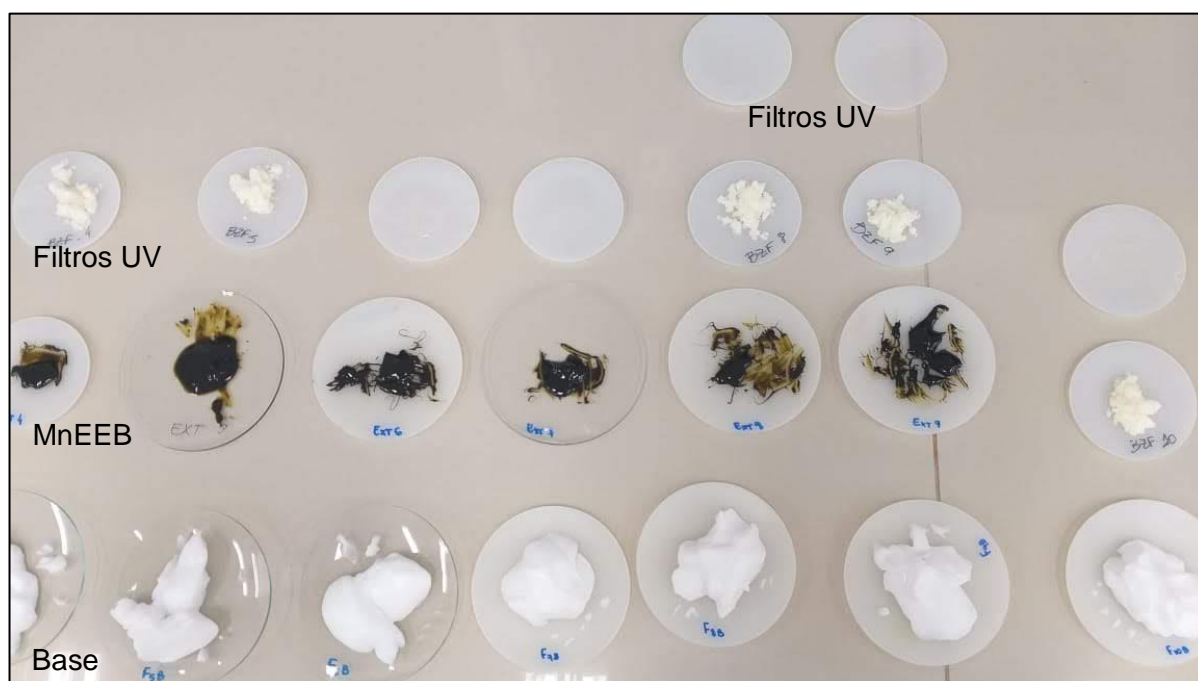
Lote	Formulação	Filtros UV	Extrato <i>M. nigra</i>	Base
1	A1	-	-	EB1
2	A2	-	MnEF 5%	EB1
3	A3	-	MnEF 10%	EB1
4	A4	BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%	-	EB1
5	A5	BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%	MnEF 5%	EB1
6	A6	BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%	MnEF 10%	EB1
7	B1	-	-	EB2
8	B2	-	MnEF 5%	EB2
9	B3	-	MnEF 10%	EB2
10	B4	BZF 7%	MnEF 5%	EB2
11	B5	BZF 5%	MnEF 10%	EB2
12	B6	OCM 5%	MnEF 5%	EB2
13	B7	OCM 5%	MnEF 10%	EB2
14	B8	OCM 5%; BZF 5%	MnEF 5%	EB2
15	B9	OCM 5%; BZF 5%	MnEF 10%	EB2
16	B10	OCM 5%; BZF 5%	-	EB2
17	B11	BZF 7%	-	EB2
18	B12	OCM 5%	-	EB2
19	C1	-	-	EB3
20	C2	-	MnEEB 5%	EB3
21	C3	-	MnEEB 10%	EB3
22	C4	BZF 7%	MnEEB 5%	EB3
23	C5	BZF 5%	MnEEB 10%	EB3
24	C6	OCM 5%	MnEEB 5%	EB3
25	C7	OCM 5%	MnEEB 10%	EB3
26	C8	OCM 5%; BZF 5%	MnEEB 5%	EB3
27	C9	OCM 5%; BZF 5%	MnEEB 10%	EB3

(Continua)

(Continuação)

28	C10	OCM 5%; BZF 5%	-	EB3
29	C11	BZF 7%	-	EB3
30	C12	OCM 5%	-	EB3
31	D1	-	-	EB4
32	D2	-	MnEEB 5%	EB4
33	D3	-	MnEEB 10%	EB4
34	D4	OCM 5%	MnEEB 5%	EB4
35	D5	OCM 5%	MnEEB 10%	EB4
36	D6	OCM 5%	-	EB4

Legenda: BZF: Benzofenona; OCM: Octilmetoxicinamato; OX ZN: Óxido de Zinco; DIOX TIT: Dióxido de Titânio; MnEF: Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB: Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB1: Emulsão-base 1; EB2: Emulsão-base 2; EB3: Emulsão-base 3; EB4: Emulsão-base 4. Fonte: autoria própria.



**Figura 8:** Desenvolvimento das formulações fitocosméticas. Fonte: autoria própria.

### 3.11 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

#### 3.11.1 Parâmetros analisados

Os estudos de estabilidade das formulações compreendem a estabilidade preliminar, estabilidade acelerada e estabilidade microbiológica, sendo analisados parâmetros organolépticos, físico-químicos e microbiológicos.

Inicialmente observou-se visualmente as amostras. Para tanto, uma alíquota de cada amostra foi colocada em vidro de relógio, sobre um fundo bege e foram verificadas modificações macroscópicas em relação ao padrão estabelecido. Dentro dos parâmetros organolépticos das formulações foram analisadas as seguintes características:

- **ASPECTO:** descrito como fluido, viscoso, homogêneo ou heterogêneo. A amostra foi classificada como normal, sem alteração, levemente modificado (início de alterações como separação de fases, cremagem ou floculação), modificado (alterações mais evidentes de separação de fases, cremagem ou floculação) ou intensamente modificado (alterações completas da formulação como separação total de fases intensa precipitação, cremagem ou floculação intensa).
- **COR:** utilizando método visual, realizou-se comparação da cor da amostra com a do padrão estabelecido, usando fontes de luz branca indireta. As amostras foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada.
- **ODOR:** realizado diretamente através do olfato, também por comparação das formulações incorporadas ao extrato com o padrão. As formulações podem ser classificadas segundo os seguintes critérios: característico; normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada (BRASIL, 2004).

Foram monitorizados ainda os parâmetros físico-químicos, pH, viscosidade e espalhabilidade das formulações. A medida do pH foi realizada nas formulações que

permaneceram estáveis macroscopicamente nos ensaios de centrifugação e estresse térmico. Foi utilizado o método potenciométrico, com pHmetro digital, previamente calibrado com as soluções tampão pH 4,0 e 7,0. As amostras foram diluídas em água destilada, obtendo-se uma solução estoque a 10%. A viscosidade foi avaliada por meio de viscosímetro rotativo (Quimis). O sensor imerso na amostra permite que, sob velocidade crescente, seja feita a leitura das viscosidades, traçando assim curvas ascendentes e descendentes, a fim de serem classificados os sistemas em Newtonianos ou não-Newtonianos (BRASIL, 2012). Ambos os testes foram realizados em triplicata.

Para análise da espalhabilidade, 0,3 g de amostra foi colocado entre placa de vidro medindo 10 X 18 cm e 0,5 cm de espessura, sendo a primeira placa disposta sobre papel milimetrado apoiado em uma placa de madeira. As placas seguintes foram sendo adicionadas, em total de oito placas, sendo aguardados 2 min após a colocação de cada placa para a leitura do diâmetro formado, em cm. Os dados foram plotados em uma planilha na qual foi calculada a espalhabilidade conforme Equação 5 (BRASIL, 2004).

$$(Eq. 5) E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

Onde:  $E_i$  = espalhabilidade da amostra para um determinado peso  $i$  ( $\text{mm}^2$ );  $d$  = diâmetro médio (mm) da amostra após a sobreposição de placa. Sendo os testes novamente realizados em triplicata.

### 3.11.2 Estudo de estabilidade preliminar

Conforme descrito anteriormente, a avaliação da estabilidade física das formulações foi monitorada por meio da análise visual da cor e do aspecto, das medidas da variação da viscosidade e do pH das amostras. Para a análise da estabilidade preliminar das formulações foram realizados os testes de centrifugação e ciclos de gelo/degelo, sendo avaliadas as características organolépticas, de acordo com Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos sugerido pela Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012): aspecto, cor e odor, além do pH e viscosidade, para aquelas formulações que permaneceram estáveis ao final do teste. Para o teste de centrifugação, 10 g de cada formulação foram acondicionados em tubos plásticos transparentes e submetidos à centrifugação por 30 min a 3.000 rpm e temperatura de 25 °C. Para o ensaio de gelo/degelo, as formulações foram submetidas a ciclos de 24 h a 40 ± 2 °C, e 24 h a 4 ± 2 °C durante 12 dias, totalizando 6 ciclos. Para a avaliação dos parâmetros foram seguidas as especificações descritas no item 3.11.1, página 60 (BRASIL, 2012; SPELLMEIER, 2005).

### **3.11.3 Ensaio de estabilidade acelerada**

Para o estudo de estabilidade acelerada, amostras foram selecionadas entre as formulações que apresentaram melhor compatibilidade e atividade durante os ensaios prévios. Assim, amostras das formulações foram colocadas em estufa a 40 ± 2 °C, em geladeira a 4 ± 2 °C e em temperatura ambiente a 20 °C ± 2 °C por 90 dias, sendo avaliados os parâmetros organolépticos: aspecto, cor e odor, além do pH, viscosidade e espalhabilidade a fim de observar alterações induzidas pelos fatores temperatura/tempo. As avaliações foram realizadas conforme descrito no item 3.11.1, página 60. As determinações do pH e parâmetros organolépticos foram realizadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, e as análises de viscosidade e espalhabilidade foram realizadas nos tempos 0 e 90 dias. O tempo zero foi considerado o momento em que se realizou o primeiro registro de um parâmetro analisado (BRASIL, 2004). Foi realizado ainda o monitoramento da atividade antioxidante, de acordo com item 3.8.1 (página 50).

### 3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES

#### 3.12.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM e Concentração Bactericida Mínima – CBM.

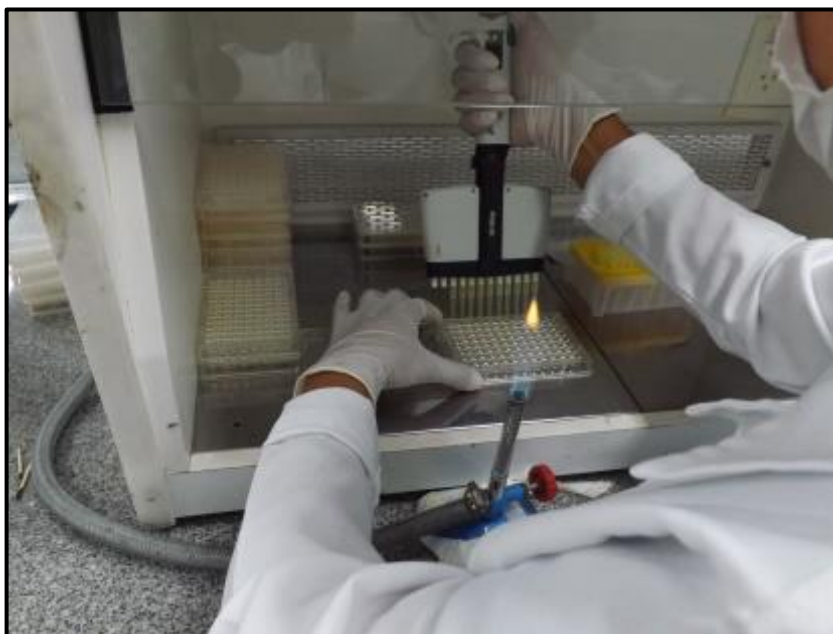
A atividade antimicrobiana *in vitro*, foi avaliada no extrato de *M. nigra* e formulações selecionadas na estabilidade preliminar, diluídos em água destilada, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25 mg/mL. A microdiluição, baseada no documento M07-A9 (CLSI, 2012), consistiu na distribuição de 100 µL de caldo Muller-Hinton em placas de microtitulação; a seguir, 100 µL da solução estoque foram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferido para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais de 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,3; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL. Para a gentamicina obteve-se uma concentração inicial de 1,6 mg/mL e diluída nas concentrações de 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,0125 mg/mL.

Na preparação do inóculo foi utilizado cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Shigella flexneri* (ATCC 12028), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Serratia marcescens* (ATCC 13880) *Staphylococcus aureus* MRSA (33591) e *Salmonella enterica* (ATCC 10708) para obtenção de uma suspensão com turvação em solução salina com densidade variando entre 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 625 nm, obtendo-se uma suspensão homogênea de  $1,5 \cdot 10^8$  cels/mL<sup>3</sup> correspondente ao padrão Mc Farland 0,5. Desta suspensão, foi inoculado 10 µL nos poços das microplacas contendo a diluição do extrato e formulações. O material foi incubado a 37 °C por 24 h, em condições de aerobiose.

Após incubação foi adicionado 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (CTT) a 1% em cada poço para a detecção da mudança de cor, do incolor para vermelho, que refletiu o metabolismo bacteriano ativo. Sendo assim, determinado a concentração inibitória mínima (CIM), como a concentração mais baixa da amostra



que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano. De todos os poços foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$ , semeando-se na superfície de ágar MH e incubando por 24 h a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como a menor concentração da amostra capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata (Figura 9).



**Figura 9:** Ensaio de atividade antimicrobiana. Fonte: autoria própria.

### 3.12.2 Teste de desafio da eficácia do sistema conservante (*Challenge Test*)

Para determinar a resistência das formulações estudadas à contaminação microbiana foi realizado o teste de desafio da eficácia do sistema conservante. Novamente, foram submetidas ao teste as amostras selecionadas na estabilidade preliminar. Foram utilizados os seguintes microrganismos-teste: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), os quais foram suspensos em solução salina a partir de cultura ativa de 24 – 48 h em superfície de ágar. A suspensão foi ajustada para uma contagem de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> correspondente ao padrão McFarland 0,5, com densidade óptica variando entre 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 625 nm (ABDI, 2015).

Após obtenção do inóculo, realizou-se a contaminação da formulação a ser testada com 1% da suspensão bacteriana em relação ao volume, obtendo-se uma

diluição de 1/100 do inóculo. De cada formulação retirou-se 0,5 g que foi diluída em 4,5 mL de solução salina obtendo uma diluição de  $10^{-1}$  e a partir desta retirou-se 1 mL e realizou-se diluição seriada até  $10^{-6}$ , destas diluições foi retirado 1 mL e colocado em placa de petri, em seguida foi adicionado ágar para contagem e incubou-se em estufa à 37 °C por 24 h para contagem das colônias. O teste foi realizado durante 28 dias, sendo realizadas leituras das unidades formadoras de colônias nos intervalos de 0, 7, 14 e 28 dias. A contagem foi realizada em triplicata para cada diluição e apresentadas como a média (n=3).

### 3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância de pareamento utilizando o ANOVA one – way para variáveis não paramétricas, utilizando o GraphPad Prism versão 6.0 e expressa como média  $\pm$  desvio padrão (D.P.). A análise visou, fundamentalmente, verificar se existe diferença significativa entre as médias dos resultados obtidos. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Foram utilizados ainda os softwares ChemWindow, Origin, Shimadzu e Excel.

# *Resultados e discussão*

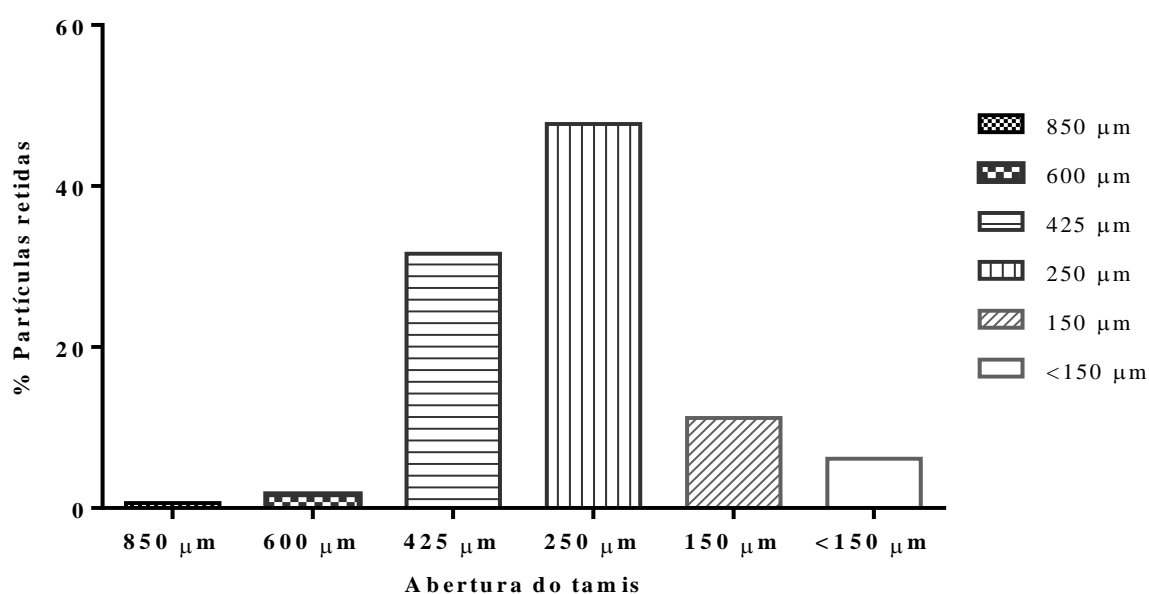
---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

#### 4.1.1 Caracterização do pó de *Morus nigra*

Foram coletados 1.633,4 g de folhas a partir das quais, mediante processo de secagem e pulverização, foi possível obter 542,4 g de pó, representando assim 33,20% de rendimento. Para fins de caracterização do pó obtido, foi feita a determinação da granulometria conforme orienta a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), sendo calculada a média do percentual de pó retido em cada tamis. Observou-se maior retenção nos tamises de abertura de malhas de 250  $\mu\text{m}$  (47,72%) e 425  $\mu\text{m}$  (31,6%), como pode ser visto na figura 10. Portanto, é possível classificar o pó como moderadamente grosso. Estudo anterior (SAMPAIO, 2017) realizou análise granulométrica do pó das folhas de *M. nigra*, também classificando entre semifino e moderadamente grosso, sendo, desta forma, compatível com os processos extrativos adotados nesse estudo.



**Figura 10:** Distribuição granulométrica do pó das folhas de *M. nigra*. Fonte: autoria própria.

## 4.2 EXTRATOS VEGETAIS DE *Morus nigra*: MnEF E MnEEB

### 4.2.1 Análise fitoquímica preliminar

A partir da triagem fitoquímica inicial dos extratos MnEF preparados empregando diferentes proporções de etanol/água foi possível identificar as principais classes de metabólitos secundários por meio dos métodos cromatográficos apresentados por Wagner & Bladt (1996). Na tabela 6 (página 69) é possível observar a presença de compostos fenólicos predominante nas proporções a 60% e 70%. Além disso, verificou-se a presença de flavonoides glicosídicos fortemente no MnEF 70%, assim como alcaloides, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos e taninos condensados.

**Tabela 6:** Caracterização fitoquímica de extratos de *Morus nigra*.

CLASSE QUÍMICA	MnEF 50%	MnEF 60%	MnEF 70%	MnEF 80%	MnEF 90%
Alcaloides gerais	++	++	+++	+	+++
Antocianinas	-	-	-	-	-
Antraquinonas Agliconas	-	-	-	-	-
Compostos Fenólicos	++	+++	+++	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-
Derivados antracênicos	++	++	+++	++	+++
Lignanas	++	++	+++	+	+++
Mono, sesqui e diterpenos	-	+	+++	+	++
Naftoquinonas	-	-	-	-	-
Saponinas	-	+	++	-	-
Taninos condensados	++	+++	+++	+	+
Triterpenos e esteroides	-	-	-	-	-
Xantinas	-	-	-	-	-

(-) Ausente; (+) Baixo; (++) Moderado; (+++) Forte. Fonte: autoria própria.

A análise preliminar permitiu definir a extração hidroalcoólica a 70% para o seguimento do estudo, com a elaboração de extrato etanólico bruto. Os resultados estão de acordo com outros estudos realizados que mostraram na triagem fitoquímica reação positiva para a presença de flavonoides, taninos, alcaloides e fenóis (QUEIROZ et al., 2012; MALIK et al, 2012; MALLHI et al., 2014; KUMAR et al., 2011; ALMEIDA et al., 2011; PADILHA et al., 2010a).

#### 4.2.2 Determinação de fenóis e flavonoides totais

Foi realizada a determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais dos extratos vegetais de *Morus nigra* a partir das curvas de calibração do ácido gálico e da quercetina. A tabela 7 mostra que o extrato MnEEB apresentou o maior teor de compostos fenólicos ( $78,87 \pm 3,29$  mg EqAG/g), enquanto o extrato de MnEF apresentou maior teor de flavonoides totais ( $64,58 \pm 0,008$  mg EqC/g).

**Tabela 7:** Teores de fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos das folhas de *Morus nigra*

Extratos	Fenólicos totais (mg EqAG/g)	Flavonoides totais (mg EqC/g)
MnEF	$61,87 \pm 0,002^b$	$64,58 \pm 0,008^a$
MnEEB	$78,87 \pm 3,29^a$	$46,13 \pm 4,32^b$

MnEF: Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB: Extrato etanólico bruto de *M. nigra*. Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=3). Na mesma coluna, letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Os resultados provenientes desse estudo corroboram com pesquisa que analisou extrato etanólico bruto e frações das folhas de *M. nigra* encontrou menores teores de compostos fenólicos no extrato etanólico bruto ( $58,05 \pm 5,20$ ) e dentre os extratos analisados, o extrato acetato de etila (AcOEt) continha a maior quantidade ( $153,00 \pm 11,34$ ) e para o teor de flavonoides totais, o maior valor foi novamente observado no extrato AcOEt ( $292,50 \pm 70,34$ ) enquanto o extrato etanólico bruto (Mn-EtOH) apresentou  $35,48 \pm 6,86$  mg EqC/g (SOUZA et al., 2018). Zeni et al. (2017) analisaram infusão e decocção em água e ainda decocção hidrometanólica, encontrando valores similares ao estudo, sendo que a quantidade de fenólicos totais foi maior na infusão ( $75,86 \pm 0,87$  mg/g) do que na decocção ( $64,59 \pm 0,14$  mg/g) e maior conteúdo de flavonoides totais também na infusão ( $79,96 \pm 0,71$  mg/g) seguido pelo decocto hidrometanólico ( $76,76 \pm 0,78$  mg/g).

#### 4.2.3 Atividade antioxidante dos extratos vegetais

A atividade antioxidante (AA) é primordial para a vida humana e está

diretamente relacionada com diversas funções biológicas relacionadas à proteção celular. Inicialmente todos os extratos fluidos de *M. nigra* foram submetidos ao ensaio de ABTS (tabela 8) para, juntamente com a dosagem de compostos fenólicos e da avaliação da atividade fotoprotetora, verificar a melhor proporção de solvente hidroalcoólico para dar seguimento ao estudo, com o desenvolvimento do fitocosmético.

**Tabela 8:** Atividade antioxidante de MnEF das folhas de *Morus nigra* segundo método de ABTS.

MnEF	ABTS (% AA)
MnEF 50%	97,56 ± 3,37% <sup>a</sup>
MnEF 60%	98,49 ± 1,122% <sup>a</sup>
MnEF 70%	99,30 ± 0,349% <sup>a</sup>
MnEF 80%	75,33 ± 5,297% <sup>b</sup>
MnEF 90%	99,83 ± 0,302% <sup>a</sup>

MnEF: Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*. Valores expressos em média ± DP (n=3). Na mesma coluna, letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Por meio da tabela 8 observamos melhores percentuais de atividade antioxidante em MnEF 90% com 99,83 ± 0,302% de AA, similar a MnEF 70% com 99,30 ± 0,349% de AA, MnEF 60% com 98,49 ± 1,122% de AA e MnEF 50% com 97,56 ± 3,37% de AA. A menor atividade foi observada em MnEF 80%, com 75,33 ± 5,297% de capacidade antioxidante.

Posteriormente, quando escolhida a solução extrativa hidroalcoólica a 70% para seguimento do estudo, foi avaliado o potencial antioxidante de extratos de *M. nigra* pelo método de sequestro do radical livre DPPH. O princípio do ensaio é a transferência de elétrons, na qual o DPPH, de cor púrpura, é reduzido dando origem ao difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. Os resultados indicam a porcentagem de poder antioxidante ou sequestradora de radicais livres e são expressos como CE<sub>50</sub>, como a concentração para obter 50% de uma estimativa do efeito máximo em 100%, sendo a melhor atividade quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>. Foi utilizado ainda o método do branqueamento do β-caroteno, que se baseia na oxidação (descoloração) deste, determinando assim o poder antioxidante de um



agente. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Morus nigra* é apresentada na Tabela 9.

**Tabela 9:** Atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Morus nigra* segundo método DPPH e  $\beta$ -caroteno

<b>Amostras</b>	<b>DPPH (CE<sub>50</sub>, <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno (% AA)</b>
MnEF	4,23 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	45,64 $\pm$ 6,67 <sup>a</sup>
MnEEB	63,1 $\pm$ 5,85 <sup>b</sup>	11,57 $\pm$ 5,95 <sup>b</sup>
Ácido ascórbico	20,15 $\pm$ 4,45 <sup>c</sup>	0,54 $\pm$ 4,51 <sup>c</sup>
BHA	1,41 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	71,98 $\pm$ 9,83 <sup>d</sup>
BHT	1,72 $\pm$ 2,97 <sup>a</sup>	79,21 $\pm$ 3,56 <sup>d</sup>

CE<sub>50</sub> é a concentração do extrato capaz de estabilizar 50% do radical DPPH. Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=3). Na mesma coluna, letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey (p > 0,05). Fonte: autoria própria.

Os dados mostraram que os extratos de *M. nigra* possuem elevada capacidade de sequestro de radicais livres, com CE<sub>50</sub> < 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que o MnEF apresentou melhor atividade (4,23  $\pm$  3,29) do que MnEEB, e BHA e BHT demonstraram melhor atividade antioxidante. Utilizando o método de branqueamento com  $\beta$ -caroteno, foi observada melhor atividade antioxidante do extrato fluido de *M. nigra* com 45,64  $\pm$  6,67% de atividade, já o extrato bruto apresentou 11,57  $\pm$  5,95% de atividade, acima do padrão ácido ascórbico.

Os resultados apresentam conformidade com o estudo de Souza et al. (2018) que analisaram extrato bruto e frações, sendo que o extrato etanólico apresentou CE<sub>50</sub> de 69,10  $\pm$  1,88  $\mu\text{g/mL}$  e a fração AcOEt apresentou o melhor resultado, com CE<sub>50</sub> de 50,40  $\pm$  1,16  $\mu\text{g/mL}$ . No método do  $\beta$ -caroteno, o extrato AcOEt novamente mostrou melhor antioxidante com 54,10  $\pm$  12,34% de atividade, enquanto que o extrato etanólico apresentou 41,30  $\pm$  12,80% de atividade antioxidante.

Zeni et al. (2017), que analisaram extratos obtidos por diferentes métodos extrativos (infusão, decocção e decocto metanólico), encontraram atividade antioxidante superior, sendo os extratos obtidos por infusão com 83,85  $\pm$  0,99% e

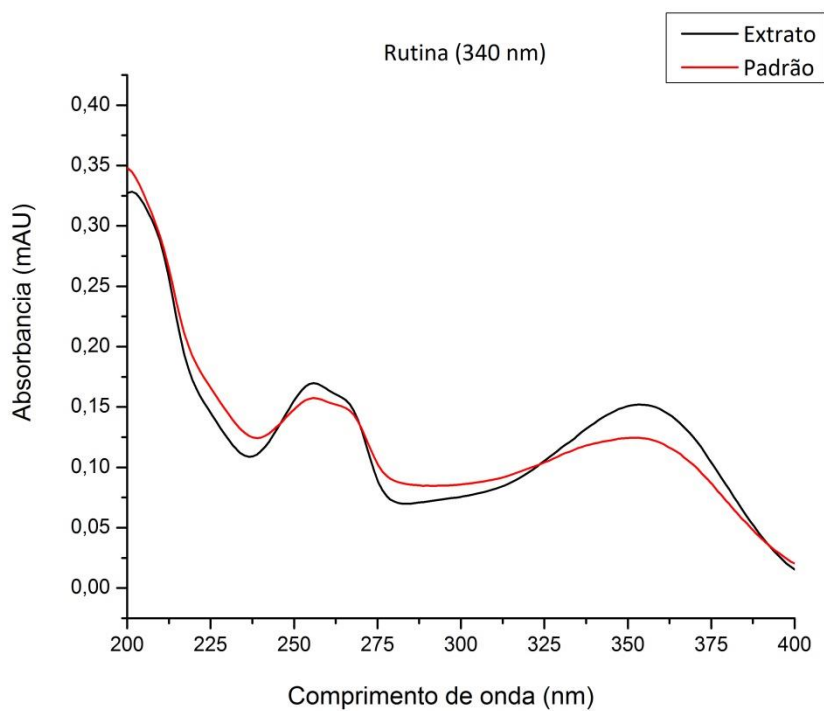
hidrometanólico com  $81,71 \pm 0,05\%$  de atividade, superior à decocção ( $74,37 \pm 0,20\%$ ).

Os compostos fenólicos são considerados como agentes antioxidantes mais ativos nos vegetais e sua relação com a atividade antioxidante é amplamente discutida, sendo intimamente ligada à presença de polifenóis. Eles podem atuar de maneiras diversas no combate aos radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, quelando metais de transição ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ ), interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica ou reparando danos ocasionados pelos radicais livres (PODSEDEK, 2007; MIN; EBELER, 2008).

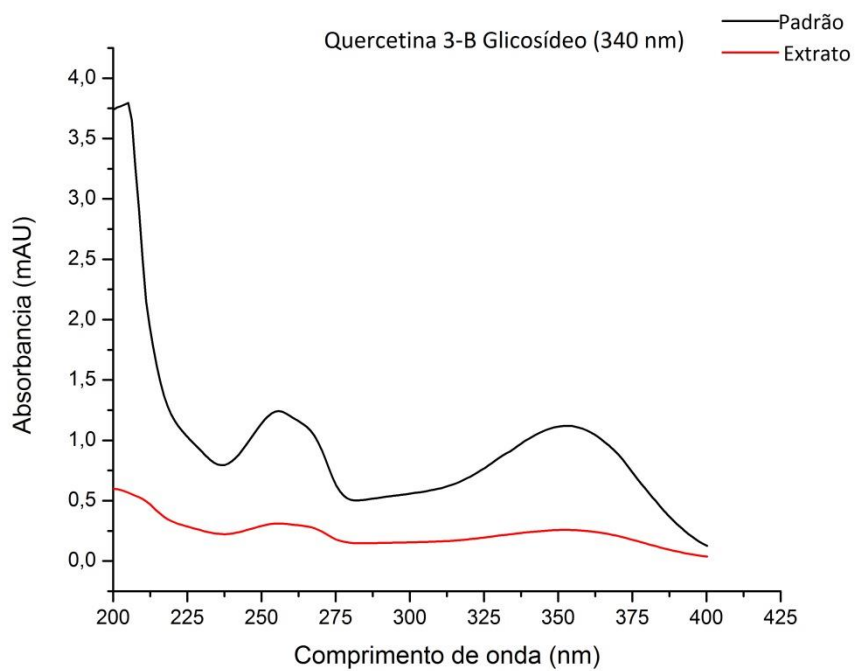
#### **4.2.4 Análise dos extratos por CLAE-DAD**

Para a cromatografia líquida de alta eficiência, considera-se que a fase estacionária é escolhida de acordo com a amostra que será utilizada e com o objetivo da análise, podendo ser em fase normal (polar) ou fase reversa (apolar). Comumente utiliza-se a sílica, por ser quimicamente estável quando em contato com a maioria dos solventes orgânicos e em sistemas que apresentam pH baixo. Já a escolha da fase móvel afeta a resolução, a seletividade e a eficiência da separação cromatográfica. Sendo a fase estacionária normal, os solventes utilizados na fase móvel são apolares, sendo a fase estacionária reversa, são utilizados solventes polares. O detector do sistema efetua a análise da solução que passa através da coluna cromatográfica, detectando os analitos presentes, e para cada um desses é emitido um pico no cromatograma, conforme sua concentração (GUPTA et al., 2012).

A análise considerou o tempo de retenção e espectro de UV da rutina (Figura 11) e da isoquercetina (Figura 12) para identificar a presença dos compostos fenólicos nas amostras.

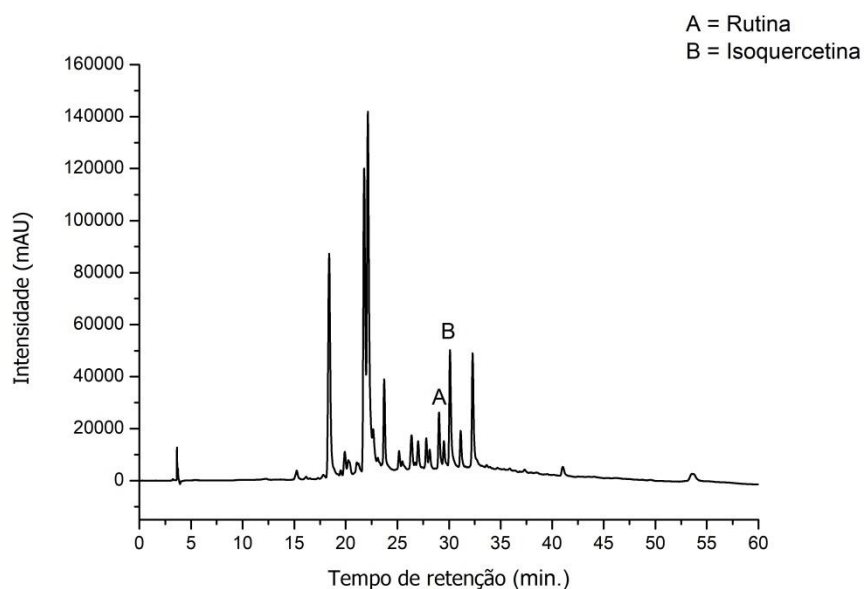


**Figura 11:** Espectro de UV do padrão analítico rutina e MnEF

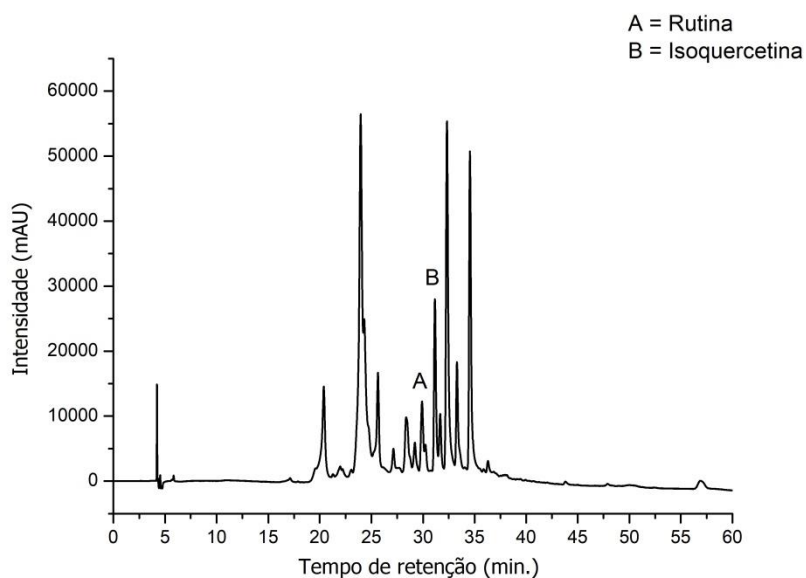


**Figura 12:** Espectro de UV do padrão analítico isoquercetina e MnEF

Considerando estes princípios, a análise por CLAE-DAD dos extratos vegetais de *M. nigra*, permitiu a identificação e a quantificação da rutina ( $y = 19754x - 101075$ ;  $R^2 = 0,9977$ ) e da isoquercetina ( $y = 12675x + 9443,8$ ;  $R^2 = 0,9982$ ), marcadores analíticos já relatados anteriormente nesta espécie (SAMPAIO, 2017; SOARES, 2017). Nas figuras 13 e 14 estão demonstrados os perfis cromatográficos do extrato fluido hidroalcoólico e do extrato etanólico bruto indicando os marcadores identificados, os valores da quantificação estão descritos na tabela 10, página 76.



**Figura 13:** Perfil cromatográfico de MnEF em 340 nm. Fonte: autoria própria.



**Figura 14:** Perfil cromatográfico de MnEEB em 340 nm. Fonte: autoria própria.

**Tabela 10:** Valores de quantificação dos marcadores analíticos rutina e isoquercetina em extratos vegetais de *Morus nigra*

Amostras	Rutina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) (média $\pm$ DP)	Isoquercetina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) (média $\pm$ DP)
MnEF	14,17 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	31,04 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
MnEEB	7,78 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	2,59 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>

Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=3). Na mesma coluna, letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

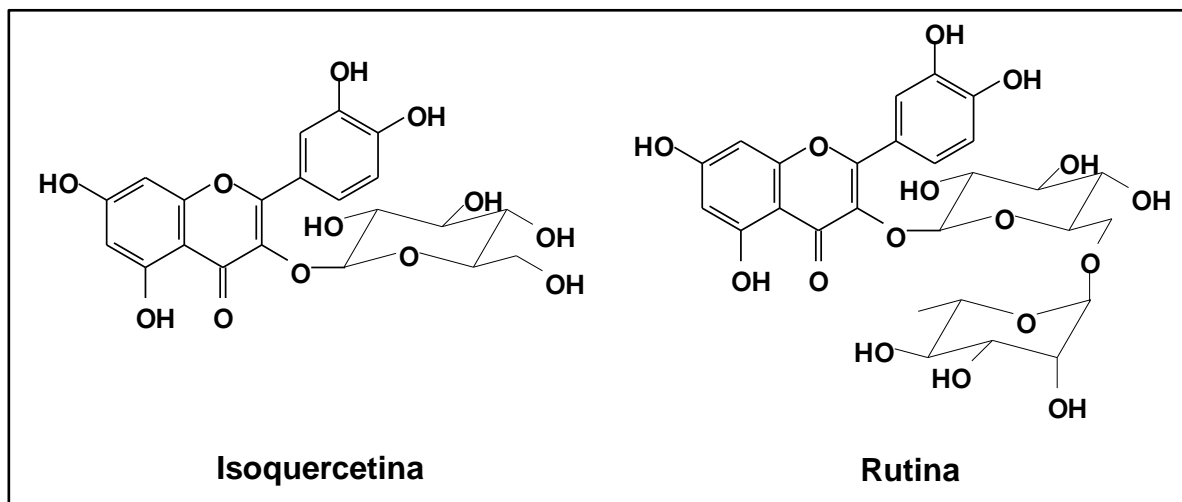
É possível observar que o MnEF apresenta quantidades superiores de rutina (14,17  $\pm$  0,04  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e de isoquercetina (31,04  $\pm$  0,14  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) em comparação ao MnEEB. Sampaio (2017) analisou diferentes extrações de *M. nigra* e seus resultados mostraram que o extrato obtido por maceração apresentou picos compatíveis com rutina, isoquercetina, ácido clorogênico e canferitrina. A análise identificou ainda menores teores de rutina (0,86  $\pm$  0,09  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e de isoquercetina (2,78  $\pm$  0,13  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Já pelo método de decocção, a quantificação da rutina foi ligeiramente superior ao encontrado no presente estudo (16,41  $\pm$  0,54  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), porém a dosagem de isoquercetina ficou abaixo (26,42  $\pm$  0,96  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

Estudo realizado por Soares (2017) com extrato etanólico bruto de folhas de *M. nigra*, também identificou rutina, isoquercetina e canferitrina. Sendo quantificados também menores teores de rutina (5,05  $\pm$  1,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e de isoquercetina (22,3  $\pm$  3,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se comparados ao extrato fluido hidroalcoólico, porém superior à quantidade de isoquercetina identificada no extrato etanólico bruto da pesquisa atual.

Observando tais aspectos torna-se fundamental realizar a padronização de extratos vegetais, considerando a quantificação de metabólitos como aspecto de controle de qualidade para o desenvolvimento de produtos com rigor metodológico exigido. Desta forma torna-se possível a reprodutibilidade do extrato vegetal, com a garantia da presença dos compostos de interesse, nas quantidades recomendadas para a ação esperada.

A rutina e a quercetina-3- $\beta$ -glicosídeo (Figura 15, p. 77) são flavonoides glicosídicos pertencentes ao grupo dos flavonóis (CARVALHO, 2014). Grande parte das propriedades terapêuticas dos compostos fenólicos está ligada à sua

capacidade antioxidante e quelante, com poder de sequestrar radicais livres. Dentre estes, a quercetina se apresenta com um dos flavonoides com maior capacidade oxirredutora (HUBER; RODRIGUEZ-AMARA, 2008; HEIJNEM et al., 2002; NUMATA; TANAKA, 2011).



**Figura 15:** Estruturas químicas de compostos identificados em extratos de *M. nigra*.  
Fonte: autoria própria.

A ação antioxidante da isoquercetina foi analisada em diversos estudos que apontam este como um dos flavonoides com maior poder de sequestro de EROs (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; HEIJNEM et al., 2002; NUMATA; TANATA, 2011). A quercetina está presente na forma glicosilada, sendo o tipo de grupamento glicosídico o fator de diferenciação entre as moléculas. A isoquercetina (quercetina 3- $\beta$ -glicosídeo) possui uma molécula de glicose ligada à posição 3 e também pertence à classe dos flavonóis. A rutina, por sua vez possui um grupamento de rutinose ligado à posição 3 (CHEN; ZHOU; JI, 2010).

Em sua forma glicosilada, também denominada isoquercetina, o composto apresenta maior solubilidade em água (CHEN; ZHOU; JI, 2010). Por sua vez, a rutina apresenta ampla diversidade de atividades farmacológicas (antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, vasoprotetora, dentre outras) (FRANZOI; SPINELLI; VIEIRA, 2008; ARAÚJO, 2012), podendo ser transformada em quercetina 3- $\beta$ -glicosídeo, por meio da quebra do grupamento ramnose, aumentando assim sua biodisponibilidade (CARVALHO, 2014).

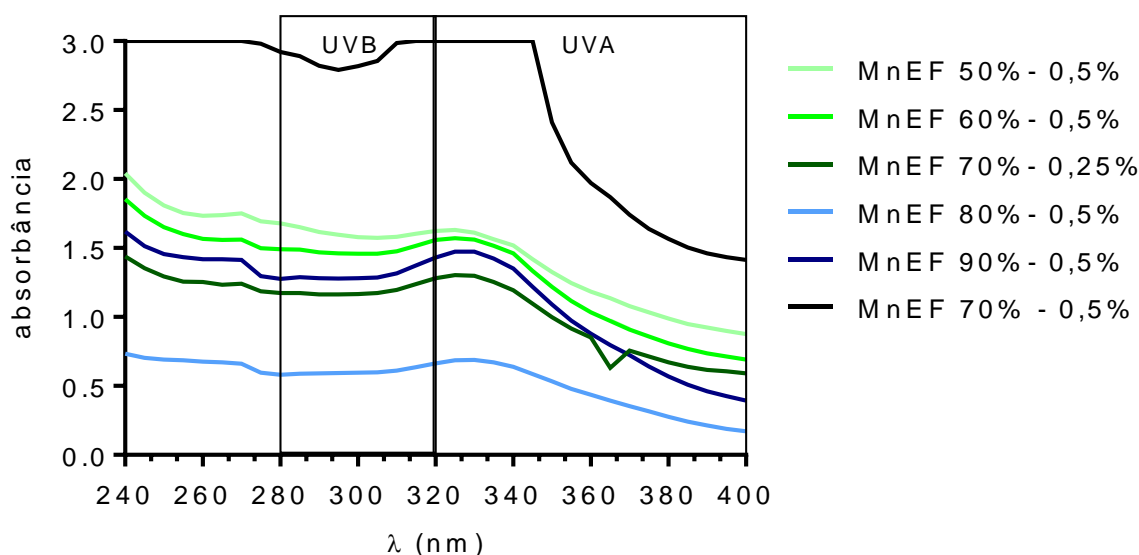
Estudos envolvendo polifenóis de espécies vegetais demonstram sua eficácia na absorção da radiação UVB, sendo agentes potenciais de proteção solar em razão

de sua estrutura química. Outro aspecto importante envolvido é a capacidade dos compostos fenólicos em atenuar os mediadores inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), reduzindo assim a resposta inflamatória no dano fotoinduzido (ALMEIDA et al., 2015a; BULLA et al., 2015; SHIN et al., 2013).

#### 4.2.5 Atividade fotoprotetora *in vitro*

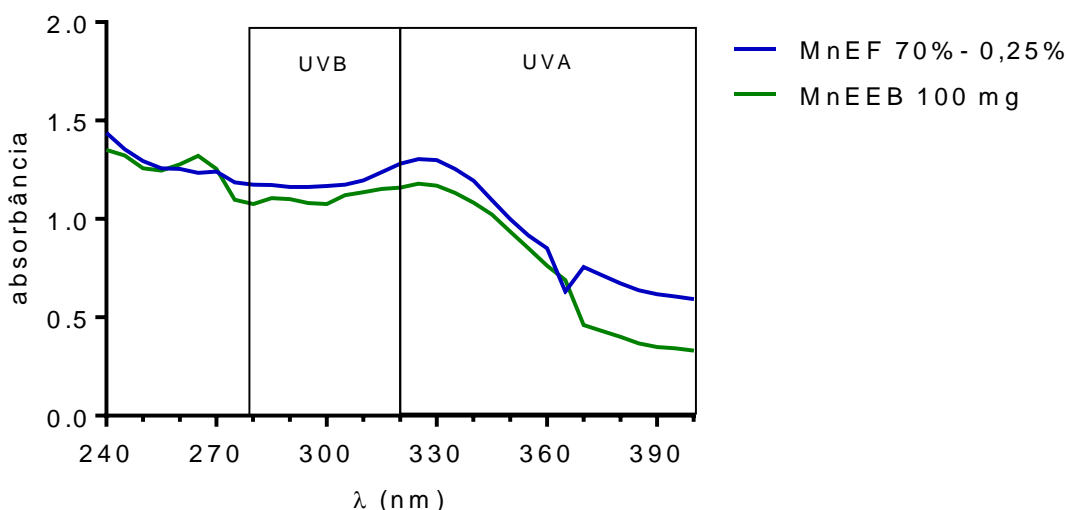
A análise da atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato fluido revelou que MnEF 70% apresentou absorvância máxima em diluição a 0,5%. Assim, foi realizada nova diluição a 0,25% para efeito comparativo com os demais extratos.

Observa-se na figura 16 que os extratos apresentam absorção em todos os comprimentos de onda, sendo que o pico máximo foi observado em 240 nm. Além disso, foram observados ainda outros picos em 270 e 330 nm. A maior absorvância foi demonstrada pelo MnEF 70%, seguido pelo MnEF 50% e a menor absorção foi para o extrato MnEF 80%.



**Figura 16:** Espectros de absorção UV dos diferentes extratos fluidos hidroalcoólicos (MnEF). Fonte: autoria própria.

A partir destes resultados, somada à avaliação da atividade antioxidante, MnEF 70% foi escolhido para dar seguimento ao estudo, sendo realizada comparação entre MnEF 70% e MnEEB 70% (Figura 17) com absorvância máxima em 240 nm de 1,438 para o MnEF e de 1,351 para o MnEEB.



**Figura 17:** Espectros de absorção UV de MnEF 70% e MnEEB. Fonte: autoria própria.

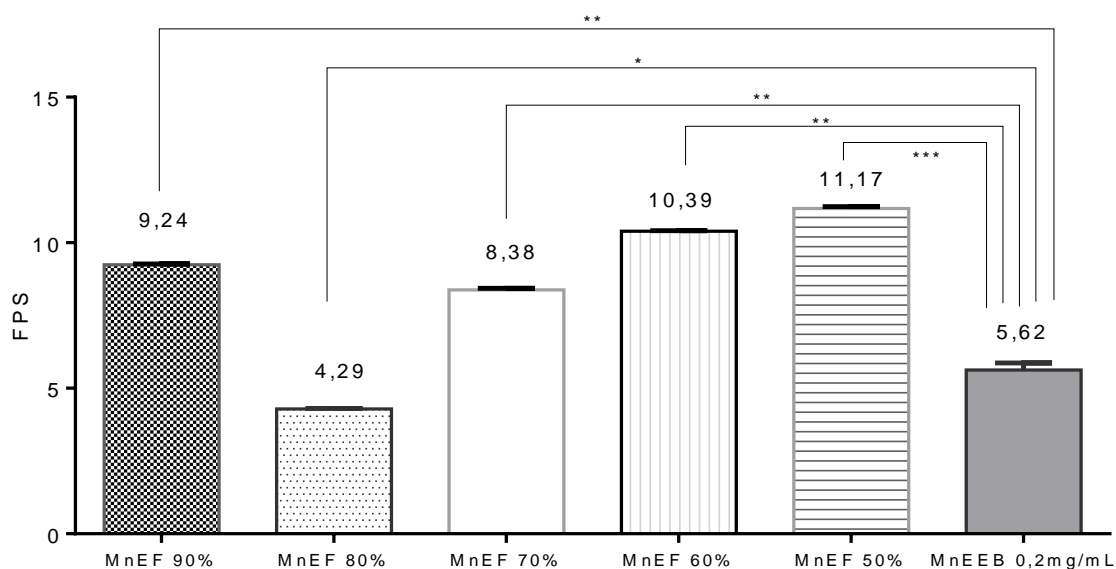
A análise da constituição fitoquímica do extrato vegetal é importante para o controle de qualidade físico-químico e a espectrofotometria colabora para isso, mensurando a energia absorvida por um sistema químico considerando o comprimento de onda ( $\lambda$ ). A intensidade da luz incidente é atenuada devido à absorção pela solução, como consequência das interações entre fótons e moléculas do soluto. Cada molécula possui determinado gráfico espectral, podendo este ser empregado para auxiliar na confirmação da identidade de uma espécie em particular (SKOOG et al., 2006).

Tomando por exemplo os flavonoides, estes apresentam espectros de absorção característicos no ultravioleta que são determinados pelo núcleo comum da benzopirona, tendo dois máximos de absorção: sendo um atribuído à existência do anel A (240 - 285 nm, banda II) e outro ao anel B (300 - 400 nm, banda I) (FERREIRA et al., 2016).

Por sua vez, a quercetina apresenta duas bandas características de absorção no UV-Vis, a primeira de 320-385 nm (Banda I: sistema cinamoil), faixa correspondente à porção do sistema conjugado entre o anel B e a carbonila do anel C, e a segunda de 240-280 nm (Banda II: sistema benzoil), equivalente à faixa de conjugação entre anel A e a carbonila do anel C (BUKHARI et. al., 2009; DEGHAN; KHOSHKAM, 2012).



Foi realizada então a verificação dos valores das absorvâncias segundo método proposto por Mansur et al. (1986). Os extratos foram novamente solubilizados em etanol absoluto e foi feita leitura das absorvâncias entre os comprimentos de onda de 290 a 320 nm, equivalentes ao feixe UVB (Figura 18).



**Figura 18:** FPS *in vitro* de extratos vegetais de *Morus nigra*. (\*) indica diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Os valores do fator de proteção solar *in vitro* variaram entre  $4,29 \pm 0,012$  (MnEF 80%) a  $11,17 \pm 0,065$  (MnEF 50%). Entretanto, é importante ressaltar o valor de MnEF 70%, com  $8,38 \pm 0,051$ , em concentração de 0,25%, enquanto que os demais extratos foram avaliados na concentração de 0,5%. O extrato bruto (MnEEB) apresentou FPS *in vitro* de 5,62 (0,2 mg/mL), ficando próximo do fator de proteção mínimo recomendado pela legislação brasileira, mínimo de 6, como apresenta a RDC N° 30 de 1º de junho de 2012 (ANVISA, 2012). É importante destacar que é inviável a comercialização de produto contendo extrato vegetal puro em tal concentração para obtenção da proteção solar, devendo este, portanto, ser incorporado em formulações em concentrações adequadas ao uso.

### 4.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FITOCOSMÉTICAS CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS DE *M. nigra*

A emulsão óleo em água (O/A) representa o veículo mais utilizado e adequado para fotoprotetores, porém, sua estabilidade é o ponto crítico, devendo o produto manter as mesmas características e propriedades apresentadas no momento em que foi formulado.

Para o estudo foram desenvolvidas 36 formulações a partir de quatro bases autoemulsionantes, sendo três aniônicas e uma não iônica a fim de avaliar os sistemas mais estáveis. O estudo preliminar teve o intuito de analisar a compatibilidade entre os componentes da formulação e os extratos vegetais, fluido e bruto, de *M. nigra*. Durante a incorporação do extrato com as emulsões, observou-se maior facilidade, como já esperado, de incorporação do extrato fluido, sendo que para o extrato bruto foi necessária pré solubilização em propilenoglicol ou água destilada. Foi observado ainda nos testes realizados que a solubilização em água destilada obteve melhores resultados na incorporação final, reduzindo-se assim a quantidade de propilenoglicol na formulação.

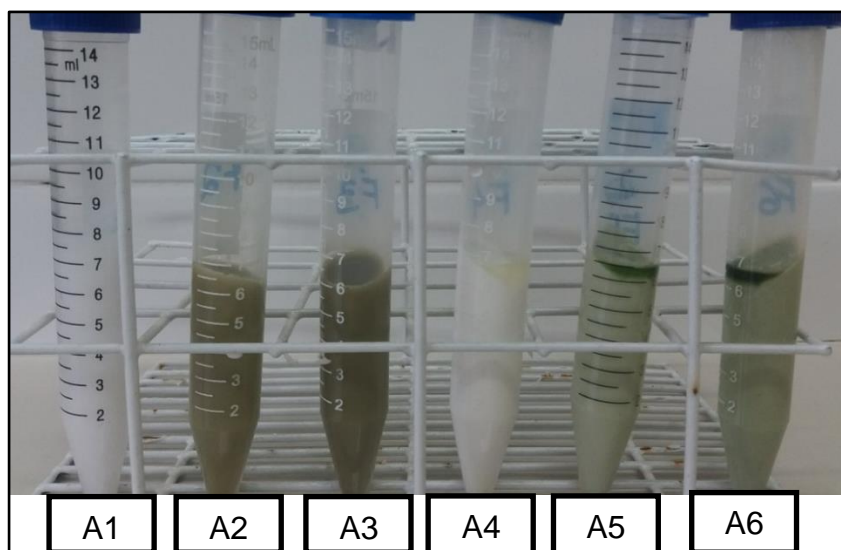
No tempo zero, as amostras apresentaram-se macroscopicamente estáveis, aspecto fluido e com odor característico, a cor variou entre branco leitoso e verde escuro, conforme presença em maior quantidade de extrato vegetal.

#### **4.3.1 Estabilidade preliminar**

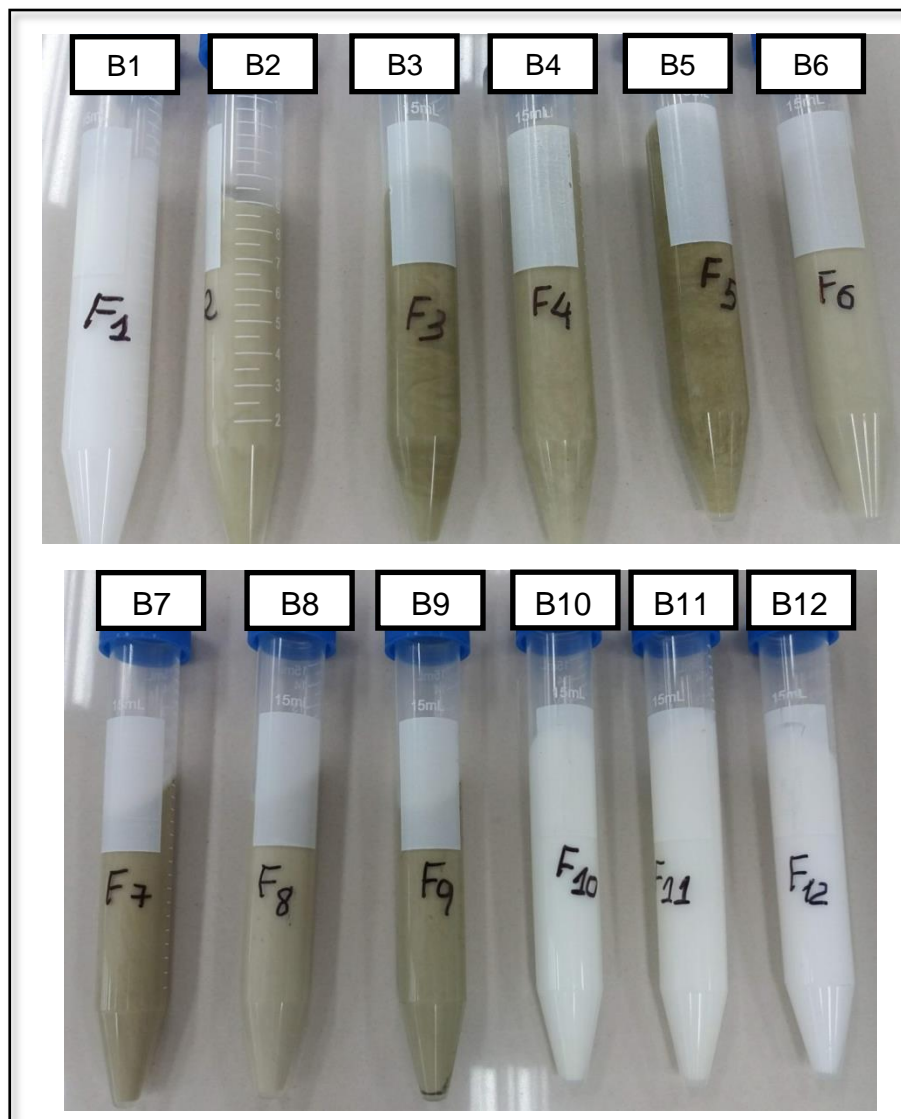
A análise da estabilidade preliminar compreende o estudo de pré-formulação, no qual é realizada a avaliação de compatibilidade e o controle dos parâmetros iniciais do produto. Para a avaliação da estabilidade preliminar das formulações fitocosméticas, foram realizados os ensaios de resistência à centrifugação e os ciclos de gelo/degelo. Foi feita a análise macroscópica dos aspectos organolépticos, permitindo assim, constatar alterações que inviabilizariam o desenvolvimento final do produto, a exemplo de: separação de fases, precipitação e turvação (BRASIL, 2012).

Desta forma, após 24 h de manipulação, as formulações foram avaliadas quanto aos parâmetros definidos anteriormente e iniciou-se o teste de resistência à centrifugação. É fundamental respeitar esse período inicial para que ocorra a estabilização da formulação, sendo preconizado período de 24 a 48 h após o preparo (MORAIS, 2007).

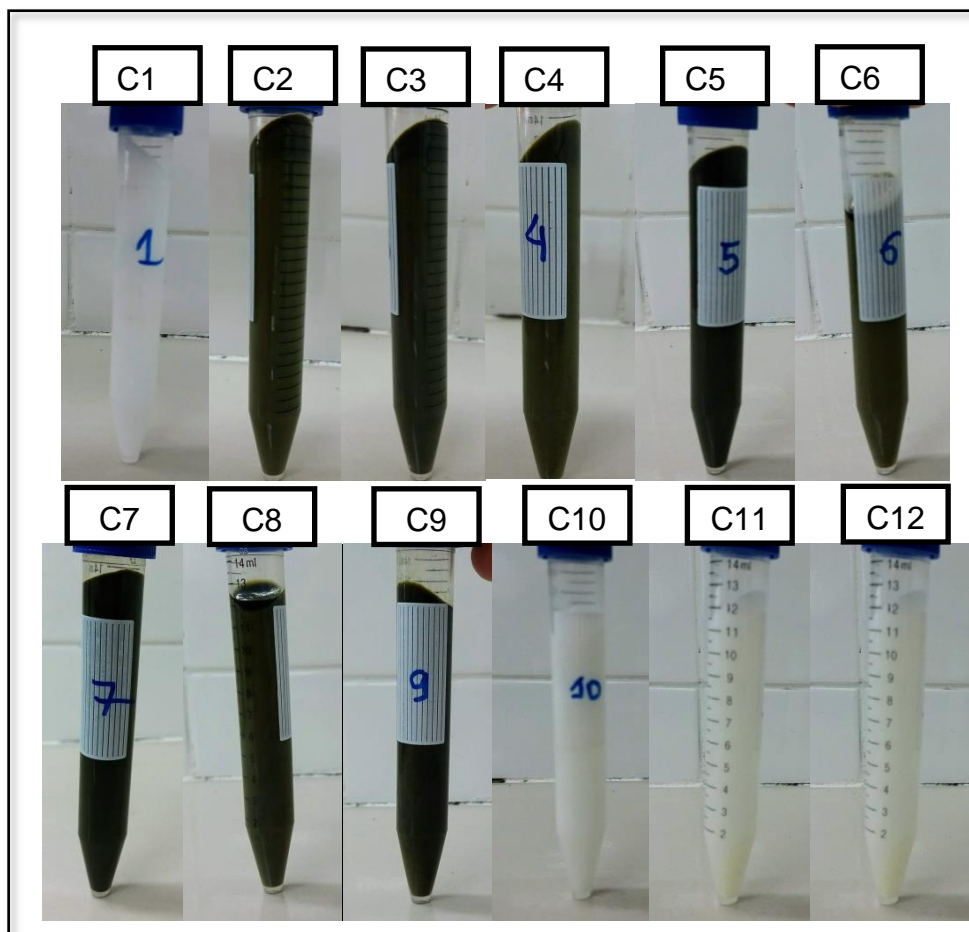
As emulsões em estudo foram formuladas utilizando dois tipos de tensoativo: aniônico (EB1, EB2 e EB3) usadas para os lotes A, B e C e não iônico (EB4) para as emulsões do lote D. Após o teste de centrifugação, observou-se que 21 formulações mantiveram homogeneidade macroscópica: A1, A2, A3, B1, B2, B3, B6, B7, B12, C1, C2, C3, C6, C7, C12 e as 6 formulações do lote D (D1, D2, D3, D4, D5 e D6). Enquanto 15 formulações apresentaram leve modificação: A4, A5, A6, B4, B5, B8, B9, B10, B11, C4, C5, C8, C9, C10 e C11, apresentando leve separação de fases e sedimentação (Figuras 19, 20, 21 e 22).



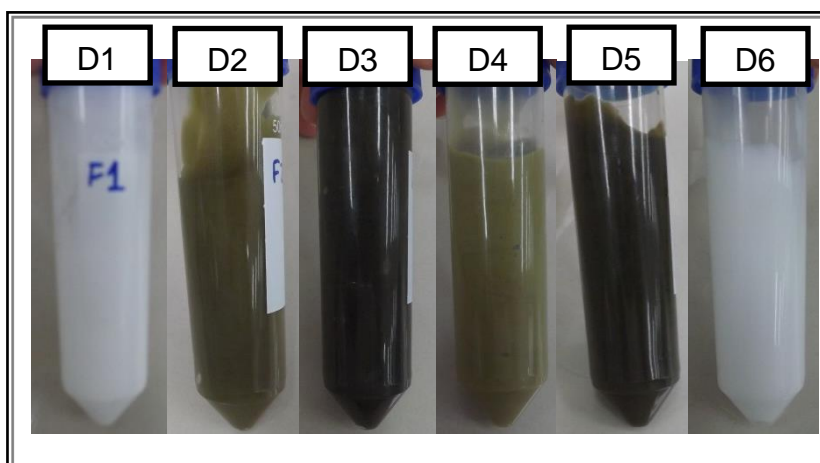
**Figura 19:** Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação - Lote A. Legenda: **A1:** base; **A2:** MnEF 5%; **A3:** MnEF 10%; **A4:** controle filtros UV; **A5:** filtros+ MnEF 5%; **A6:** filtros+ MnEF 10%. Fonte: autoria própria.



**Figura 20:** Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação - Lote B.  
Legenda: **B1:** base; **B2:** MnEF 5%; **B3:** MnEF 10%; **B4:** BZF+ MnEF 5%; **B5:** BZF+ MnEF 10%; **B6:** OCM+ MnEF 5%; **B7:** OCM+ MnEF 10%; **B8:** BZF+OCM+ MnEF 5%; **B9:** BZF+OCM+ MnEF 10%; **B10:** BZF+OCM ; **B11:** BZF; **B12:** OCM. Fonte: autoria própria.

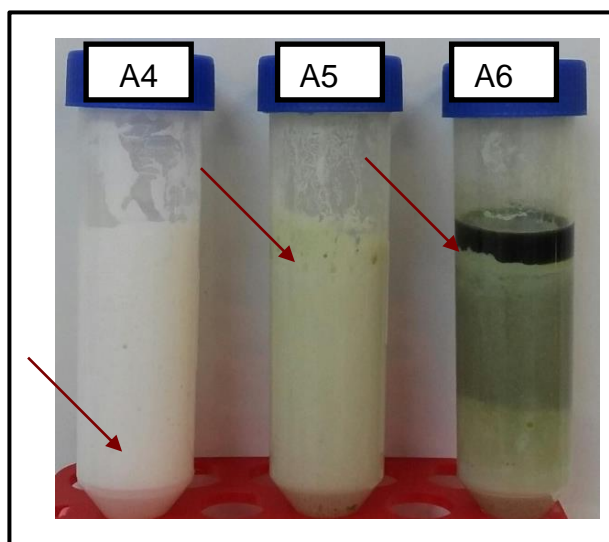


**Figura 21:** Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação – Lote C.  
 Legenda: **C1:** base; **C2:** MnEEB 5%; **C3:** MnEEB 10%; **C4:** BZF+ MnEEB 5%; **C5:** BZF+ MnEEB 10%; **C6:** OCM+ MnEEB 5%; **C7:** OCM+ MnEEB 10%; **C8:** BZF+OCM+ MnEEB 5%; **C9:** BZF+OCM+ MnEEB 10%; **C10:** BZF+OCM; **C11:** BZF; **C12:** OCM. Fonte: autoria própria.

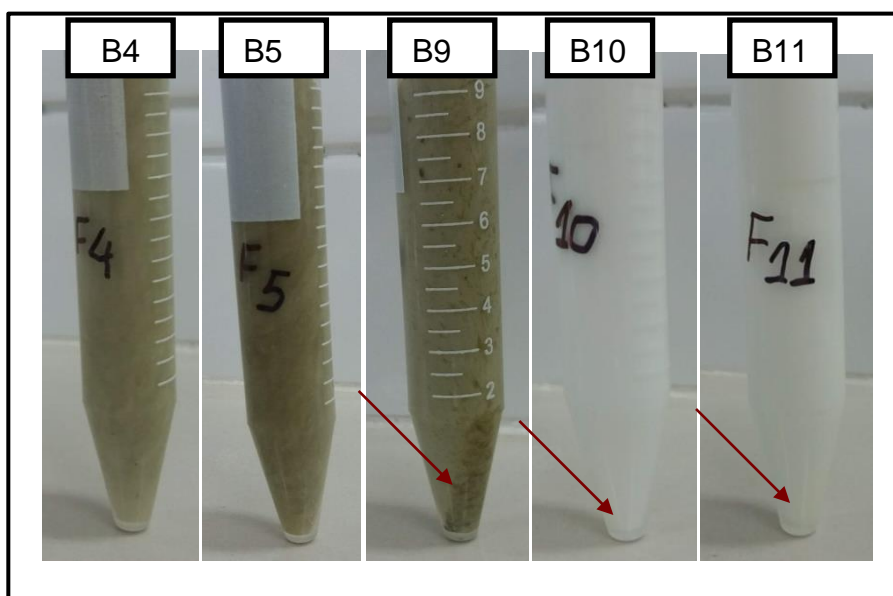


**Figura 22:** Formulações fitocosméticas após o teste de centrifugação – Lote D.  
 Legenda: **D1:** base; **D2:** MnEEB 5%; **D3:** MnEEB 10%; **D4:** OCM+ MnEEB 5%; **D5:** OCM+ MnEEB 10%; **D6:** OCM. Fonte: autoria própria.

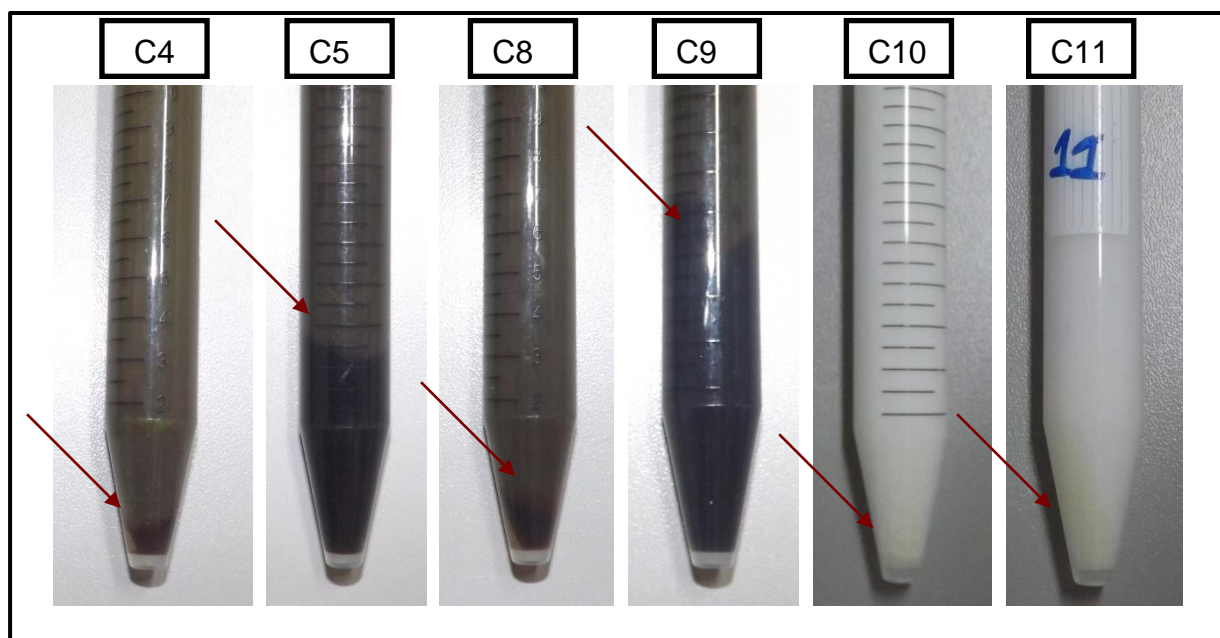
A realização dos ciclos de gelo e degelo permitiu a confirmação das informações preliminares dadas pela centrifugação, exceto pelas emulsões desenvolvidas a partir da emulsão-base não iônica 4 (Lote D) em que todas apresentaram intensas modificações no aspecto, tornando-se líquidas quando submetidas ao ciclo de calor, ficando demonstrada sua instabilidade quando submetidas a temperaturas elevadas. Em temperatura ambiente e em  $4 \pm 2$  °C estas emulsões reassumiram seu aspecto inicial, porém as emulsões acrescidas de extrato vegetal apresentaram intensa separação de fases. Assim, após os ciclos, verificou-se que 15 formulações permaneceram estáveis e sem alterações macroscópicas e dentre as formulações que apresentaram alterações na centrifugação, observou-se que foram agravadas em 3 formulações (A6, C5 e C9) com presença de separação total de fases, sedimentação, coalescência e cremagem. As formulações que apresentaram instabilidade após os ciclos de gelo e degelo foram excluídas do estudo (Figuras 23, 24, 25 e 26).



**Figura 23:** Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote A. Legenda: **A4:** BZF+ COM+ OX ZN+ DIOX TIT; **A5** BZF+ COM+ OX ZN+ DIOX TIT+ MnEF 5%; **A6:** BZF+ COM+ OX ZN+ DIOX TIT+ MnEF 10%. Fonte: autoria própria.

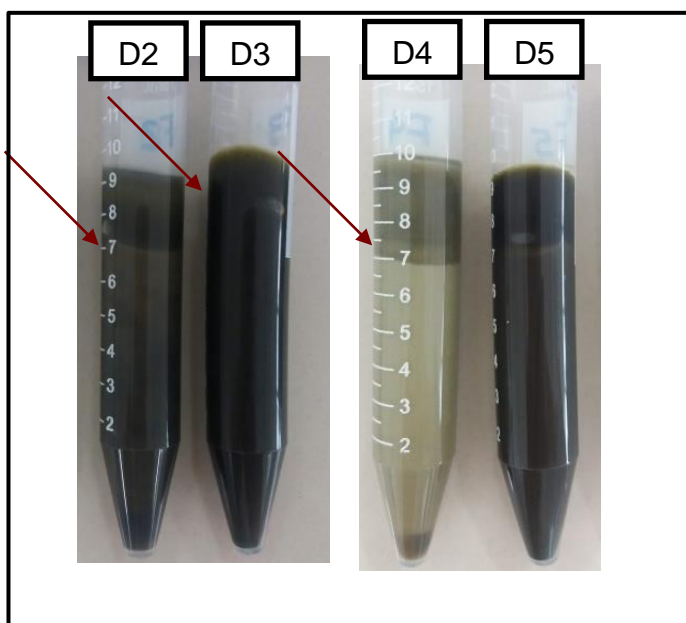


**Figura 24:** Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote B. Legenda: **B4:** BZF+ MnEF 5%; **B5:** BZF+ MnEF 10%; **B9:** BZF+OCM+ MnEF 10%; **B10:** BZF+OCM ; **B11:** BZF. Fonte: autoria própria.



**Figura 25:** Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote C. Legenda: **C4:** BZF+ MnEEB 5%; **C5:** BZF+ MnEEB 10%; **C8:** BZF+OCM+ MnEEB 5%; **C9:** BZF+OCM+ MnEEB 10%; **C10:** BZF+COM; **C11:** BZF. Fonte: autoria própria.





**Figura 26:** Alterações macroscópicas nas formulações após ciclos de gelo/degelo – Lote D. Legenda: **D2:** MnEEB 5%; **D3:** MnEEB 10%; **D4:** OCM+ MnEEB 5%; **D5:** OCM+ MnEEB 10%. Fonte: autoria própria.

A Tabela 11 (página 88) reúne a avaliação dos parâmetros organolépticos após o estudo de estabilidade preliminar, que definiu 15 formulações a seguirem em avaliação no estudo.



**Tabela 11:** Parâmetros Organolépticos das formulações fotoquímicas em T<sub>12</sub>.

<b>Formulação</b>	<b>Composição</b>	<b>Teste</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>
<b>A1</b>	Emulsão-base 1	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>A2</b>	EB 1; MnEF 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>A3</b>	EB 1; MnEF 10%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>A4</b>	EB 1; BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>A5</b>	EB 1; BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%; MnEF 5%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>A6</b>	EB 1; BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%; MnEF 10%	C	M	N	N
		GD	IM	N	N
<b>B1</b>	Vitabase® (Emulsão-base 2)	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>B2</b>	EB 2; MnEF 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>B3</b>	EB 2; MnEF 10%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>B4</b>	EB 2; BZF 7% MnEF 5%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>B5</b>	EB 2; BZF 5% MnEF 10%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>B6</b>	EB 2; OCM 5% MnEF 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>B7</b>	EB 2; OCM 5% MnEF 10%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>B8</b>	EB 2; OCM 5%; BZF 5% MnEF 5%	C	N	N	N
		GD	M	N	N
<b>B9</b>	EB 2; BZF 5%, OCM 5% MnEF 10%	C	M	N	N
		GD	M	N	N

(Continua)

(Continuação)

<b>B10</b>	EB 2; OCM 5%; BZF 5%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>B11</b>	EB 2; BZF 7%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>B12</b>	EB 2; OCM 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>C1</b>	Emulsão-base 3	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>C2</b>	EB 3; MnEEB 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>C3</b>	EB 3; MnEEB 10%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>C4</b>	EB 3; BZF 7 % MnEEB 5%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>C5</b>	EB 3; BZF 5% MnEEB 10%	C	M	N	N
		GD	IM	N	N
<b>C6</b>	EB 3; OCM 5% MnEEB 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>C7</b>	EB 3; OCM 5% MnEEB 10%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>C8</b>	EB 3; OCM 5%; BZF 5% MnEEB 5%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>C9</b>	EB 3; OCM 5%; BZF 5% MnEEB 10%	C	M	N	N
		GD	IM	N	N
<b>C10</b>	EB 3; OCM 5%, BZF 5%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>C11</b>	EB 3; BZF 7%	C	M	N	N
		GD	M	N	N
<b>C12</b>	EB 3; OCM 5%	C	N	N	N
		GD	N	N	N
<b>D1</b>	Emulsão-base 4	C	N	N	N
		GD	IM	N	N
<b>D2</b>	EB 4; MnEEB 5%	C	N	N	N

(Continua)

		(Continuação)			
		GD	IM	N	N
<b>D3</b>	EB 4; MnEEB 10%	C	N	N	N
		GD	IM	N	N
<b>D4</b>	EB 4; OCM 5% MnEEB 5%	C	N	N	N
		GD	IM	N	N
<b>D5</b>	EB 4; OCM 5% MnEEB 10%	C	N	N	N
		GD	IM	N	N
<b>D6</b>	EB 4; OCM 5%	C	N	N	N
		GD	IM	N	N

Legenda: BZF- Benzofenona; OCM- Octilmetoxicinamato; OX ZN- Óxido de Zinco; DIOX TIT- Dióxido de Titânio; MnEF- Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB- Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB1- Emulsão-base 1; EB2- Emulsão-base 2; EB3- Emulsão-base 3; EB4- Emulsão-base 4. Teste: C- Centrifugação; GD – Gelo/degelo; N- normal; M- modificado; IM- Intensamente modificado. Fonte: autoria própria.

Com relação à coloração e odor, todas as formulações preservaram seus aspectos iniciais da realização dos testes, sendo a coloração variando do branco (ausência de extrato), passando pelo bege claro (formulações contendo MnEF) até o verde escuro (formulações contendo MnEEB), conforme se aumentava a concentração de extrato bruto. O odor também correspondeu à presença do extrato.

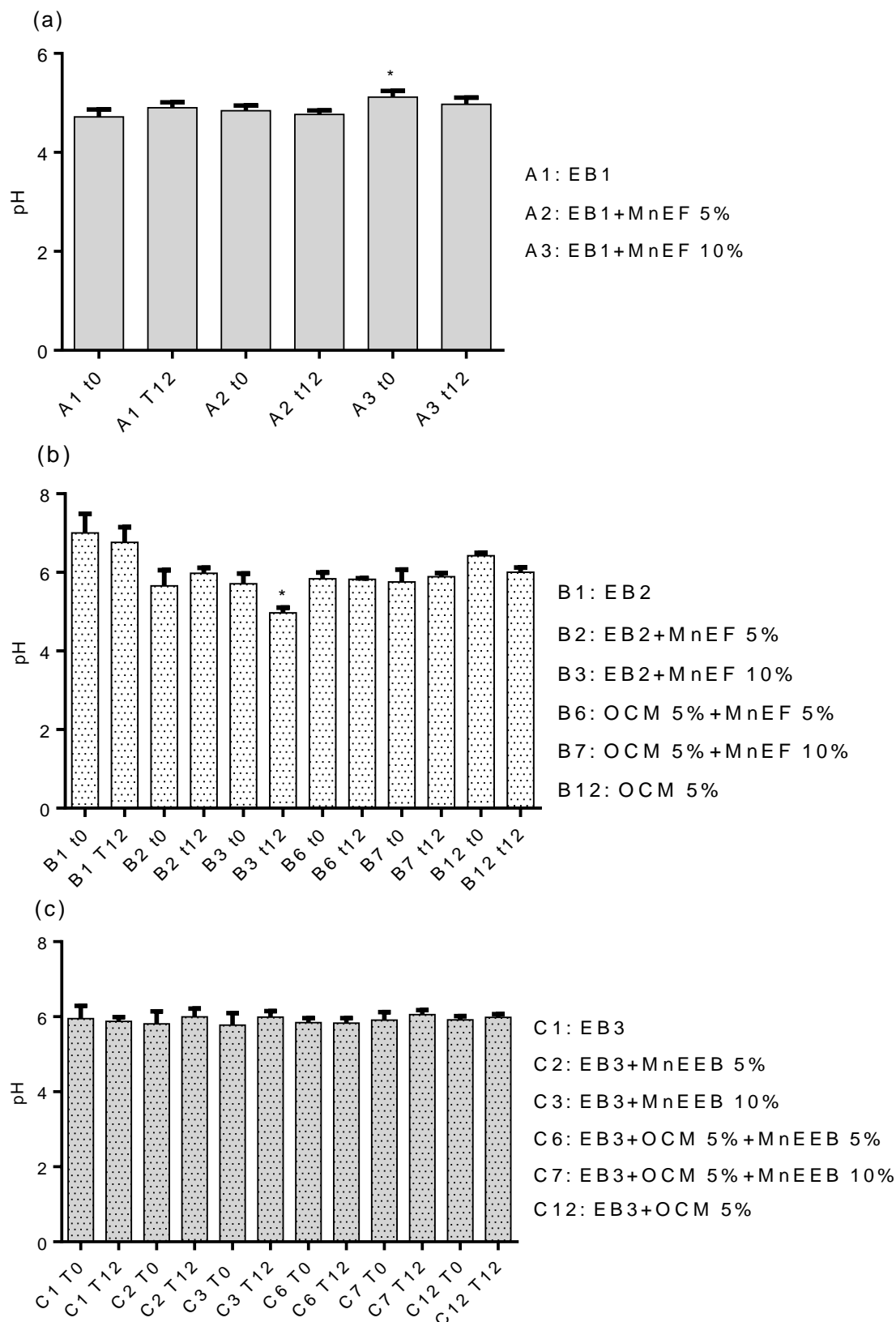
Todas as formulações com benzofenona-3 apresentaram certo grau de instabilidade, sugerindo que o componente afetou a integridade da formulação (GONÇALVES; SREBERNICH; SOUZA, 2011) e mediante a presença em maior quantidade do extrato, sobretudo em relação ao extrato bruto, verificou-se que a instabilidade foi maior. A benzofenona-3, mesmo sendo filtro UV de amplo espectro muito utilizado em formulações fotoprotetoras, em razão de sua apresentação, na forma de cristais dificultou sua incorporação na emulsão, sendo necessário aumentar o uso de solubilizantes. Já as formulações contendo octilmetoxicinamato (OMC) apresentaram boa estabilidade e conservaram os seus aspectos iniciais relativos ao tempo zero de formulação.

O OMC é amplamente utilizado como filtro UVB incorporado em todos os tipos de produtos tópicos, sendo compatível com a maioria das bases, aditivos e

princípios ativos utilizados em cosmética (VINHAL, 2012). Tem característica de lipossolubilidade e resistência à água e apresenta facilidade de incorporação por ser líquido, sendo utilizado em formulações em associação a outros filtros UVB para ampliar o potencial fotoprotetor.

A benzofenona-3 apresenta-se na forma de pó lipossolúvel em determinados emolientes líquidos (Isopropil Miristato, Triglicérides de Ácido Cáprico/Caprílico, Metil-Metacrilato e estearato de octila). Sua adequada solubilização é fundamental para sua atividade e evitar recristalização, e assim, a perda de sua ação. A benzofenona-3 por vezes também é solubilizada em filtros líquidos, a exemplo do OMC e salicilato de octila, como no caso do presente estudo. A cristalização pode ocorrer em razão de quantidades insuficientes de ésteres polares de ácidos graxos presentes nos emolientes e solventes para dissolver os cristais do filtro UV, ou quando esses agentes não desempenham seu papel de maneira esperada (JOHNCOCK, 2000).

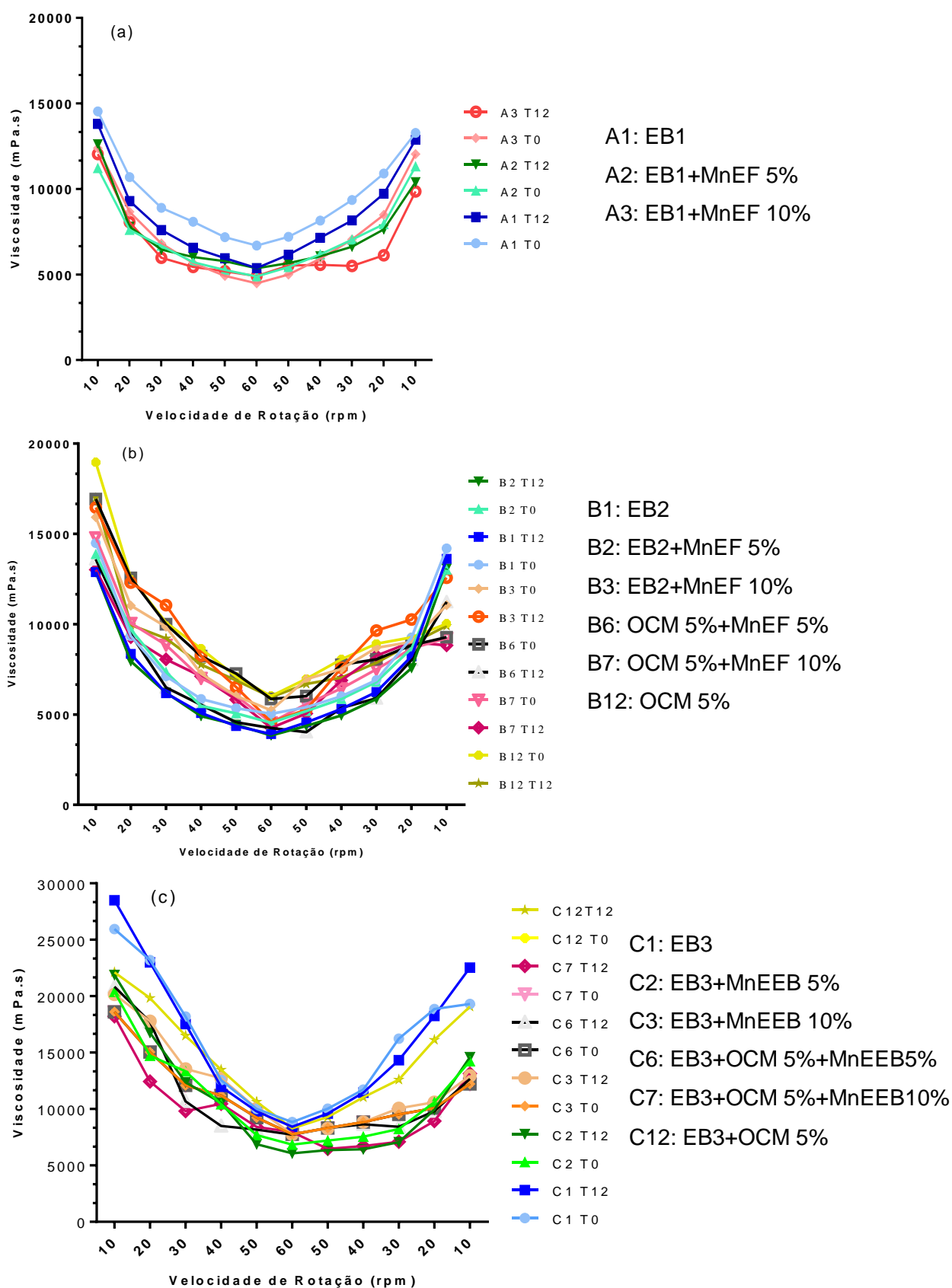
As formulações que se mantiveram estáveis após os ciclos de gelo/degelo foram então analisadas quanto ao pH, análise que considera como parâmetro o pH da pele, em torno de 4,5 e 6,0 (RIBEIRO et al., 2015). Valores de pH igual ou menor que 2,0 ou igual ou superior a 11,5 são considerados corrosivos e não devem ser avaliados (BRASIL, 2012). Verificou-se que o pH das formulações ficou dentro da faixa recomendada. Para as formulações do Lote A (Figura 27a) o mínimo valor obtido foi de  $4,71 \pm 0,15$  (base) e o máximo de  $5,12 \pm 0,12$  e o coeficiente de variação foi de 2,98%. Já para as emulsões do Lote B (Figura 27b) o máximo de  $7,00 \pm 0,48$  (base) e o mínimo valor de pH foi de  $4,97 \pm 0,13$  após a adição do extrato vegetal, com coeficiente de variação de 8,95%, sendo o maior entre as três formulações testadas. As formulações do Lote C (Figura 27c) apresentaram pH mínimo de  $5,77 \pm 0,32$  e máximo de  $6,05 \pm 0,12$ , sendo o coeficiente de variação de 2,87%. Observada diferença entre os valores após os ciclos de gelo e degelo, entretanto ainda dentro da faixa de pH biocompatível com a pele, indicando assim segurança nesse aspecto para uso.



**Figura 27:** Valores de pH inicial e final - formulações Lotes A (a), B (b) e C (c).  
 Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEF- Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB- Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB- Emulsão-base 1, 2; e 3. (\*) indica diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Uma importante propriedade mecânica dos fluidos é a viscosidade, responsável por sua resistência ao movimento. Quanto mais viscoso, mais difícil o escoamento e maior o coeficiente de viscosidade do fluido. A viscosidade não é um valor constante, mas depende da intensidade do cisalhamento, que depende ainda da amostra e forma de aplicação. O protetor solar geralmente é aplicado mais rapidamente e com mais força, sendo exposto a taxas de cisalhamento consideravelmente mais altas.

As formulações que se mantiveram estáveis após os ciclos de gelo/degelo foram submetidas à avaliação da reologia, constatando que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores inicial e final da viscosidade no período do estudo (Figura 28 a, b e c). Observa-se ainda que para o lote C (Figura 28c), a introdução de outros agentes emolientes (Cyclomethicone + Dimethicone Crosspolymer, Cyclopentasiloxane and Cyclopentasiloxane Dimethiconol) aumentou a fluidez do sistema e, por outro lado, a introdução do extrato vegetal bruto (MnEEB) aumentou a viscosidade da emulsão ( $p < 0,05$ ). Observa-se em todas as formulações que a viscosidade diminui à medida que a velocidade de rotação aumenta, comportamento esperado para este grupo de fluidos.



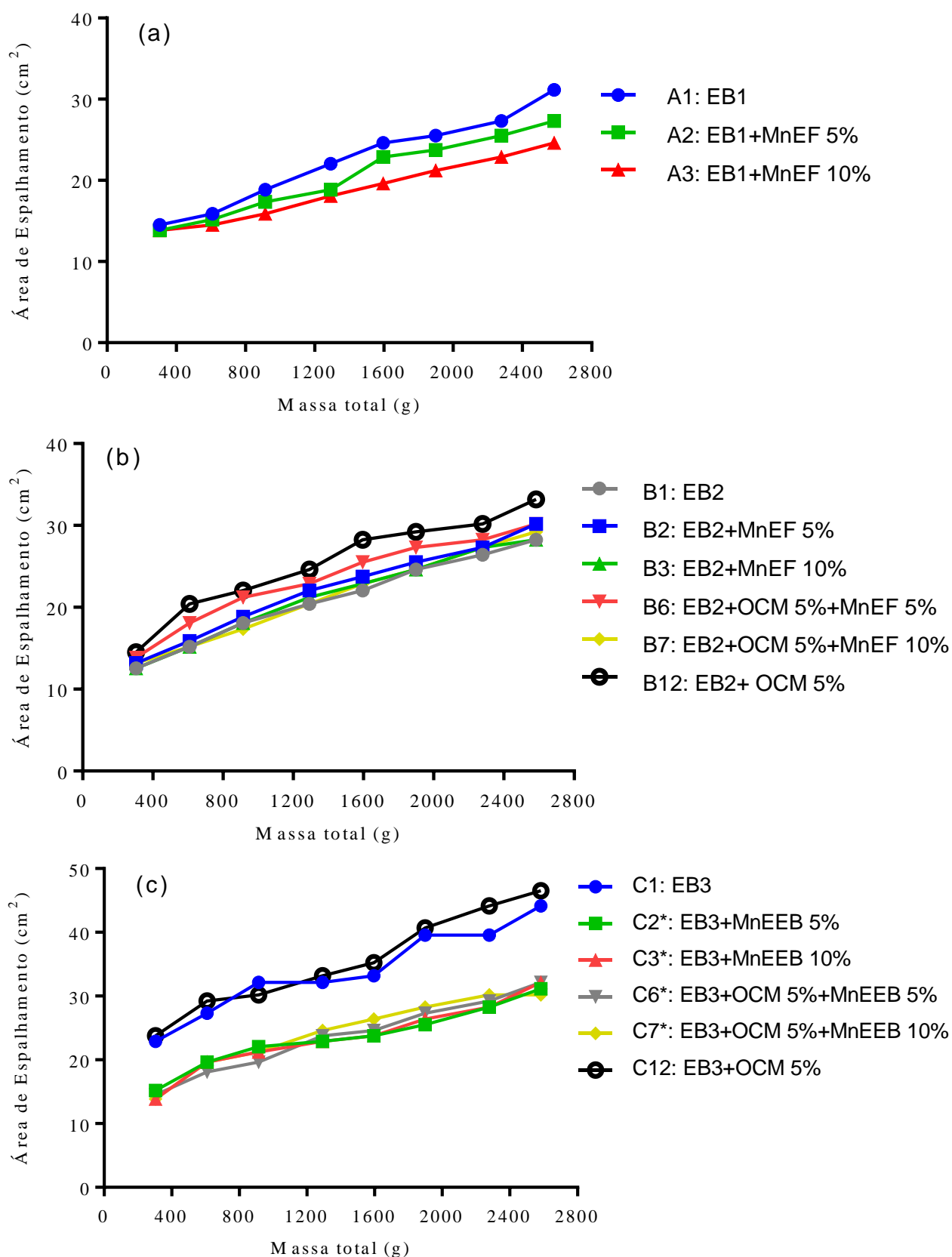
**Figura 28:** Viscosidade inicial e final - formulações Lotes A (a), B (b) e C (c). Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEF- Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB- Extrato etanólico bruto; EB- Emulsão-base (1, 2, 3). Fonte: autoria própria.

Observa-se que todas as emulsões apresentaram comportamento equivalente a fluidos não newtonianos pseudoplásticos. Assim, quando submetidas a uma tensão de cisalhamento ocorre uma orientação da fase dispersa na direção da força aplicada. A leitura é feita em força crescente e decrescente e a curva obtida, com picos no mínimo cisalhamento demonstra que as formulações apresentaram um comportamento com tendência de voltar à viscosidade inicial, característica de sistemas tixotrópicos.

A viscosidade da emulsão determina sua resistência ou fluidez para seu espalhamento por uma superfície. Assim, a viscosidade tem relação direta e inversa com a espalhabilidade, outra variável avaliada no estudo. Sendo assim, quanto mais baixa a viscosidade do produto, mais elevada é sua espalhabilidade e mais facilmente este pode ser espalhado.

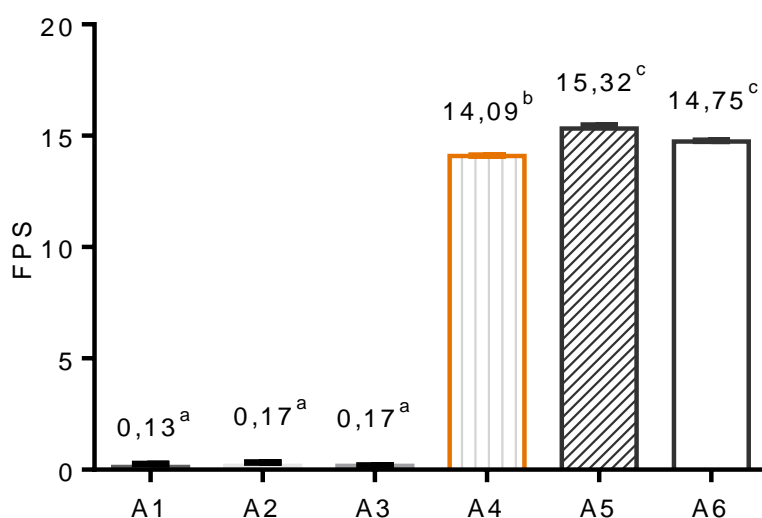
A Figura 29 (a, b, c) apresenta a espalhabilidade das formulações, sendo possível visualizar que conforme ocorre aumento da pressão submetida pela massa total, aumenta-se a área de espalhamento da formulação. Tal comportamento é esperado e mantém relação com a viscosidade observada anteriormente, constatando maior espalhabilidade para as formulações do Lote C (Figura 29c).





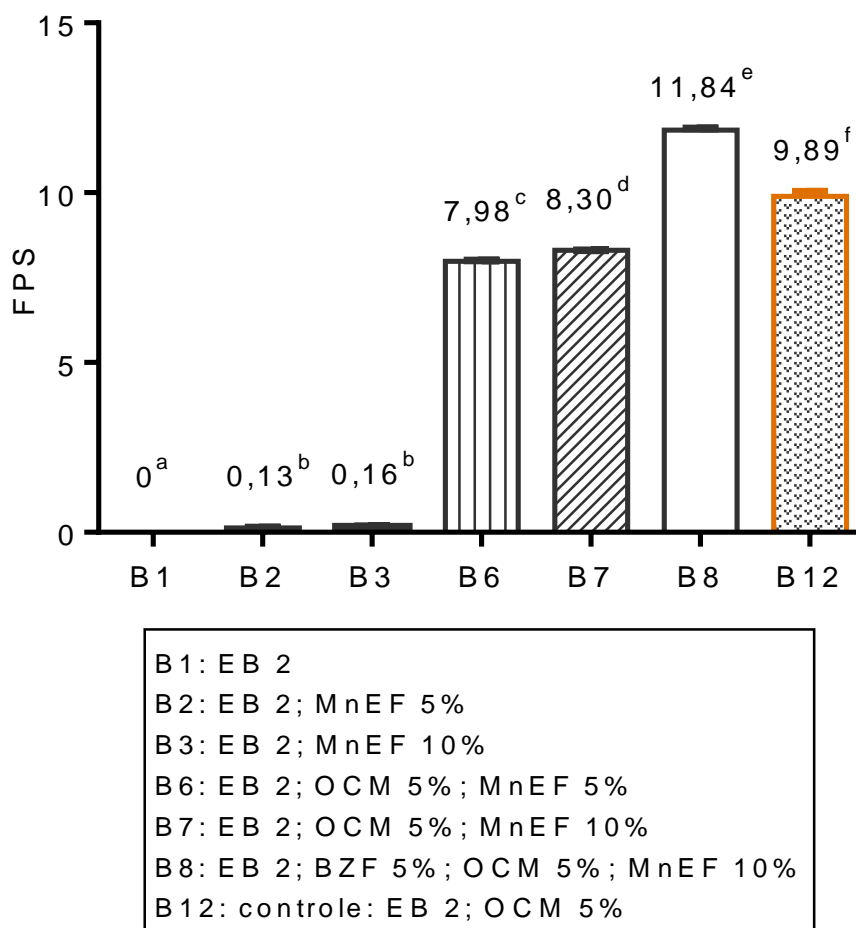
**Figura 29:** Espalhabilidade das formulações Lotes A (a), B (b) e C (c). Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEF- Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB- Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB- Emulsão-base (1, 2, 3). (\*) indica diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

A avaliação do FPS foi realizada segundo o método de Mansur et al. (1986) para todas as formulações. Analisando inicialmente o Lote A (Figura 30), composto pelas formulações com base aniônica Lanette WB e extrato fluido, observamos incremento de FPS de A4 para A5 conforme foi acrescentado MnEF na formulação, entretanto não foi observada diferença estatística entre as formulações acrescidas de extrato fluido a 5% e 10%. Fato que também se repetiu no Lote B (Figura 31), composto pelas formulações com Vitabase (EB2) e extrato fluido, quando verifica-se também aumento de FPS de B6 para B7, igualmente quando se elevou a quantidade de MnEF na formulação. Porém não houve incremento de FPS em comparação ao controle positivo.



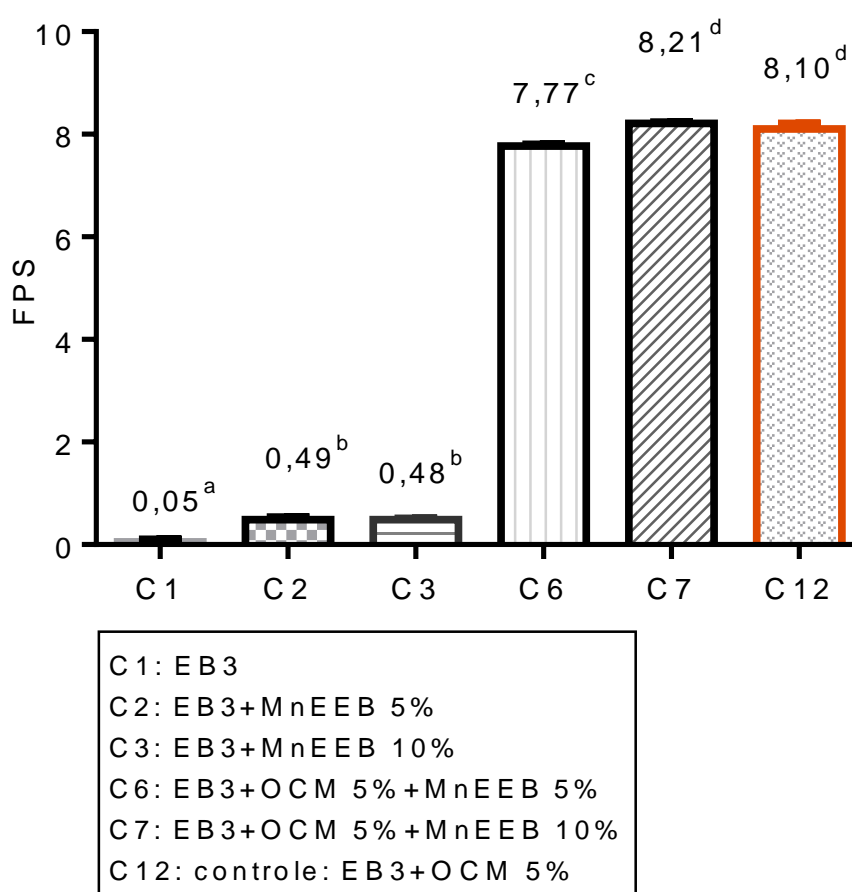
A1: EB 1
A2: EB 1; MnEF 5%
A3: EB 1; MnEF 10%
A4: controle: EB 1; BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2%
A5: EB 1; BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2% + MnEF 5%
A6: EB 1; BZF 7%; OCM 5%; OX ZN 2%; DIOX TIT 2% + MnEF 10%

**Figura 30:** Valores de FPS das formulações – Lote A. Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEF- Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; EB1- Emulsão-base 1; BZF- Benzofenona; OX ZN- Óxido de zinco; DIOX TIT- Dióxido de titânio. Letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

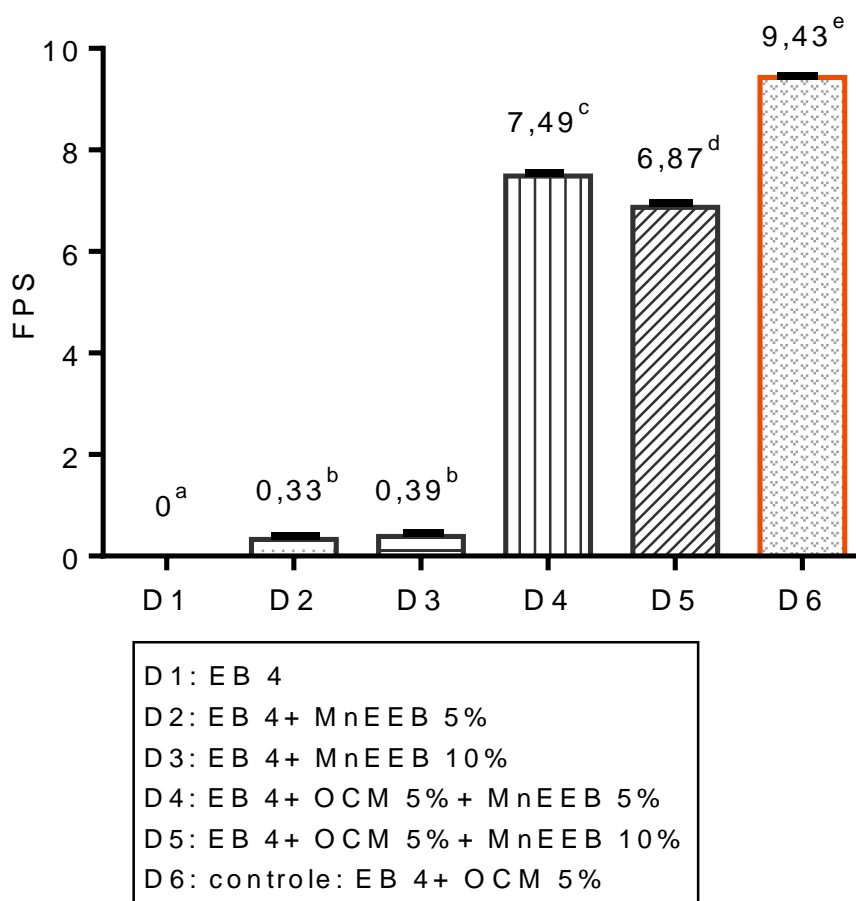


**Figura 31:** Valores de FPS das formulações – Lote B. Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEF- Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; BZF- Benzofenona; EB2- Emulsão-base 2. Letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Observando os valores do fator de proteção solar para as formulações do Lote C (Figura 32), aquelas feitas a base de tensoativo aniônico e MnEEB, verificamos novamente uma elevação no FPS mediante o aumento de extrato vegetal na formulação. Porém não observou-se diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em comparação ao controle composto apenas por filtros solares. Já para as formulações não iônicas acrescidas de MnEEB (Figura 33), percebe-se incompatibilidade entre os componentes quando da inclusão do extrato vegetal (D4 e D5) houve decréscimo do FPS.



**Figura 32:** Valores de FPS das formulações – Lote C. Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEEB- Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB3- Emulsão-base 3. Letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.



**Figura 33:** Valores de FPS das formulações – Lote D. Legenda: OCM- Octilmetoxicinamato; MnEEB- Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB4- Emulsão-base 4. Letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos para as formulações contendo a base e os extratos vegetais nas concentrações de 5% (A2, B2, C2 e D2) e 10% (A3, B3, C3 e D3) sem filtros UV demonstraram baixo potencial fotoprotetor. Os filtros solares naturais apresentam absorção consideravelmente baixa, devendo, portanto ser utilizados como potencializadores dos filtros sintéticos (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Os baixos índices de proteção solar UVB podem ocorrer devido à baixa concentração de moléculas com capacidade de absorver a radiação UV, conforme Violante et al. (2009) sugere. Outros estudos também encontraram valores baixos de FPS em extratos vegetais. Frações das folhas e flores da *Achillea millefolium* L. foram analisadas e obtiveram absorbâncias baixas na faixa de fotoproteção, não sendo efetivas para fotoproteção (SOUZA et al., 2005).

Com este entendimento, a presença de compostos ativos naturais estáveis frente à radiação UV é um ponto muito importante a ser considerado no processo de preparação de formulações fotoprotetoras. Muitas vezes, a estabilidade dos produtos é comprometida devido à necessidade de obtenção de um FPS elevado. Aumentando a quantidade de filtros na fórmula, aumenta-se o valor do FPS e consequentemente, dificulta a obtenção de formulações estáveis (RIBEIRO, 2010). Por isso, uma das maiores preocupações dos formuladores em relação aos fotoprotetores é a pesquisa de métodos para aumentar o FPS sem aumentar a quantidade de filtro solar, tornando o produto mais barato e com maior estabilidade (MILESI, 2002).

Os estudos preliminares de estabilidade permitiram concluir que os extratos apresentaram compatibilidade com as bases, exceto pela emulsão não iônica, que foi excluída do estudo. Há que se considerar, entretanto que, para o extrato fluido, a maior presença de água está entre os fatores intrínsecos que mais predispõem a formulação a instabilidades, induzindo, por exemplo, incompatibilidades químicas por reações de hidrólise, ou por interações diversas entre os componentes da formulação que podem anular ou alterar a atividade inicial (BRASIL, 2012). É fundamental destacar tais pontos, sobretudo quando consideramos os extratos vegetais.

A tabela 12 reúne de maneira sumária os parâmetros avaliados na estabilidade das emulsões que mantiveram suas características macroscópicas preservadas após os testes preliminares realizados.

**Tabela 12:** Estabilidade preliminar e atividade fotoprotetora das formulações fitocosméticas.

Formulação	Teste	pH (média ± DP)	Características organolépticas			FPS <i>in vitro</i> (média ± DP)
			Cor	Aspecto	Odor	
A1 (emulsão base 1)	C	4,72 ± 0,15	B	N	C	0,13 ± 0,13 <sup>a</sup>
	GD	4,90 ± 0,10	B	N	C	
A2 (EB 1+MnEF5%)	C	4,84 ± 0,11	VC	N	C	0,17 ± 0,15 <sup>a</sup>
	GD	4,77 ± 0,08	VC	N	C	
A3 (EB 1+MnEF10%)	C	5,12 ± 0,12	VC	N	C	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>
	GD	4,97 ± 0,14	VC	N	C	
B1 (Vitbase®)	C	7,00 ± 0,48	B	N	C	0 <sup>a</sup>
	GD	6,32 ± 6,76	B	N	C	
B2 (Vitbase®+ MnEF5%)	C	5,66 ± 0,40	VC	N	C	0,18 ± 0,06 <sup>a</sup>
	GD	5,97 ± 0,14	VC	N	C	
B3 (Vitbase®+ MnEF10%)	C	5,71 ± 0,26	VC	N	C	0,26 ± 0,06 <sup>a</sup>
	GD	5,99 ± 0,31	VC	N	C	
B6 (Vitbase®+ MnEF5%+OCM5%)	C	5,83 ± 0,16	VC	N	C	7,98 ± 0,01 <sup>b</sup>
	GD	5,87 ± 0,10	VC	N	C	
B7 (Vitbase®+ MnEF10%+OCM5%)	C	5,76 ± 0,31	VC	N	C	8,30 ± 0,00 <sup>c</sup>
	GD	5,89 ± 0,10	VC	N	C	
B12 (Vitbase®+ OCM5%)	C	6,42 ± 0,08	B	N	C	9,89 ± 0,13 <sup>d</sup>
	GD	6,01 ± 0,12	B	N	C	
C1 (emulsão base 3)	C	5,95 ± 0,34	B	N	C	0,05 ± 0,05 <sup>a</sup>
	GD	5,87 ± 0,11	B	N	C	
C2 (EB 3+MnEEB5%)	C	5,91 ± 0,18	VM	N	C	0,49 ± 0,04 <sup>e</sup>
	GD	6,00 ± 0,22	VM	N	C	
C3 (EB 3+MnEEB10%)	C	5,78 ± 0,32	VE	N	C	0,48 ± 0,02 <sup>e</sup>
	GD	5,99 ± 0,17	VE	N	C	

(Continua)

(Continuação)

<b>C6</b> <b>(EB 3+</b> <b>MnEEB5%+OCM5%)</b>	<b>C</b>	<b>5,84 ± 0,12</b>	<b>VM</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>7,77 ± 0,02<sup>f</sup></b>
	<b>GD</b>	<b>5,83 ± 0,13</b>	<b>VM</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	
<b>C7</b> <b>(EB 3+</b> <b>MnEEB10%+OCM5%)</b>	<b>C</b>	<b>5,91 ± 0,21</b>	<b>VE</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>8,21 ± 0,02<sup>g</sup></b>
	<b>GD</b>	<b>6,06 ± 0,12</b>	<b>VE</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	
<b>C12</b> <b>(EB 3 +OCM5%)</b>	<b>C</b>	<b>5,91 ± 0,10</b>	<b>B</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>8,10 ± 0,10<sup>g</sup></b>
	<b>GD</b>	<b>5,98 ± 0,09</b>	<b>B</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	

Legenda: C: Centrifugação; GD: ciclo gelo/degelo; B: branco; VC: verde claro; VM: verde musgo; VE: verde escuro; N - normal; C: característico. OCM: Octilmetoxicinamato; MnEF: Extrato fluido hidroalcoólico de *M. nigra*; MnEEB: Extrato etanólico bruto de *M. nigra*; EB- Emulsão-base (1, 2, 3). Valores expressos em média ± DP (n=3). Na mesma coluna, letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

Em razão do incremento no FPS, associado à melhor viscosidade, pH e melhor compatibilidade com o extrato bruto, foram escolhidas as emulsões aniônicas do Lote C como base. Por sua vez, a opção pelo MnEEB considera que a menor quantidade de solventes reduz o risco de toxicidade dérmica, contaminações microbiológicas e instabilidades diversas.

A eficácia do protetor solar está ligada ao seu potencial de proteção solar e também à sua capacidade antioxidante, ampliando assim as funções do produto e garantindo sua qualidade e maior vida útil, uma vez que irá atuar inibindo os danos causados pelos radicais livres e a complexação com metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). É fato que os resultados da análise da estabilidade preliminar não são absolutos, mas representam probabilidade de sucesso (BRASIL, 2004), assim as formulações propostas têm papel importante nas atividades estudadas, apresentando potencialidade para uso. E pensando em tais potencialidades, foi elaborada nova formulação fitocosmética a partir da incorporação de MnEEB na emulsão base 3.

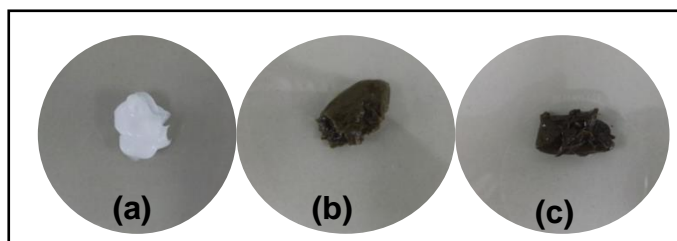


#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Para o estudo de estabilidade acelerada, foram selecionados a emulsão aniônica base 3 e o MnEEB, considerando que estes demonstraram melhor compatibilidade e atividade durante os ensaios prévios.

##### 4.4.1 Parâmetros organolépticos

No tempo zero (Figura 34), as emulsões mostraram estabilidade macroscópica, tendo aspecto brilhante e com odor característico da presença do extrato, a cor variou entre branco opaco (base - Figura 34a), verde musgo (FMn 10% - Figura 34b) e verde escuro (FMn 20% - Figura 34c), conforme presença em maior quantidade de extrato bruto de *Morus nigra*.

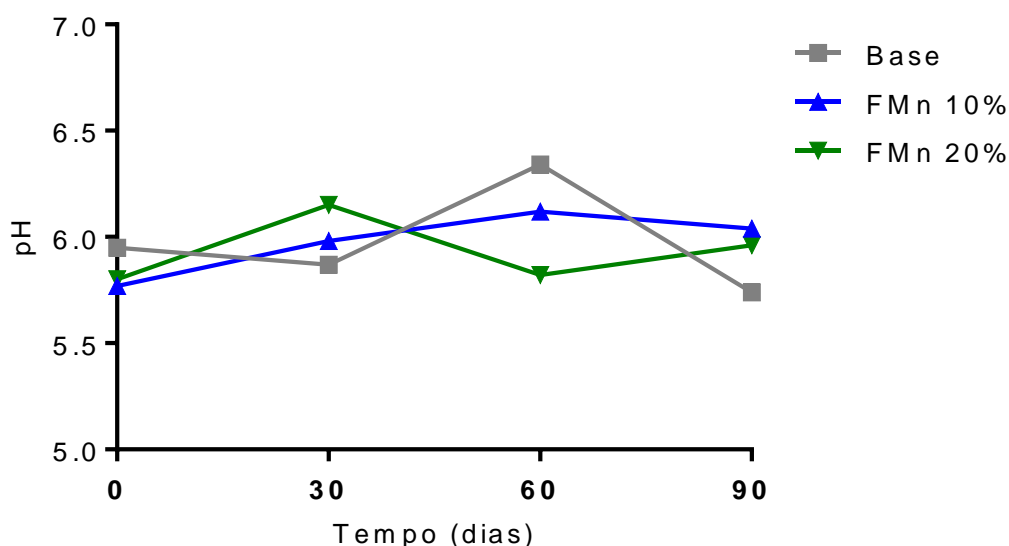


**Figura 34:** Parâmetros organolépticos das formulações com atividade antioxidante em T<sub>0</sub>. (a) base; (b) FMn 10%: fitocosmético contendo 10% de MnEEB; (c) FMn 20%: fitocosmético contendo 20% de MnEEB. Fonte: autoria própria.

Após a centrifugação, as emulsões preservaram suas características originais, procedendo-se então com o estudo de estabilidade acelerada. As amostras armazenadas em temperatura ambiente e em geladeira preservaram suas características iniciais durante todo período de avaliação, porém, a amostra armazenada à estufa, a partir do 40º dia apresentou gotículas na sua superfície, indicando início de separação de fases. Tal alteração foi considerada leve mudança e desta forma permaneceu até o final do estudo, não sendo agravada e retornando ao seu estado inicial quando a amostra foi colocada em temperatura ambiente. As demais características de coloração e odor foram preservadas, mantidas sem alteração durante todo o processo de análise.

#### 4.4.2 Estabilidade acelerada de fitocosmético.

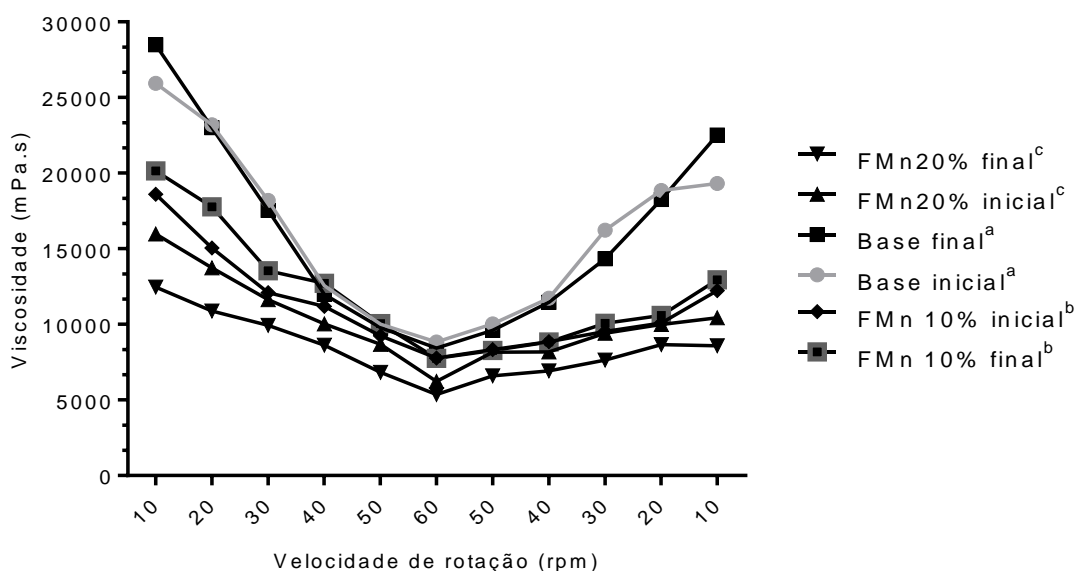
A análise do pH foi realizada nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias (Figura 35), não sendo observadas variações significativas que afetassem a qualidade geral das emulsões. Os valores observados ficaram em torno 6,0, indicando biocompatibilidade com a pele e potencialmente não irritante, considerando tal aspecto (ISAAC et al., 2008). O pH da base variou entre 5,74 e 6,34, representando 4,32% de variação, já a formulação acrescida de 10% de extrato bruto apresentou pH entre 5,77 e 6,12, com coeficiente de variação de 2,51% e a formulação com extrato bruto a 20% obteve valores de pH entre 5,80 e 6,15, com variação de 2,72%. Assim como nos valores de pH, na análise da viscosidade das formulações (Figura 36) não foram observadas mudanças significativas no decorrer do tempo ( $p > 0,05$ ), sendo aspectos importantes no caminho da segurança do produto.



**Figura 35:** Valores de pH em função do tempo de fitocosméticos. FMn 10%: fitocosmético contendo 10% de MnEEB; FMn 20%: fitocosmético contendo 20% de MnEEB. Não houve diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

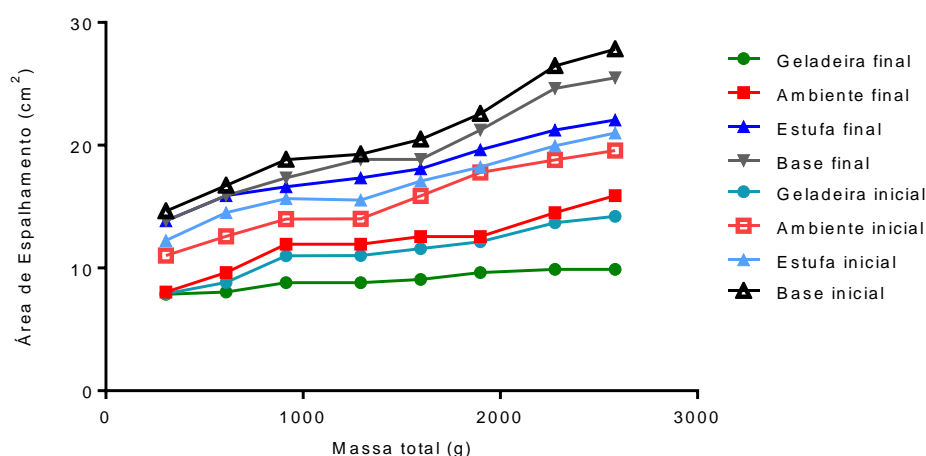
O comportamento reológico avalia a aplicação do produto cosmético, sendo fundamental para sua aceitabilidade e para que este, formando uma camada uniforme sobre a pele, possa desempenhar adequadamente seu papel. Medições em oscilação, por meio das curvas de viscosidade, estimam o comportamento do

fluxo e sua capacidade de propagação quando submetido a uma tensão. A figura 36 demonstra que a introdução do extrato vegetal bruto reduziu a fluidez da emulsão, como esperado. Observa-se por meio da curva a tendência de retorno à viscosidade inicial, comportamento esperado para este grupo de fluidos.



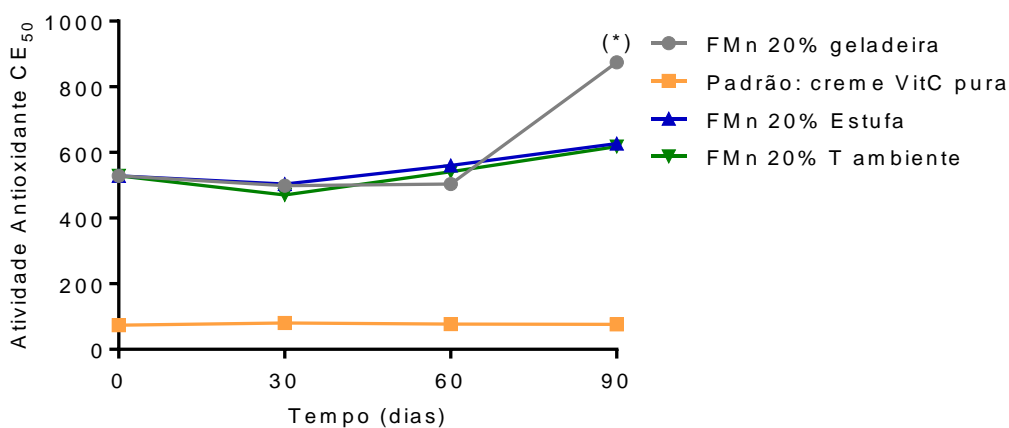
**Figura 36:** Viscosidade inicial e final de fitocsméticos. FMn 10%: fitocsmético contendo 10% de MnEEB; FMn 20%: fitocsmético contendo 20% de MnEEB. Letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

A avaliação da espalhabilidade das formulações (Figura 37) mostrou diferenças entre as condições de armazenamento, porém o fator tempo não alterou significativamente ( $p > 0,05$ ). Espalhabilidade maior foi observada na base, sendo a inclusão do extrato bruto fator que reduziu a variável, conforme esperado. Maiores diferenças estatísticas foram observadas entre as amostras armazenadas sob 4 °C (geladeira) no tempo final em comparação à base e à estufa. A espalhabilidade na amostra armazenada em temperatura ambiente não apresentou diferença estatística significativa, aspecto importante a ser verificado e que corrobora para facilitar o armazenamento e uso do produto.



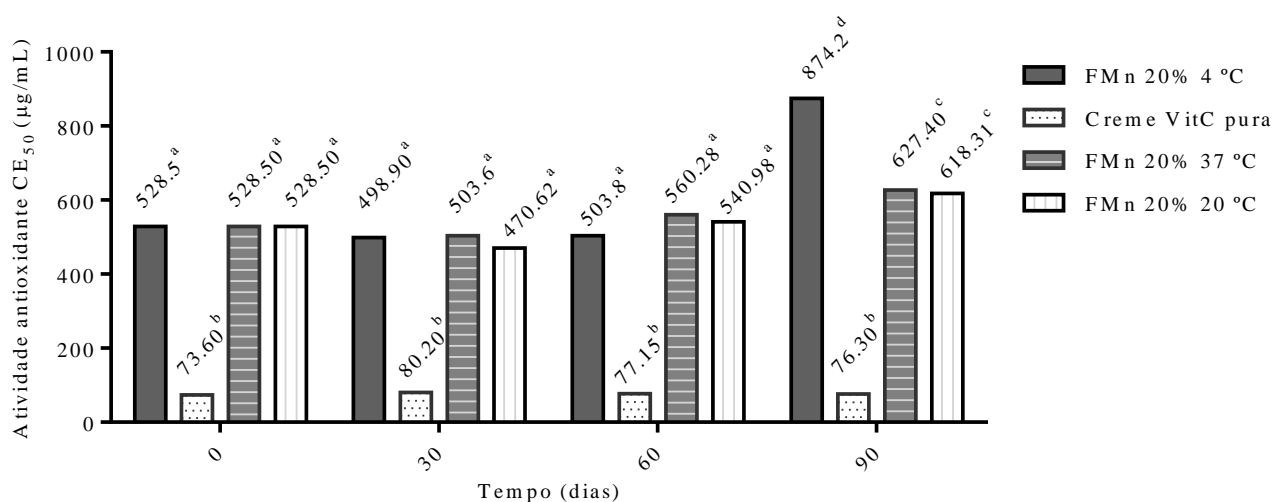
**Figura 37:** Espalhabilidade de fitocosméticos em função do tempo e da temperatura. Fonte: autoria própria.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada por meio do ensaio de DPPH, radical livre que por meio da interação com substâncias antioxidantes, pode ser 'neutralizado' (BENITES et al., 2015). Assim, após a incorporação do extrato vegetal, as formulações foram monitoradas em função do tempo e das condições de armazenagem e comparadas a controle positivo (creme contendo vitamina C pura), sendo os resultados apresentados nas Figuras 38 e 39. Observa-se que o fator temperatura não exerceu interferência inicialmente na atividade antioxidante das formulações, não havendo diferença estatística entre os valores, entretanto a última verificação, correspondente ao 90º dia, observa-se queda na atividade antioxidante da amostra armazenada em geladeira (Figura 39).



**Figura 38:** Atividade antioxidante de fitocosméticos em função do tempo e da temperatura. FMn 20%: fitocosmético contendo 20% de MnEEB. Legenda: (\*) indica diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

As amostras apresentaram  $CE_{50}$  inicial de 528,50  $\mu\text{g/mL}$  e ao final do estudo as amostras apresentaram 618,31  $\mu\text{g/mL}$  em temperatura ambiente e 627,40  $\mu\text{g/mL}$  de  $CE_{50}$  para a amostra armazenada em estufa, concentração superior, quando em comparação ao controle positivo que apresentou 73,60  $\mu\text{g/mL}$  de  $CE_{50}$ , porém, é importante destacar que o controle adotado possui elevado teor de ácido ascórbico na forma pura e solúvel em associação à vitamina E, que potencializa a ação antioxidante. Também vale destacar que ao longo dos 90 dias não foram observadas alterações significativas na atividade antioxidante, exceto pela amostra em geladeira na última verificação, ao final do estudo (figura 39).

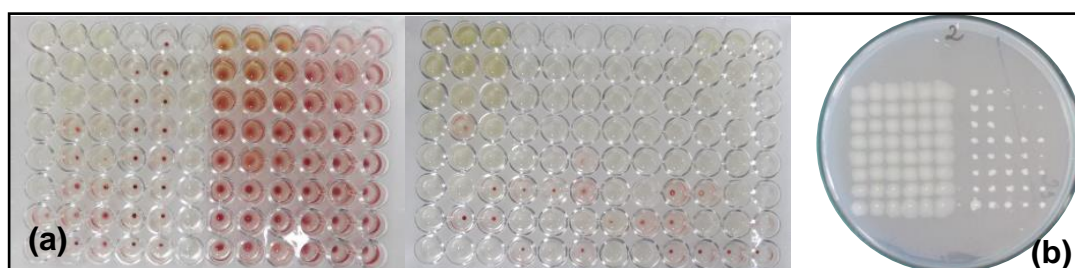


**Figura 39:** Atividade antioxidante  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de fitocósméticos em função do tempo e da temperatura. FMn 20%: fitocósmético contendo 20% de MnEEB. Letras iguais indicam não haver diferença estatística após análise ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: autoria própria.

É importante salientar ainda que o veículo utilizado não apresentou atividade antioxidante, mediante ensaio realizado, apesar de apresentar pequena quantidade de agente antioxidante em sua formulação (0,05% de BHT). Portanto, observa-se que a atividade apresentada deu-se em razão da presença do extrato e seus ativos, demonstrando potencial a ser explorado, sobretudo, considerando a manutenção da atividade ao longo do estudo de estabilidade e observando que ela não foi afetada pela temperatura elevada. Uso de extratos com maiores teores de rutina e isoquercetina ou estas de forma isolada, para reduzir os efeitos da interação de excipientes, como também a associação dos compostos fenólicos com outras vitaminas são alternativas para elevar o poder antioxidante da formulação fitocósmética contendo extrato de folhas de *M. nigra*.

#### 4.4.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM e Concentração Bactericida Mínima – CBM.

Em sequência ao estudo de segurança das formulações, estas foram avaliadas no aspecto microbiológico, conforme recomenda a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Foi realizado ensaio de atividade antimicrobiana do extrato bruto e formulações, segundo a técnica de microdiluição que avaliou a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a mais baixa concentração de um produto responsável por limitar o crescimento visível de uma bactéria e ainda a concentração bactericida mínima (CBM), que por sua vez corresponde à concentração mínima de um agente antimicrobiano para causar a morte da bactéria (Figura 40).



**Figura 40:** Teste de Concentração Inibitória Mínima (a) e Concentração Bactericida Mínima (b) – MnEEB e formulações. Fonte: autoria própria.

Observa-se por meio da Tabela 13 que o extrato de *M. nigra* e formulações apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus MRSA* e *Salmonella choleraesuis*, sendo que o extrato bruto apresentou melhor atividade inibitória contra os três microrganismos, e nota-se que a base também apresentou capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos, porém, em quantidades mais elevadas. Com relação à concentração bactericida, percebe-se a melhor atividade do MnEEB, bem como das formulações, sobretudo com relação aos microrganismos *S. aureus MRSA* e *Salmonella choleraesuis*. Não houve atividade do extrato e formulações contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Serratia marcescens* e por esta razão não são apresentadas na tabela.

**Tabela 13:** Atividade antimicrobiana de MnEEB e formulações.

Microorganismos	CIM (mg/mL)				CBM (mg/mL)			
	MnEEB	Base	F10%	F20%	MnEEB	Base	F10%	F20%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,39	0,78	0,39	3,12	3,12	1,56	0,78	12,50
<i>S. aureus</i> MRSA	1,56	12,5	6,25	6,25	0,39	0,39	0,39	0,39
<i>Salmonella choleraesuis</i>	3,12	12,5	6,25	6,25	0,78	0,39	0,19	0,19

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima CBM: Concentração Bactericida Mínima; MnEEB: extrato etanólico bruto de *M. nigra*; F10%: base+ MnEEB 10%; F20%: base+ MnEEB 20%; (-) crescimento em todas as concentrações testadas. Fonte: autoria própria.

Os achados do estudo apresentam divergências com pesquisas anteriores que avaliaram atividade antimicrobiana de extrato etanólico bruto e frações de folhas de *M. nigra*. Estas observaram atividade bactericida do extrato etanólico bruto (Mn-EtOH) contra *B. cereus* e *E. faecalis*, bem como contra *E. coli*. A atividade inibitória contra *S. aureus* e *S. choleraesuis* foi alcançada em concentrações mais elevadas (12,50 mg/mL para ambos). A fração hexânica também foi eficaz contra o crescimento de *B. cereus* e *E. faecalis*, inibindo ainda o crescimento de *E. coli*, *S. choleraesuis* e *S. marcescens* em concentrações de 3,12 mg/mL (SOUZA et al., 2018).

Tais diferenças podem ocorrer em razão de variações diversas na realização dos testes, por exemplo diferentes tamanhos de inóculo bacteriano, volume e tipo de caldo ou ágar, tamanho dos poços, período de incubação, dentre outros fatores. Assim, a padronização por meio de diretrizes é o caminho para a redução no número de conflitos (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Historicamente, os flavonoides têm sido usados em preparações para o tratamento de doenças diversas, inclusive infecciosas. Neste sentido, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de comprovar a atividade antimicrobiana de

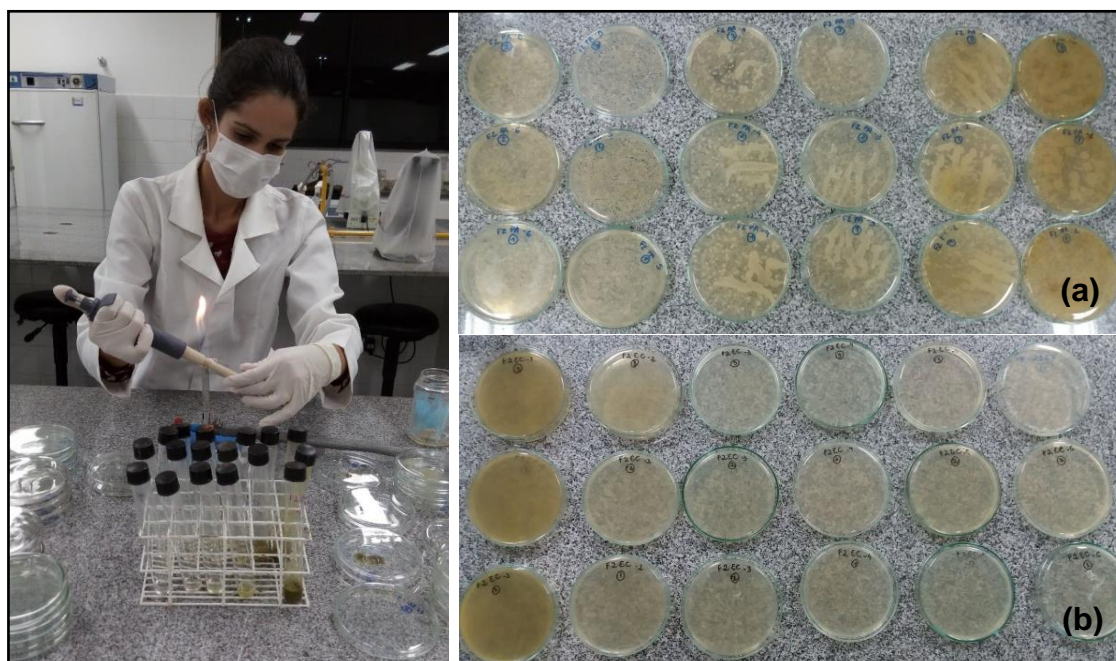
extratos vegetais, a exemplo da própolis, além da pesquisa com flavonoides específicos, a exemplo de apigenina (SATO et al., 2000), naringenina, quercetina, 3-O-metilquercetina e vários glicosídeos de quercetina (RAUHA et al., 2000), por exemplo.

#### 4.4.4 Teste de Desafio do Sistema Conservante (*Challenge Test*)

O princípio do teste de desafio do sistema conservante (Figura 41) é a contaminação proposital da amostra com microrganismos específicos, realizando avaliação em intervalos de tempo definidos no período de 28 dias, garantindo assim a segurança do produto no parâmetro eficácia do sistema conservante. Os conservantes utilizados nas formulações devem estar em acordo com o estabelecido na RDC nº 29/2012 (ANVISA, 2012a). O método adotado para o desenvolvimento do teste e sua análise seguiu os parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) e Guia ABC de Microbiologia (ABDI, 2015), conforme recomenda legislação.

Desta forma, foram estabelecidos os critérios de comprovação da eficácia de conservantes para emulsões classificadas na Categoria 2, que enfoca produtos de uso tópico, em base aquosa, produtos não estéreis e emulsões, incluindo as de aplicação em mucosas, e para as bactérias foi considerado 99,9% de redução (3 Log) de bactérias em 7 dias, para cada desafio, com redução ou não-crescimento posterior, pelo tempo do teste (ABDI, 2015). Foi considerada ainda a Resolução nº 481/1999 (ANVISA, 1999) que estabelece os Parâmetros de Controle Microbiológico para os Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, alinhada à Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) que apresentam os limites de aceitabilidade como sendo ausência de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* em 1 g ou 1 mL e limite máximo de  $10^2$  bactérias Gram negativa em 1 g ou 1 mL.





**Figura 41:** Challenge Test– MnEEB e formulações. (a) dia 0: contaminação proposital; (b): a partir do dia 07: ausência de unidades de colônia. Fonte: autoria própria.

Foram utilizadas cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, conforme procedimento descrito previamente. Os resultados apresentados na Tabela 13 e são expressos em UFC/mL. Observa-se no tempo zero a elevada carga microbiana nas amostras, fato que ocorre dada a contaminação intencional e o curto período de contato com o conservante da formulação. Já a partir do sétimo dia verifica-se redução/ausência de colônias, fato que se repetiu nas verificações dos dias 14 e 28, indicando assim que o sistema conservante foi capaz de destruir todos os microrganismos, obedecendo aos parâmetros estabelecidos para o teste.

**Tabela 14:** Teste de desafio do sistema conservante - contagem de carga microbiana em placas aeróbias - período: 28 dias.

	Tempo (dias)			
	0	7	14	28
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)				
<b>FMn10%</b>	1,87 . 10 <sup>-7</sup>	< 1	< 1	< 1
<b>FMn20%</b>	0,98 . 10 <sup>-7</sup>	< 1	< 1	< 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/mL)				
<b>FMn10%</b>	2,83 . 10 <sup>-7</sup>	< 1	< 1	< 1
<b>FMn20%</b>	2,56 . 10 <sup>-7</sup>	< 1	< 1	< 1
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)				
<b>FMn10%</b>	1,49 . 10 <sup>-7</sup>	< 1	< 1	< 1
<b>FMn20%</b>	2,32 . 10 <sup>-7</sup>	< 1	< 1	< 1

Legenda: UFC: unidade formadora de colônia; MnEEB: extrato etanólico bruto de *M. nigra*; FMn10%: base+ MnEEB 10%; FMn20%: base+ MnEEB 20%; Fonte: autoria própria.

Por meio do *Challenge Test* é possível determinar a resistência de um produto ou material à contaminação microbiana, observando se o sistema conservante foi eficaz. Os resultados do controle microbiológico das formulações demonstraram a estabilidade microbiológica das amostras, sendo aspecto importante na segurança para o uso, aliado aos demais aspectos avaliados na estabilidade acelerada, reforçam a potencialidade do produto.

Os produtos naturais são fontes importantes de pesquisa em novos compostos ativos, permitindo descobrir mecanismos biológicos e moléculas ativas a serem incorporadas em formulações tópicas. Da mesma forma, deve-se considerar mercados diversificados em expansão composto por consumidores cada vez mais preocupados com sustentabilidade e uso de substâncias menos agressivas.

# *Conclusão*

---

## 5 CONCLUSÃO

É fundamental ressaltar a importância do estudo, desenvolvido localmente e dando seguimento a um conjunto de estudos desenvolvidos também em âmbito local com a *Morus nigra*. A pesquisa possibilitou a articulação de diversos saberes e áreas da ciência que entrelaçadas permitiram o seu acontecimento e dentre as conclusões da pesquisa, destacam-se as seguintes:

- Foi possível obter extratos vegetais a partir das folhas de *M. nigra* pelo método de maceração com solução hidroalcoólica: extrato fluido (MnEF) e extrato bruto (MnEEB);
- A análise dos aspectos químicos dos extratos vegetais permitiu confirmar a presença de compostos fenólicos, dentre outros metabólitos, com a identificação e quantificação de rutina e isoquercetina;
- Ficou confirmada a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos vegetais de *M. nigra* e sua compatibilidade e estabilidade com tensoativos aniônicos;
- Foi observado ainda potencial fotoprotetor *in vitro* de extratos vegetais de *M. nigra*, porém a incorporação dos extratos em formulações não incrementou a atividade fotoprotetora inicial em comparação ao controle positivo;
- Foi possível incorporar extrato etanólico bruto de *M. nigra*, obtendo-se formulações fitocosméticas com atividade antioxidante, com manutenção da atividade das amostras mantidas em temperatura ambiente e em estufa;
- O fitocosmético desenvolvido manteve suas características preservadas nos ensaios de estabilidade preliminar e acelerada;
- O teste de desafio de eficácia do sistema conservante confirmou a estabilidade microbiológica do fitocosmético;
- Observou-se ainda atividade antimicrobiana do extrato e formulações contra as cepas de *S. aureus*, *S. aureus MRSA* e *Salmonella choleraesuis*.

Dentre as principais contribuições do estudo destaca-se a possibilidade de dar continuidade ao desenvolvimento do produto, uma vez que o estudo de pré-formulação demonstrou a compatibilidade dos componentes. Dentre as perspectivas futuras fica a otimização da atividade antioxidante do produto, com a utilização de extratos padronizados com maiores teores dos compostos fenólicos e associação com outros componentes, a exemplo de vitaminas.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

ABDI. AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL. **Guia de Microbiologia**, 2015.

AKHALAYA, M. Y. et al. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. **Ageing Research Reviews**, v. 16, p. 1-11, 2014.

AKHTAR, N. et al. Cosmetic application of phenolic cream from mulberry bark extract. **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 1805–1808, 2012.

ALMEIDA CINCOTTO, M. G. J. **Extrato de folhas de *Morus nigra* L.:** prospecção de novo ativo e sua aplicação em produto cosmetodermatológico. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2016.

ALMEIDA, J.R.G.S. et al. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n.1, p. 96-100, 2011.

ALMEIDA, P. A. et al. Studies with emulsion containing *trans-resveratrol*: *in vitro* release profile and *ex vivo* human skin permeation. **Current Drug Delivery**, v. 12, n. 2, p. 157-165, 2015a.

ALMEIDA, P. A. et al. Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 28–34, 2015b.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANVISA. **Resolução - RDC Nº 69, DE 23 DE MARÇO DE 2016** (Publicada em DOU nº 57, de 24 de março de 2016) Dispõe sobre o “Regulamento técnico mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes”. 2016.

ANVISA. **Monografia da espécie *Morus nigra* L. (Amoreira)**. v. 5, 2015a.

ANVISA. **Resolução - RDC Nº 7, DE 10 DE FEVEREIRO DE 2015** (Publicada no DOU nº 29, de 11 de fevereiro de 2015). Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. 2015b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC Nº 29, DE 1 DE JUNHO DE 2012** (Publicada em DOU nº 107, de 04 de junho de 2012). Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. 2012a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012**. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. 2012b Acesso em: 02 de maio de 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999**. Estabelece os Parâmetros de Controle Microbiológico para os Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Acesso em: 02 de fevereiro de 2019.

ARAUJO, M.E.M.B. **Avaliação das atividades antioxidantes e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de São Francisco, 2012.

ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n. 11, p. 1-7, 2008.

BABY, A. R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: Recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENITES, R.S.R. et al. (2015). Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 685-691. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.21313>.

BESSADA, S. M. F. **Caracterização química e bioatividade de *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.**: incorporação em formulações dermocosméticas de baixa toxicidade. 2015. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade) – Universidade de Porto, Porto, 2015.

BONINA, F., et al. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 87-94, 1996.

BOUYER, E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, n.1-2, p.359-378, 2012.

BRENNER, M.; HEARING, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology**. v. 84, n. 3, p. 539–549, 2008.

BRASIL. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2012.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. v. 2, Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. **Guia de estabilidade dos cosméticos**. 1. ed. Brasília: Anvisa, 2004.

BUKHARI, S. B. M. et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p.1901 – 1906, 2009.



BULLA, M.K. et al. Evaluation of Photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the *schinus terebinthifolius raddi* extract. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 3, p. 558–566, 2015.

CARVALHO, J. M. **Estudo comparativo dos quantum dots em meio aquoso e aplicação destes nanometais como sonda para determinação de rutina e quercetina**. 2014. Tese (Doutorado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

CASTELLI, V.C. et al. Desenvolvimento e estudo de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo cetoconazol 2%, **Acta scientiarum. Health sciences**, v. 30, n. 2, p. 121-128, 2008.

CASTRO, R. M L. **Emulsão**: uma revisão bibliográfica. 2014. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 2014.

CAVALCANTE, A. Y. P. et al. Effect of ovarian tissue storage in *Morus nigra* extract on the morphology and DNA fragmentation of ovine preantral follicles. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1973-1986, 2017.

CESTARI, T.F.; OLIVEIRA, F.B.; BOZA, J.C. Considerations on photoprotection and skin disorders. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 139 , p. 135-43, 2012.

CEFALI, L. C. **Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, 2009.

CHEN, C.; ZHOU, J.; JI, C. Quercetin: a potencial drug to reverse multidrug resistance. **Life Sciences**, v. 87, n. 11-12, p. 333-338, 2010.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. 9. ed. Pennsylvania, USA, 2012.

COCKELL, C. S.; KNOWLAND, J. Ultraviolet radiation screening compounds. **Biological reviews of the cambridge philosophical society**, v. 74, n. 3. p. 311-345, 1999.

CUSHNIE, T.; LAMB, A. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**. v.26, n. 5, p. 343-56, 2005.

DANTAS, A.C.S. et al. Acaricidal activity of leaves of *Morus nigra* against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.3, p.523-528, 2017.

DEHGHAN, G.; KHOSHKAM, Z. Tin(II)–quercetin complex: Synthesis, spectral characterization and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 131, p.422-426. 2012.

DEUSCHLE, V. C. K. N. et al. Physical chemistry evaluation of stability, spreadability, *in vitro* antioxidant, and photo-protective capacities of topical formulations containing *Calendula officinalis* L. leaf extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 63-75, 2015.

DEWANTO, V. et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, n. 10, p. 3010-3014, 2002.

D'LEON, L.F.P. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos, **Cosmetics & Toiletries**, v. 13, n. 4, p. 54-62, 2001.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH• **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DZIALO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

EBRAHIMZADEH, M. A. et al. “Correlation between Sun Protection Factor and Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Medicinal Plants .” **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 1041–1047, 2014.

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

FERREIRA, R. O. et al. Chemical constituents and *in vivo* antioxidant activity of flavonoids isolated of *Clusia lanceolata* (clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, n. 9, p.1093-1097, 2016.

FIUME, M. M. et al. Safety Assessment of *Vitis vinifera* (Grape)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 48S-83S, 2014.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.

FRANZOI, A.C.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I.C. Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poli (vinylpyrrolidone). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 47, n. 4-5, p. 973-977, 2008.

GENNARO, A.R. **Remington**: a ciência e a prática da farmácia. 20. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 759-763.

GODIC, A. et al. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GONÇALVES, G. M. S.; SREBERNICH, S. M.; SOUZA, J. A. M. Stability and sensory assessment of emulsions containing propolis extract and/or tocopheryl acetate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n. 3, p. 585-592, 2011.

GOUVEIA, B. B. et al. DNA damage and primordial follicle activation after *in vitro* culture of sheep ovarian cortex in *Morus nigra* leaf extract. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 85-92, 2019

GRAGNANI, A. et al. Review of Major Theories of Skin Aging. **Advances in Aging Research**, v. 03, n. 04, p. 265–284, 2014.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GUPTA et al. Development and validation of HPLC method- a review. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**. v. 2, n.4, 2012.

HAJJ, Y. EL et al. Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from *Cabernet Sauvignon* Grapes (*Vitis vinifera* L. cv. *Cabernet Sauvignon*). Optimization by Response Surface Methodology. **Food and Nutrition Sciences**, v. 03, n. 01, p. 89–103, 2012.

HEIJNEM, C.G. et al. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**. v. 36, n. 5, p. 575-581, 2002.

HERZI, S. et al. Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.441, p.489-495, 2014.

HUA TAN, Y; ABDULLAH, M.; NOLASCO-HIPOLITO, C. The potential of waste cooking oil-based biodiesel using heterogeneous catalyst derived from various calcined eggshells coupled with an emulsification technique: A review on the emission reduction and engine performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 47, p. 589-603, 2015.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMARA, D.B. Flavonois e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição dos alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Boletim ano 7, nº.3**, setembro/dezembro 2016. Disponível em: <https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSeDCRubPS9ptatni42BPUGFHCizVyCSq231caKDajOFIW6LxQ/viewform>.

JAZDZEWSKI, C. et al. **Beleza do século**. Cosaf Naify Edições: São Paulo, 2000.

JOHNSON, W. Interações de formulações com filtro solar. **Cosmetics & Toiletries**. v. 12, p. 40-50, 2000.

JÚNIOR, I. I. S. et al. Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

KAFKAS, S. et al. Molecular Characterization of Mulberry Accessions in Turkey by AFLP Markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 4, p. 593-597, 2008.

KHAN, S. S. R. et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1292, p. 123-135, 2009.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; CHANG, K-OK. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Research**, v. 88, n. 2, p. 227-235, 2010.

KIM, J.W. et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Tallahassee, v.1002, p.93-99, 2003.

KOMES, D. et al. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 167-176, 2010.

KUMAR, A. et al. *In vitro* antioxidant and phytochemical investigations of ethanolic extracts of *Viola serpens* and *Morus nigra*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 4, p. 166-171, 2011.

LANDIM, L. P. P. **Quantificação de flavonoides em extratos de *Dimorphandra gardneriana* e avaliação de propriedades antioxidantes e fotoestabilidade**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, 2012.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. 2. ed. São Paulo: Medfarma, 2008.

LIN, F. H. et al. Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 4, p. 826-32, 2005.

LIU, W. et al. Sunburn protection as a function of sunscreen application thickness differs between high and low SPFs. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 28, n. 3, p. 120-126, 2012.

LUCAS, R. et al. The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, p. 53-87, 2015.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MALIK, M.N.H. et al. Phytochemical analysis and cardiac depressant activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* L. fruit. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 2, n. 12, p. 39-41, 2012.

MALLHI, T.H. et al. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **Bangladesh Journal of Pharmacology**. v. 9, n. 1, p. 60-66, 2014.

MANSUR, M. C. P.P. R. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251-258, 2016.

MANSUR, J.S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 61, p. 121-124, 1986.

MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 120-130, 2001.

MERCURIO, D. G. et al. *In vivo* photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 153, p. 121-126, 2015.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**. v.18, n. 2, p. 81- 87, 2002.

MIN, K.; EBELER, S.E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 1, p. 96-104, 2008.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões com cristais líquidos acrescido de xantina para tratamento da lipodistrofia ginóide (celulite)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, SP, 2007.

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

NAIK, R. et al. Bioactive benzofuran derivatives: Moracins A-Z in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, n. 27, p. 379–393, 2015.

NIEOCZYM, D. et al. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 84, p. 50–58, 2014.

- NUMATA, Y.; TANAKA, H. Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy. **Food Chemistry**. v. 126, p. 751-755, 2011.
- OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. G. et al. In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 1, p. 122–127, 2013.
- OZRENK, K. et al. Molecular characterization of mulberry germplasm from *Eastern Anatolia*. **African Journal of Biotechnology**., v. 9, n. 1, p. 1-6, 2010.
- PADILHA, M. M. et al. Artigo Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta,. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 621–626, 2010a.
- PADILHA, M.M. et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytotherapy Research**. v. 24, n. 10, p.1496-1500, 2010b.
- PADILHA, M. M. **Estudo farmacognóstico , fitoquímico e farmacológico das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta )**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2009.
- PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
- PIEKARSKI, P. **Análise nutricional e fitoquímica de frutos da *Morus nigra* L .** 2013. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Nutricional) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT - Food Science and Technology**. v. 40, n.1, p. 1-11, 2007.
- PURIM, K. S. M.; LEITE, N. Fotoproteção e exercício físico. **Revista Brasileira de**



**Medicina do Esporte**, v.16, n.3, p. 224-229, 2010.

QUEIROZ, G.T. et al. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n.3-4, p. 816-822, 2012.

RADICE, M. et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. **Fitoterapia**, v. 114, p. 144-162, 2016.

RADOJKOVIĆ, M. et al. Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 117, p. 50-58, 2016.

RASCHE, W D. **Formulação e análise de gel-creme hidratante facial**. Artigo (Curso Técnico) – Curso Técnico em Química, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, nov. 2014.

RASUL, A.; AKHTAR, N. Formulation and *in vivo* evaluation for anti-aging effects of an emulsion containing basil extract using non- invasive biophysical techniques. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 5, p. 344–350, 2011.

RAUHA, J.P. et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3–12, 2000.

REFLORA. **Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o Conhecimento e Conservação da Flora Brasileira**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. COPPETEC-UFRJ, 2017. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=97311453>.

RIBEIRO, A. E. A. S. et al. Inhibitory effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by Bothrops jararacussu snake venom in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1046–1056, 2019.

RIBEIRO, R. C. A. et al. Production and Characterization of Cosmetic Nanoemulsions Containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill Extract as Moisturizing Agent. **Molecules**. v. 20, n. 2, p. 2492-2509, 2015.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+. **Comunicado Técnico Online, Embrapa-CE**. v. 1, p. 1-4, 2007.

SAEWAN, N., JIMTAISONG, A. Photoprotection of Natural Flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutica Science**, v. 3, n. 9, p. 129-141, 2013.

SAMPAIO, P. A. et al. Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLCDAD) method for the quantification of rutin and isoquercetin in *Morus nigra* L. (Moraceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 34, p. 1048-1056, 2018a.

SAMPAIO, P. A. et al. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA *Morus nigra* L. **Revista GEINTEC**, v. 8, n.2, p.4381-4391, 2018b.

SAMPAIO, P. A. **Utilização de planejamento fatorial como estratégia para o desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados de *Morus nigra* L.** Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2017.

SATO, Y. et al. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 483–488, 2000.

SCHALKA, S. et al. Consenso Brasileiro de Fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 1-76, 2014.

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

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SHIN, S.W. et al. Antagonizing Effects and Mechanisms of Afzelin against UVB-induced cell damage, **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 160, 2013.

SILVA, C. A., et al. A ciência cosmética como instrumento da saúde pública: uso correto de fotoprotetores. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 159-165, 2009.

SILVA, P. M.; SILVA, M. A E. Índice de saponificação de óleo vegetal constituinte de uma emulsão. **12º Congresso de iniciação científica: 6ª mostra de pesquisa da Pós-Graduação**. São Paulo, p. 952-955, 2009.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR, J.A. Colorimetry of total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMITH, D. A.; BANKS, S. W. **Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**. New York: Alan R. Liss INC, p. 113–124, 1986.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

SOARES, J. M. D. **Preparação, caracterização e atividades anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de *Morus nigra* L. encapsulado em partículas e fibras de Eudragit®L100**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2017.

SOUZA, G. R. et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248–254, 2018.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 36–38, 2005.

SOUZA, M.M. et al. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55c, p. 256-260, 2000.

SPELLMEIER, F. **Estudo comparativo entre dois métodos de produção de bases emulsionadas através da estabilidade acelerada**. 2005. Monografia (Graduação em Farmácia) Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2005.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidants polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 69, n. 1, p. 71-77, 2014.

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n.4, p. 263-9, 2012.

THABTI, I. et al. Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. **Acta Botanica Gallica**, v. 158, n. 2, p. 205–214, 2011.

TURGUT, N. H. et al. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d-galactose-induced aging mice, **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1052-1064, 2016.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, n. 2-3, p. 99-104, 2001.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VINHAL, D.C. **Planejamento, síntese, caracterização e avaliação de um novo composto candidato a protótipo de fotoprotetor**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2012.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 452–457, 2009.

WAGNER, H. ; BLADT, S. **Plant Drug analysis**. 2. ed. Berlim Springer-verlag, 1996.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. Sistemas dispersos: considerações básicas. In: DAMODARAN, S. et al. **Química de alimentos de fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap.13, p.611-660.

WANG, L.; GONG, T.; CHEN, R.Y. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. **Chinese Chemical Letters**, v.20, p.1469-1471, 2009.

WANNES, W.A. et al. Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, n. 5, p. 1.362-1.370, 2010.

WILLIAMS, S.; TAMBURIC, S.; LALLY, C. Eating chocolate can significantly protect the skin from UV light. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 8, n. 3, p. 169 – 173, 2009.

ZENI, A. L. B. et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 89, n. 4, p. 2805-2815, 2017.

ZHANG, Y. Quercetin Isolated from *Toona sinensis* Leaves Attenuates Hyperglycemia and Protects Hepatocytes in High-Carbohydrate/High-Fat Diet and Alloxan Induced Experimental Diabetic *Mice*. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

ZHEKUN, Z.; GILBERT, M. G. Moraceae. **Flora of China**, v. 5, p. 21-73, 2003.

# *Anexos*

---

## ARTIGOS SUBMETIDOS

1. Preliminary stability and *in vitro* photoprotective activity of formulations containing extracts of *Morus nigra* L. (Moraceae): Compatibility between different autoemulsifying bases. Artigo submetido à **Fitoterapia** (Milano).

2. Phytocosmetic emulsion containing extract of *Morus nigra* L. (Moraceae): development, stability study, antioxidant and antibacterial activities. Artigo submetido à **Phytotherapy Research**.



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº AC34CFC**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AC34CFC**  
Usuário: **UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
CPF/CNPJ: **05.440.725/0001-14**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso:

**Pesquisa Científica**

**Bioprospecção**

**Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Morus nigra**

Título da Atividade: **Estudo fitoquímico, avaliação do potencial antibacteriano, citotóxico, antioxidante, fotoprotetor, antinociceptivo, anti-inflamatório, hipoglicemiante e toxicologia pré-clínica de Morus nigra L. (Moraceae)**

**Equipe**

<b>Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO</b>
<b>GRASIELLY ROCHA SOUZA</b>	<b>UNIVASF</b>
<b>RAIMUNDO GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR</b>	<b>UNIVASF</b>
<b>TAMARA COIMBRA DINIZ</b>	<b>UNIVASF</b>
<b>ALEXSANDRO BRANCO</b>	<b>UEFS</b>
<b>SARAH RAQUEL GOMES DE LIMA-SARAIVA</b>	<b>UFPE</b>



AMANDA LEITE GUIMARAES	UNIVASF
ANA PAULA DE OLIVEIRA	UNIVASF
ALESSANDRA GOMES MARQUES PACHECO	UNIVASF
MARIANA GAMA E SILVA	UNIVASF
MANOEL ODORICO DE MORAES-FILHO	UFC
MARCILIA PINHEIRO DA COSTA	UFPI
CLAUDIA DO Ó PESSOA	UFC
JULIANA MIKAELLY DIAS SOARES	UNIVASF
HELINANDO PEQUENO DE OLIVEIRA	UNIVASF
NATHALIA ANDREZZA CARVALHO DE SOUZA	UNIVASF
LARISSA ARAUJO ROLIM	UNIVASF

## Resultados Obtidos

### Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Development and Validation of a HPLC-DAD Me</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Development and validation of analytical methc</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Estudo fitoquímico de Morus nigra L. (Moracea</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Isolamento e determinação estrutural de consti</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Substâncias fenólicas de Morus nigra L. (Morac</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Assessment of the antibacterial, cytotoxic and</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Atividade antinociceptiva do extrato etanólico c</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Atividade antioxidante e antinociceptiva do exti</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Atividade antinociceptiva das fases obtidas poi</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Atividade antinociceptiva de Morus sp. (Morace</b>

Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Fotoproteção em Morus nigra L. (Moraceae): ar</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Caracterização de fenóis por HPLC-DAD e ativi</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Avaliação da atividade antioxidante in vitro de l</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Brazilian Morus nigra attenuated hyperglycemi</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Controlled release of extract of Morus nigra fro</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Encapsulação de microesferas de Eudragit L10</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das fr</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Evaluation of hypoglycemic potential and pre-c</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Análise de parâmetros de qualidade nas folhas</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Toxicologia pré-clínica e avaliação do potencia</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Avaliação do potencial hipoglicemiante da Mor</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Avaliação da possível atividade hipoglicemiant</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Celwane Alves Moura. Estudo fitoquímico de M</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Juliana Mikaelly Dias Soares. Preparação, cara</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Pedrita Alves Sampaio. Utilização de planejam</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Rafaela Santos de Melo. Desenvolvimento e av</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Grasielly Rocha Souza. Desenvolvimento e vali</b>
Identificação do meio onde foi divulgado:	<b>Grasielly Rocha Souza. Estudo químico biomor</b>

Identificação do meio onde foi divulgado: **Amara Caroline Barbosa Oliveira. Estudo químico**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Fabiola Salvador Bezerra. Avaliação do potencial**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Ewerton Granja de Araújo Rocha. Avaliação do potencial**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Aline Costa Alves de Moraes. Avaliação do potencial**

Data do Cadastro: **14/10/2018 07:32:54**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:25** de **01/08/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**