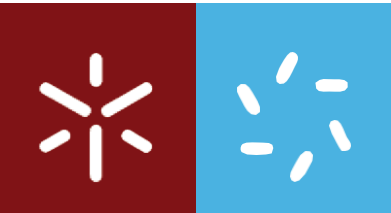


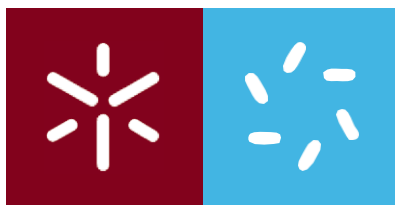


Jocelio Evaristo Francelino

Desenvolvimento de validação de cosmecêuticos derivados de *Diospyros kaki*

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Jocelio Evaristo Francelino

**Desenvolvimento e validação de cosmecêuticos
com *Diospyros kaki***

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação do

Professor Doutor Alberto Carlos Pires Dias

e da

Doutora Vanessa Alexandra Fernandes Magalhães

Janeiro de 2020

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado não poderia ser realizada sem o apoio, incentivo e compreensão de inúmeras pessoas que de alguma forma me ajudaram a vencer os obstáculos que surgiram no decorrer de sua execução. Pessoas às quais não posso deixar de agradecer.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois com ele tudo é possível. Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as decisões e me deram suporte de todas as forma possíveis. À minha irmã, pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar no que for preciso. Apesar da distância, vocês sempre se fizeram presentes e me ajudaram a vencer mais uma etapa.

Aos meus orientadores Doutor Alberto Dias e Doutora Vanessa Magalhães, que durante este ano estiveram compartilhando seus conhecimentos e ensinando o caminho certo a se seguir. Foram várias as barreiras, mas juntos conseguimos ultrapassá-las. Estiveram sempre dispostos a ouvir, corrigir, criticar, alertar e ajudar. Sem a orientação de vocês esta dissertação não seria possível, muito obrigado!

Aos meus colegas de laboratório, agradeço por todos os ensinamentos, pelo tempo dispensado para tirar as dúvidas, ajudar nos ensaios ou mesmo conversar e dar boas risadas. Quero agradecer imensamente ao Luis Giraldo e à Marta Cunha, que me ensinaram muito nos ensaios bioquímicos e de forma especial à Barbara Ferreira, que é uma “*expert*” em formulações cosméticas e ensaios biometrológicos na pele e foi uma verdadeira professora nesta parte do trabalho. Aprendi muito com vocês, obrigado!

Agradeço a todos os professores do mestrado de Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas, pela competência e dedicação ao ensino e à ciência.

Aos colegas do “Mestrado das Plantas”, agradeço pelos vários momentos divertidos e inesquecíveis que vivemos durante estes dois anos, foi muito bom conhecê-los, desejo a cada um muita sorte e sucesso.

Aos meus colegas de trabalho do Hemocentro de Goiás, que desde o início desta jornada foram grandes apoiadores e mesmo distantes sempre me enviavam boas energias e mensagens de incentivo.

Por fim, a todos que não citei os nomes ou mencionei, mas que fizeram parte desta etapa que está a acabar. Muito obrigado a todos!

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

O mercado de cosméticos é sem dúvida um mercado em ascensão e muito lucrativo. Os consumidores estão cada vez mais exigentes e as indústrias de cosméticos investem cada vez mais no desenvolvimento de novos produtos. Os cosméticos produzidos com extratos de plantas estão se destacando por representarem produtos naturais, sustentáveis, puros, saudáveis, seguros e eficientes.

O *Diospyros kaki*, uma planta rica em compostos fitoquímicos, tem sido descrito por ter um efeito benéfico sobre a pele, nomeadamente por apresentar atividades antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, foto-protetora e antirrugas, além de clareamento, redução de eritema, prevenção de dermatites e redução de sebo.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a produção de cremes utilizando subprodutos do *Diospyros kaki*, como extratos de folhas verdes, de folhas vermelhas e de resíduo alcoólico (biomassa da fermentação alcoólica da produção de vinagre de dióspiro).

Diferentes extratos foram produzidos e analisados qualitativamente através da técnica de HPLC-DAD, onde foram identificados vários polifenóis como a quercetina, o kaempferol, catequinas, a procianidina, derivados do ácido clorogénico e derivados glicosilados da luteína, em consonância com o já referido na literatura.

Realizaram-se ensaios bioquímicos conhecidos, como DPPH, ICA, radical superóxido e óxido nítrico para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos. Os extratos de folhas vermelhas e folhas verdes apresentaram atividade antioxidante significativa nestes ensaios.

Realizaram-se ainda ensaios de citotoxicidade e citoproteção contra insultos oxidativos recorrendo à avaliação da viabilidade celular (ensaio MTT), com as linhas celulares de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT. Os ensaios de citoproteção indicaram que os três extratos possuem capacidade de proteger as células dos efeitos do insulto oxidativo, com efeitos citoprotetores mais potentes para os dois extratos de folhas. Adicionalmente foi efetuado o ensaio em fibroblastos L929 para avaliação quantitativa das espécies reativas de oxigénio (ERO) recorrendo ao marcador diclorofluoresceína diacetato (DCFDA). Verificou-se que os extratos de folhas verdes e de resíduo alcoólico reduziram significativamente o nível de ERO intracelular.

Por fim, foram preparados cremes com extratos de folhas verdes (fvd) e de folhas vermelhas (fvm). Estes cremes foram avaliados em voluntários para observar os efeitos imediatos da sua aplicação tendo sido avaliados os seguintes parâmetros na pele: formação de eritema através do Mexameter, perda transepidérmica de água (TEWL) através do Tewameter e variação do conteúdo aquoso do estrato córneo através do Corneometer. Os cremes apresentaram bons resultados na pele, pois não indicaram a formação de eritema, melhoraram a hidratação da pele de seca para suficientemente hidratada e não apresentaram aumento na TEWL.

Palavras chave: antioxidante, citoproteção, cosméticos, *Diospyros kaki*, pele.

ABSTRACT

Cosmetics is undoubtedly a growing and very profitable market. Consumers are increasingly demanding, and the cosmetics industries are investing more in new products development. Cosmetics with plant extracts are standing out for representing natural, sustainable, pure, healthy, safe and efficient products.

Diospyros kaki, a rich in phytochemicals plant, has been described for with beneficial effects on the skin, namely with antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, photo-protective and anti-wrinkle activities, in addition to whitening skin, erythema reduction, dermatitis prevention, and sebum reduction.

In this context, this work aimed to produce creams using by-products of *Diospyros kaki*, such as extracts of green leaves, red leaves and alcoholic residue (from the fruit alcoholic fermentation in the persimmon vinegar production).

Different extracts were produced. They analysed qualitatively using the HPLC-DAD. Several polyphenols, such as quercetin, kaempferol, catechins, procyanidin, chlorogenic acid derivatives, and lutein glycosylated derivatives, were identified in line with has been already mentioned in the literature.

Recognized biochemical assays were carried out, such as DPPH, ICA, superoxide radical and nitric oxide, in order to evaluate the in vitro antioxidant activity of the extracts. Both extracts (of red leaves and green leaves) showed significant antioxidant activity in these assays.

Cytotoxicity and cytoprotection assays against oxidative insults were also carried out using cell viability assessment (MTT assay), using L929 fibroblast and HaCaT keratinocyte cell lines. Cytoprotection tests indicated that the three extracts have the capacity to protect cells from the effects of the oxidative insult, with pronounced potent cytoprotective effects for the leaf extracts. In addition, the L929 fibroblasts assay was performed for the quantitative evaluation of reactive oxygen species (ROS) using the dichlorofluorescein diacetate marker. It was observed that either the green leaves or alcoholic residue extracts significantly reduced the intracellular ROS level.

Finally, creams were prepared with both green and red leaves extracts. These creams were evaluated in volunteers to examine the immediate effects of their application. The following parameters on the skin having been evaluated: erythema formation (through Mexameter), transepidermal water loss - TEWL (through Tewameter) and the water content of the stratum corneum (through the Corneometer). The creams showed good results on the skin, as they did not lead to erythema formation; instead, they improved the hydration of dry skin to sufficiently hydrated and did not show an increase in TEWL.

Keywords: antioxidant, cytoprotection, cosmetics, *Diospyros kaki*, skin.

ÍNDICE

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de Integridade	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Unidades	xvi
1. Introdução Geral	1
1.1 Origem, importância e principais usos do <i>Diospyros kaki</i> L. (Dióspiro)	1
1.2 Os compostos fitoquímicos e sua importância.....	3
1.3 Fitoquímicos de interesse dermatológico e cosmético obtidos de <i>Diospyros kaki</i>	6
1.4 A pele: principais funções e estrutura	10
1.5 Os Radicais Livres e o envelhecimento da pele	13
1.6 Cosméticos	18
1.7 Produção de cosméticos com plantas.....	20
1.8 Avaliação da segurança e eficácia de produtos cosméticos	23
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo Geral:.....	26
2.2 Objetivos específicos:	26
3. Materiais e Equipamentos	27
4. Métodos	29
4.1 Recolha do material vegetal.....	29
4.2 Preparação dos extratos	29
4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	30
4.4 Ensaios bioquímicos para avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	31
4.4.1 Atividade de sequestro do Superóxido	32
4.4.2 Atividade quelante de Ferro (ICA)	33
4.4.3 Ensaio de redução do DPPH	34
4.4.4 Inibição da produção de Óxido Nítrico	36

4.5	Ensaios <i>in vitro</i> usando fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT como linhas celulares....	37
4.5.1	Manutenção da Cultura Celular	38
4.5.2	Avaliação de viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com MTT	38
4.5.3	Ensaio de Citotoxicidade	40
4.5.4	Ensaio de Citoproteção contra insulto t-BHP	40
4.5.5	Deteção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com DCFDA em fibroblastos L929...	41
4.6	Produção de formulação cosmética/cosmecêutica	42
4.6.1	Teste microbiológico	44
4.6.2	Testes de estabilidade por centrifugação	45
4.7	Avaliação <i>in vivo</i> dos efeitos imediatos da aplicação da formulação cosmética.....	45
4.7.1	Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)	47
4.7.2	Determinação da hidratação da pele	48
4.7.3	Determinação de formação de eritema na epiderme	49
4.8	Análise Estatística	49
5.	Resultados e Discussão	50
5.1	Análise dos extratos de dióspiro por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	50
5.2	Ensaios bioquímicos para avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	53
5.2.1	Atividade de sequestro do radical Superóxido ($O_2^{\bullet -}$).....	53
5.2.2	Atividade quelante de Ferro (ICA)	55
5.2.3	Ensaio de redução do DPPH	56
5.2.4	Inibição da produção de Óxido Nítrico	58
5.3	Ensaios <i>in vitro</i> usando fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT como linhas celulares....	60
5.3.1	Ensaio de Citotoxicidade	60
5.3.1.1	Linha celular fibroblastos L929	61
5.3.1.2	Linha celular queratinócitos HaCaT	63
5.3.2	Ensaio de Citoproteção contra insulto t-BHP	66
5.3.2.1	Linha celular fibroblastos L929	66
5.3.2.1.1	Duas horas de pré-incubação dos fibroblastos da linha L929 com os extratos.....	66

5.3.2.1.2	Vinte e uma horas de pré-incubação dos fibroblastos da linha L929 com os extratos	67
5.3.2.2	Linha celular queratinócitos HaCaT	69
5.3.2.2.1	Duas horas de pré-incubação dos queratinócitos da linha HaCaT com os extratos	69
5.3.2.2.2	Vinte e uma horas de pré-incubação dos queratinócitos da linha HaCaT com os extratos.....	70
5.3.3	Deteção de Espécies Reativas de Oxigénio (ERO) com DCFDA em fibroblastos L929...	72
5.4	Produção de formulação cosmética/cosmecêutica	74
5.4.1	Teste microbiológico	74
5.4.2	Testes de estabilidade por centrifugação	75
5.5	Avaliação <i>in vivo</i> dos efeitos imediatos da aplicação da formulação cosmética.....	76
5.5.1	Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)	76
5.5.2	Determinação da hidratação da pele	78
5.5.3	Determinação de formação de eritema na epiderme	80
6.	Conclusões e perspectivas futuras	83
7.	Referências bibliográficas.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação biológica do dióspiro. Adaptado de Butt <i>et al.</i> , (2015).	1
Figura 2 - Fitoquímicos encontrados em plantas. Adaptado de (Liu, 2004).....	4
Figura 3 - Compostos fenólicos isolados em dióspiro Mopan: 1- Ácido Gálico, 2- Epicatequina, 3- Epigallocatequina, 4- Ácido Clorogénico e 5- Ácido Cafeico. Adaptado de Kashif <i>et al.</i> , (2017).	7
Figura 4 - Estrutura química do licopeno, carotenoide responsável pela cor vermelha do dióspiro, que apresenta atividade de redução do eritema induzido pela radiação UV. Adaptado de (Kashif <i>et al.</i> , 2017).	8
Figura 5 - Esquema da pele. 1- Epiderme. 2- Derme. 3- Camada subcutânea. 4- Artéria. 5- Veia. 6- Recetor Nervoso. 7- Glândula Sudorípara. 8- Membrana Basal. 9- Poro. 10- Pelo. Adaptado de MacNeil (2007).	11
Figura 6 - As funções da barreira epidérmica: de “fora→dentro”, formar uma barreira contra entrada de insultos físicos, como radiação UV e lesões mecânicas, insultos químicos como alergénios e substâncias irritantes, e contra microrganismos; e de “dentro→fora” evitar a perda de água do organismo. Adaptado de Proksch <i>et al.</i> (2008).	12
Figura 7 - Os principais tipos de produtos cosméticos e/ou cosmeceúticos disponíveis no mercado, divididos por categorias. Adaptado de Cavinato (2018).	19
Figura 8 - Requisitos dos consumidores para os produtos cosméticos. Adaptado de Wang <i>et al.</i> (2015).	24
Figura 9 - Diagrama esquemático do ensaio DPPH. A doação de hidrogénio do antioxidante (AOX) para a molécula DPPH, origina a sua forma reduzida DPPH:H que causa a uma diminuição na cor da amostra e consequentemente na sua absorvância. Adaptado de Kusumawati & Indrayanto, (2013).	35
Figura 10 - Ilustração relativa à formação do produto formazano. Adaptado de Riss <i>et al.</i> , (2004).	39
Figura 11- Esquema representativo do ensaio de citoproteção de 5 horas e de 24 horas com o tempo entre os procedimentos.	41
Figura 12 - Equipamento Cutometer® dual MPA 580 do fabricante Courage & Khazaka, com as sondas Corneometer®, Tewameter® e Mexameter® utilizadas neste trabalho.	46
Figura 13 - Esquema de marcação nos braços dos voluntários para avaliação dos efeitos das formulações. Foram realizadas 4 marcações: (cn) para controle negativo, sem aplicação de nenhum produto; (fc) para formulação controlo, sem os extratos de dióspiro; (fvm) para formulação de folhas vermelhas; e (fvd) para formulação de folhas verdes.	47

Figura 14 - Camara aberta da sonda Tewameter que mede a perda transepidermica de água da pele através de sensores de temperatura e humidade. Adaptado de Rogiers (2001).....	48
Figura 15 - Representação esquemática da sonda de medição de capacitância do aparelho (Corneometer CM 825). Vistas frontal e lateral dos elétrodos interdigitais. Os elétrodos são cobertos com um material vitrificado e, conseqüentemente, não estão em contato direto com a superfície da pele.	48
Figura 16 - Sonda Mexameter® MX 18 usada para avaliação de eritema e melanina na pele. A sonda contém 16 diodos emissores de luz dispostos circularmente que emitem luz em três comprimentos de onda: 568 nm (verde), 660 nm (vermelho) e 880 nm (infravermelho). A luz refletida pela pele é medida por um fotodetector, um medidor simples de refletância. Adaptado de Busch <i>et al.</i> , (2016).....	49
Figura 17 - Cromatogramas HPLC-DAD dos extrato de folhas verdes de <i>Diospyros kaki</i>	50
Figura 18 - Cromatograma HPLC-DAD (350 nm) do extrato de folhas vermelhas de <i>Diospyros kaki</i> ...	51
Figura 19 - Cromatograma HPLC-DAD (260 nm) do extrato de resíduo alcoólico de <i>Diospyros kaki</i> ...	51
Figura 20 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de eliminação do superóxido, comparando com o Ácido Ascórbico (antioxidante padrão).	53
Figura 21 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de atividade quelante de ferro, comparando com o EDTA um agente quelante muito usado.	55
Figura 22 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de redução do DPPH, comparando com o Trolox (antioxidante de referência).	57
Figura 23 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de inibição da produção de óxido nítrico, comparando com o ácido ascórbico (antioxidante de referência).	59
Figura 24 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 5 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	61
Figura 25 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 24 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	62
Figura 26 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 5 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C-	

Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	64
Figura 27 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 24 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	65
Figura 28 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 2 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	66
Figura 29 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 21 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	67
Figura 30 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 2 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	70
Figura 31 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 21 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verde; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.	71
Figura 32 – Gráfico representativo do ensaio deteção de espécies reativas de oxigénio com DCFDA. Pode-se observar um aumento na intensidade de fluorescência (%) para todos os poços incubados com o insulto (t-BHP). Os extratos demonstraram uma intensidade menor que a do t-BHP 4mM, indicando uma proteção contra danos oxidativos em todas as concentrações testadas.	72

Figura 33 – Gráfico representativo da avaliação da perda transepidérmica de água. O controlo negativo (cn) e as formulações controlo (fc), folhas verdes (fvd) e folhas vermelhas (fvm) foram avaliadas no tempo 0 – t0 (sem aplicação dos cremes) e no tempo 6 – t6 (6 horas após a aplicação dos cremes) quanto a variação da perda de água das regiões demarcadas nos antebraços dos voluntários. Diferença estatística: *** $p = 0,0001$ e **** $p < 0,0001$	77
Figura 34 – Gráfico representativo da avaliação hidratação da pele. O controlo negativo (cn) e as formulações controlo (fc), de folhas verdes (fvd) e de folhas vermelhas (fvm) foram avaliadas no tempo 0 – t0 (sem aplicação dos cremes) e no tempo 6 – t6 (6 horas após a aplicação dos cremes) quanto a variação do conteúdo aquoso do estrato córneo das regiões demarcadas nos antebraços dos voluntários. Diferença estatística: **** $p < 0,0001$	79
Figura 35 – Gráfico representativo da avaliação da formação de eritema. O controlo negativo (cn) e as formulações controlo (fc), de folhas verdes (fvd) e de folhas vermelhas (fvm) foram avaliadas no tempo 0 – t0 (sem aplicação dos cremes) e no tempo 6 – t6 (6 horas após a aplicação dos cremes) quanto a variação do índice de eritema das regiões demarcadas nos antebraços dos voluntários.	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Produção mundial de dióspiro no ano de 2017 de acordo com dados do “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAOSTAT, 2019).....	2
Tabela 2 - Principais técnicas utilizadas no isolamento e identificação de compostos fitoquímicos das plantas. Adaptado de (Mendoza & Silva, 2018). *Neste trabalho foi utilizado a técnica de Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para identificação qualitativa dos principais compostos fitoquímicos dos extratos de <i>Diospyros kaki</i>	6
Tabela 3 - Fitoquímicos isolados em partes da planta do <i>Diospyros kaki</i> que tem aplicação na área dermatológica ou cosmética. Adaptado de (Kashif <i>et al.</i> , 2017).....	9
Tabela 4 - Principais causas de stress oxidativo na pele. Adaptado de Kohen (1999)	15
Tabela 5 - Principais causas, mecanismos moleculares e manifestações clínicas dos processos intrínsecos e extrínsecos de envelhecimento da pele. Adaptado de (Cavinato, 2018).....	16
Tabela 6 - Exemplos de produtos botânicos com suas funções antienvhecimento e os tipos de estudos e resultados observados. Adaptado de (Campa & Baron, 2018)	22
Tabela 7 – Materiais e reagentes utilizados nos ensaios.	27
Tabela 8 - Equipamentos utilizados durante os ensaios.	28
Tabela 9 – Descrição do gradiente de eluição da análise por HPLC-DAD.....	31
Tabela 10 - Concentrações de extratos usadas no ensaio de citoproteção e citotoxicidade.	40
Tabela 11 - Fases da preparação das formulações, com os ingredientes e as quantidades. Na fase D, foram adicionados os respectivos extratos do dióspiro e no creme controlo foi adicionado água em substituição ao extrato.	43
Tabela 12 - Limites microbiológicos em produtos cosméticos, dividido por categoria de produtos. Adaptado de (“Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.,” 2016).	44
Tabela 13 – Compostos obtidos através da análise de HPLC dos extratos de dióspiro.....	52
Tabela 14 - Atividade de eliminação do superóxido dos extratos de folhas de dióspiro e do antioxidante ácido ascórbico e comparação da significância dos resultados.	54
Tabela 15 – Atividade quelante de ferro dos extratos de dióspiro e do agente quelante EDTA e comparação da significância dos resultados.....	56
Tabela 16 - Redução do radical DPPH dos extratos de folhas de dióspiro e do antioxidante Trolox e comparação da significância dos resultados.....	57

Tabela 17 – Inibição da produção de óxido nítrico apresentada pelos extratos de folhas do dióspiro e o ácido ascórbico e comparação da significância dos resultados.	59
Tabela 18 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas.	62
Tabela 19 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas.	63
Tabela 20 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas.	64
Tabela 21 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas.	65
Tabela 22 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas (pré-incubação por 2 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).	67
Tabela 23 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas (pré-incubação por 21 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).	68
Tabela 24 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas (pré-incubação por 2 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).....	70
Tabela 25 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas (pré-incubação por 21 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).....	71
Tabela 26 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com o DCFDA para os extratos de folhas vermelhas, folhas verdes e resíduo alcoólico de dióspiro expresso em percentagem de intensidade de fluorescência e comparação da significância dos resultados.	73
Tabela 27 – Dados provenientes da avaliação microbiológica das formulações cosméticas com extratos de dióspiro, formulação controlo e parâmetros de referência da norma europeia (“Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.,” 2016).	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ADN - Ácido desoxirribonucleico
AOX - Antioxidante
ATP - Adenosina trifosfato
BHT - Hidroxitolueno butilado
cn - Controle negativo
°C - Graus Celsius
CE - Eletroforese capilar
CEN - Comitê Europeu de Normalização
c-LC - Cromatografia líquida capilar
COX-2 - Ciclooxigenase-2
D. kaki - *Diospyros kaki*
DCF - Diclorofluoresceína
DCF-DA - 2', 7'-diclorofluorescina-diacetato
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC - Concentração Efetiva
EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético
EGCG - Epigallocatequina-3-galato
ERA - Extrato de resíduo alcoólico
ERN - Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécies reativas de oxigênio
F. - Folhas
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBS - Soro fetal bovino
fc - Formulação controle
fvd - Formulação com folhas verdes
fvm - Formulação com folhas vermelhas
FZ - Ferrozina
g - Gramas
GC - Cromatografia gasosa
h - Horas
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HIF-1 α - Fator indutor de hipóxia-1 α
HO-1 - Hemeoxigenase-1
HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução
ICA – Atividade quelante de ferro
IFN- γ - Interferon gama
IL-2 - Interleucina 2
IL-6 - Interleucina 6
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IR - Espectroscopia de infravermelho
ITP - Isotacoforese
Kcal - Quilocaloria
KCl - Cloreto de potássio
LB - *Luria Bertani*
LDH - Enzima lactato desidrogenase
LED - Diodo emissor de luz
LPS - Lipopolissacarídeo

m² - Metros quadrados
 MEC - Matriz extracelular
 mg - Miligramas
 µg - Microgramas
 min - Minutos
 mL - Mililitros
 µL - Microlitros
 mm - Milímetros
 mM - Milimolar
 µM - Micrómetro
 MMP-1 - Metaloproteinase-1 da matriz
 MS - Espectroscopia de massa
 MTT - Brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]
 N/A - Não avaliado
 NaCl - Cloreto de sódio
 NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
 NADPH - Fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
 NBT - Azul de nitrotetrazólio
 NED - N-(1-naftil) etilenodiamida
 NF-κB - Fator nuclear kappa B
 NIR - Espectroscopia no infravermelho próximo
 nm - Nanômetros
 NO - Óxido nítrico
 -OH - Grupo hidroxila
 O₂ • - - Superóxido
 p - Probabilidade
 PBS - Solução tampão fosfato salina
 PGE2 - Prostaglandina E2
 PMS - Metossulfato de fenazina
 PRDX2 - Peroxirredoxina 2
 Res. - Resíduo
 RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
 RPM - Rotação por minuto
 RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
 SC - Estrato córneo
 SNP - Nitroprussiato de sódio
 t1 – Medição inicial antes da aplicação dos cremes
 t6 – Medição após 6 horas da aplicação dos cremes
 t-BHP - Hidroperóxido de terc-butilo
 TEWL - Perda transepidermica de água
 TLC - Cromatografia em camada fina
 TLE - Eletroforese em camada fina
 TNFα - Fator de necrose tumoral alfa
 UA - Unidades arbitrárias
 UFC - Unidade formadora de colônias
 UV - Ultravioleta
 UVB - Ultravioleta B
 VEGF - Fator de crescimento endotelial
 vs. - Versus

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Origem, importância e principais usos do *Diospyros kaki* L. (Dióspiro)

O diospireiro (*Diospyros kaki* L.) é uma planta frutífera, pertencente à família Ebenaceae (Figura 1) e originária da Ásia, mais precisamente das montanhas da região central da China (de Campos *et al.*, 2015), onde é cultivada desde séculos antes de Cristo. Foi levada para o Japão no século VII e Coreia no século XIV (Martínez-calvo *et al.*, 2012), onde foram desenvolvidas novas variedades e com o passar dos anos foi disseminada para outros países. A sua introdução nos países ocidentais, ocorreu inicialmente no século XIX, começando nos Estados Unidos, seguindo para França, Espanha, Itália (de Campos *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2004) e Brasil (Neuwald *et al.*, 2009). Com o passar dos anos, espalhou-se pelos cinco continentes (Tim, 2012).

Embora existam mais de 400 espécies cultivadas globalmente, apenas quatro têm importância comercial, *Diospyros virginiana*, *Diospyros oleífera*, *Diospyros lotus* e *Diospyros kaki*, esta última destaca-se como a mais importante. (Akbulut *et al.*, 2008; Bibi *et al.*, 2007; Butt *et al.*, 2015)



Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Subdivisão	Magnoliophytina
Classe	Rosopsida
Subclasse	Dilleniidae
Super Ordem	Primulanae
Ordem	Ericales
Subordem	Ebenineae
Família	Ebenaceae
Tribo	Diospyreae
Gênero	Diospyros
Espécie	Kaki

Figura 1 - Classificação biológica do dióspiro. Adaptado de Butt *et al.*, (2015).

A produção global de dióspiro alcançou 3.702.232 toneladas em 2007 e 5.190.324 toneladas em 2014. A área colhida aumentou 578.020 hectares em 10 anos, confirmando a importância econômica desta espécie em todo o mundo (Kluge & Tessmer, 2018). De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), os maiores produtores mundiais em 2017 foram China, Espanha, Coreia, Japão e Brasil, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Produção mundial de dióspiro no ano de 2017 de acordo com dados do “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAOSTAT, 2019).

País Produtor	Quantidade produzida (em toneladas)
China	4.216.376
Espanha	404.131
República da Coreia	378.991
Japão	225.300
Brasil	180.800
Azerbaijão	147.219
Uzbequistão	85.824
Itália	49.675
Israel	29.000
Irão	24.326
Nepal	2.823
Nova Zelândia	2.333
Eslovênia	2.055
Chile	744
Austrália	717
México	53
TOTAL	5.750.367

O dióspiro, conforme seu amadurecimento, pode ter uma cor que varia entre o amarelo, laranja e o vermelho. Quando totalmente amadurecido tem um sabor doce e suave, entretanto, quando não está totalmente maduro é rico em taninos solúveis que lhe conferem uma certa adstringência (Celik & Ercisli, 2008). É um fruto rico em proteínas, fibras, carboidratos, carotenóides, compostos fenólicos, vitaminas e minerais (Kluge & Tessmer, 2018). De acordo com Baltacıoğlu & Artik (2013), a polpa de diferentes variedades apresenta de 0,40% a 1,16% de fibra bruta, 80% de água, de 0,40% a 0,60% de proteína e 0,05% de gordura total, além de apresentar baixas taxas calóricas (70 kcal/100g).

Segundo Butt *et al.* (2015), a rica composição fitoquímica do dióspiro tem incentivado pesquisas para seu uso na cura de doenças e promoção da saúde, já que ele é potencialmente eficaz no combate a produção de radicais livres, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, cancro, distúrbios dérmicos e hipertensão. Na Coreia, Japão e principalmente na China, devido ao desempenho de seus ingredientes funcionais, é tradicionalmente usado para fins medicinais (Yaqub *et al.*, 2016), incluindo o tratamento de paralisia, úlcera de frio, queimaduras e para conter o sangramento (Jo *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2015).

Carotenóides como β -criptoxantina, β -caroteno, zeaxantina, licopeno e luteína são pigmentos encontrados em frutas do dióspiro (Giordani *et al.*, 2011), sendo responsáveis pela sua coloração e desempenhando um papel importante na saúde humana devido a provitamina A e às atividades

antioxidantes (Giordani *et al.*, 2011; Kluge & Tessmer, 2018). O fruto do dióspiro também é considerado fonte de vitamina C e de compostos fenólicos e polifenólicos, como flavonóides (catequinas e taninos condensados) que fazem o “*Scavenging*” dos radicais livres (El-Hawary *et al.*, 2019; Suzuki *et al.*, 2005).

Em alguns países asiáticos, as folhas do diospireiro são consumidas como chá promotor da saúde por possuírem inúmeros efeitos biológicos, nomeadamente antioxidante, anticancerígeno, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anti-hiperglicémico (Kawakami *et al.*, 2013) anti-histamínico, antialérgico e neuro-protetor (Xie *et al.*, 2015), ainda apresentando efeitos benéficos na hemostase sanguínea, na constipação, na apoplexia e na aterosclerose (JS Lee *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011). De acordo com as pesquisas de Jo *et al.* (2003) e Matsuo & Ito (1978) foram encontradas nas folhas do diospireiro, oligómeros flavonóides, taninos, fenóis, ácidos orgânicos, clorofila, vitamina C e cafeína.

Suas folhas estão cada vez mais populares também na indústria cosmética devido as propriedades de clareamento da pele. Na China o chá é usado para evitar a produção de melanina; no Japão, é usado também como anti-envelhecimento e fonte de nutrientes. Em Taiwan, onde é conhecido como “folha da beleza”, além de ser usado como bebida, é usado para lavar rosto e corpo (Xie *et al.*, 2015).

A madeira das plantas do gênero *Diospyros* possuem um grande número de derivados de naftaleno. Vários naftaldeídos e algumas naftoquinonas foram isolados e suas atividades antifúngicas investigadas, sendo que eles exibiram efeitos inibitórios contra parasitas protozoários (Matsushita *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, há grande quantidade de informação disponível sobre as atividades fitoquímicas e farmacológicas de constituintes isolados de folhas de diospireiro. No entanto, visto que a maioria das publicações são em Chinês e baseadas na Medicina Tradicional Chinesa e não estão acessíveis à todos (Xie *et al.*, 2015), há muita informação a ser elucidada. Praticamente todas as partes da planta são utilizadas e seu uso muito difundido na área da medicina, farmacologia, bem-estar, alimentar e cosmética, esta última em menor proporção e que carece de mais investigação.

1.2 Os compostos fitoquímicos e sua importância

O “fito-” da palavra fitoquímicos é derivado do grego “*phyto*”, que significa planta. Portanto, a palavra fitoquímicos significa literalmente, químicos das plantas. Entretanto, numa definição mais ampla podemos considerar os fitoquímicos como compostos bioativos encontrados em frutas, vegetais, grãos e outras partes das plantas. Conforme demonstrado na Figura 2, eles podem ser classificados em cinco

principais grupos: alcalóides, carotenóides, compostos fenólicos, compostos azotados e compostos organossulfurados. Os fitoquímicos mais estudados são os compostos fenólicos e os carotenóides (Liu, 2004).

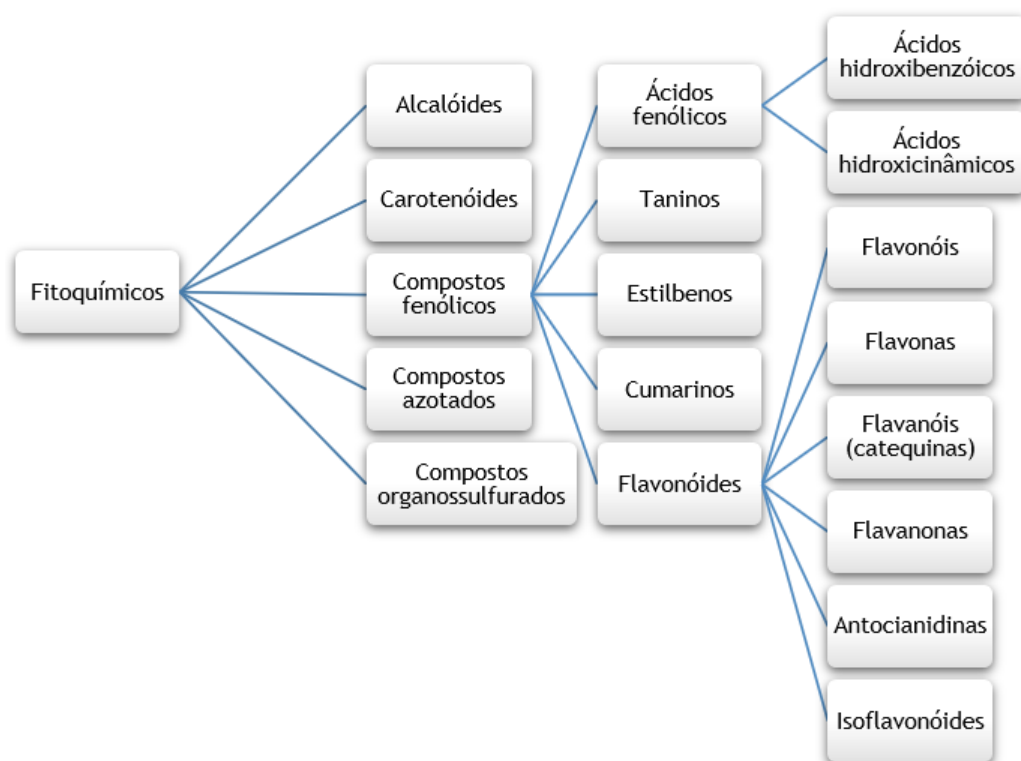


Figura 2 - Fitoquímicos encontrados em plantas. Adaptado de (Liu, 2004).

Há cerca de 400.000 espécies de plantas superiores no mundo, sendo uma fonte valiosa de numerosos compostos fitoquímicos. Mais de 80% dos aproximadamente 30.000 produtos naturais conhecidos são de origem vegetal, quase quatro vezes maior do que o estimado no reino microbiano. Estes produtos naturais das plantas compõem uma grande parte dos produtos farmacêuticos, aditivos alimentares, cosméticos e agroquímicos utilizados em nossa vida cotidiana (Zhong, 2011). De fato, os seres humanos têm desenvolvido um amplo catálogo de plantas úteis ao longo do tempo através do contato contínuo com a natureza, e o uso de plantas e extratos de plantas na medicina tradicional é conhecido desde os tempos antigos (Barbulova *et al.*, 2014).

Frutas e vegetais são partes vitais da dieta humana e uma rica fonte de compostos bioativos, incluindo fibras alimentares, antioxidantes naturais e vários fitoquímicos. A maioria dos compostos bioativos (fitoquímicos, compostos fenólicos e carotenóides) não são nutritivos, mas são eficazes contra inúmeras doenças, pois desempenham papéis importantes como agentes quimiopreventivos ou quimioterápicos (Yaqub *et al.*, 2016).

As plantas sintetizam uma vasta gama de compostos orgânicos que são tradicionalmente classificados como metabolitos primários e secundários, embora os limites precisos entre os dois grupos possa ser, em alguns casos, um pouco confuso (Crozier *et al.*, 2007). Os metabolitos primários incluem principalmente aminoácidos, glicosídeos e ácidos gordos, envolvidos no crescimento, desenvolvimento, reprodução e em outras funções primárias das plantas. Já os metabolitos secundários foram definidos pela primeira vez em 1891, por Kossel, como compostos que aparentemente não têm papel importante na manutenção de processos vitais fundamentais das plantas. Os metabolitos secundários são os principais contribuintes de odor, cor e sabor específicos das partes da planta. No passado, pensava-se que esses compostos orgânicos eram biologicamente insignificantes, mais tarde, verificou-se que eles desempenham um papel importante e fundamental na interação das plantas com o meio ambiente e nos mecanismos de defesa da planta contra danos bióticos e abióticos (Ahmed *et al.*, 2017).

Enquanto os metabolitos primários apresentam sua principal importância para a nutrição humana, os metabolitos secundários, devido às suas extensas atividades biológicas, são utilizados há séculos na medicina popular e nos dias atuais têm recebido grande atenção devido à sua utilização potencial em cosméticos, medicamentos e mais recentemente como nutracêuticos. Essa mudança drástica no interesse dos metabolitos secundários não é puramente acadêmica, mas também de natureza comercial (Ahmed *et al.*, 2017; Fumagali *et al.*, 2008)

Os metabolitos secundários podem ser classificados de diferentes maneiras com base em características químicas, origem vegetal ou origem biossintética. Na maioria da literatura publicada até a data que considera a classificação de origem biossintética, eles são subdivididos em três grupos principais: terpenóides, sintetizados a partir de ácido mevalônico no citoplasma ou piruvato e 3-fosfoglicérido no cloroplasto; alcalóides, comumente derivados de aminoácidos aromáticos ou alifáticos (Crozier *et al.*, 2006); e compostos fenólicos, derivados da via do chiquimato ou da via do ácido mevalônico (Crozier *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos, envolvidos na síntese de lignina, apresentam atividade farmacológica importante e são comuns a todas as plantas superiores, enquanto outros compostos, como os alcalóides, são escassamente distribuídos entre plantas superiores e sua presença é usada como traço taxonômico e constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química (Fumagali *et al.*, 2008).

Os extratos vegetais são uma combinação de vários tipos de fitoquímicos com polaridades diferentes, devido a este fato, a sua separação ainda permanece como um grande desafio para o processo de identificação e caracterização dos mesmos (Boligon & Athayde, 2014). A Tabela 2 apresenta um resumo das principais técnicas de separação e identificação de compostos fitoquímicos, como por

exemplo, os diversos tipos de cromatografia, que permitem isolar mais destas moléculas, constituindo-se como a base para o estabelecimento da disciplina de fitoquímica (Fumagali *et al.*, 2008; Harborne, 1984). Apesar das modernas técnicas de triagem, separação e elucidação estrutural terem renovado o interesse das indústrias farmacêuticas por produtos naturais, ainda há muitas plantas a serem estudadas (Saklani & Kutty, 2008).

Tabela 2 - Principais técnicas utilizadas no isolamento e identificação de compostos fitoquímicos das plantas. Adaptado de (Mendoza & Silva, 2018). *Neste trabalho foi utilizado a técnica de Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para identificação qualitativa dos principais compostos fitoquímicos dos extratos de *Diospyros kaki*.

Cromatografia	Cromatografia em camada fina (TLC)
	Cromatografia gasosa (GC)
	Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) *
	Cromatografia líquida capilar (c-LC)
Eletroforese	Eletroforese em camada fina (TLE)
	Isotacoforese (ITP) (eletroforese em velocidade uniforme)
	Eletroforese capilar (CE)
Técnicas espectroscópicas	Espectroscopia UV
	Espectroscopia de infravermelho (IR)
	Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)
	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)
	Espectroscopia de massa (MS)

A busca por novos ingredientes naturais pelas indústrias cosméticas levou à coleta de flores, sementes, raízes, folhas, galhos e frutos de plantas por todo o mundo. Os metabolitos de plantas com potenciais aplicações cosméticas incluem os compostos fenólicos, polifenóis, flavonóides, terpenóides, esteróides, saponinas esteróides, esteróis, açúcares, polissacarídeos, lignanas, carotenóides, ácidos orgânicos, antocianinas e cumarinas. Várias fontes vegetais foram exploradas pela indústria farmacêutica e cosmética para criar formulações com uma combinação inovadora de ingredientes e com ações específicas, como antialérgica, anti-inflamatória, hidratante, pró-colagénica, anti carcinogénica, antienvhecimento, anti-hiperpigmentação e com fator de proteção UV (Charles Dorni *et al.*, 2017).

1.3 Fitoquímicos de interesse dermatológico e cosmético obtidos de *Diospyros kaki*

Dados científicos revelaram uma excelente posição do *Diospyros kaki* na dermatologia e na estética, tornando-o uma opção valiosa nestas áreas. Os princípios ativos de diferentes partes da planta demonstraram possuir efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos, foto-protetores e antirrugas, com atividades apreciáveis contra as enzimas tirosinase, elastase e collagenase. A promissora atividade antioxidante, o potencial de clareamento da pele, a redução do conteúdo de sebo e no tamanho e número

de poros da pele, fazem dele uma escolha adequada como ingrediente cosmético. Extratos brutos e alguns fitoquímicos obtidos a partir do dióspiro, como isoquercetina e hiperina, têm atividades de despigmentação da pele superiores à de ingredientes cosméticos conhecidos, como arbutina, ácido kójico e hidroquinona, com possibilidade de não apresentar efeitos colaterais. (Kashif *et al.*, 2017).

Em um estudo recente, foram isolados de um extrato etanólico do dióspiro Mopan, o ácido gálico (1), epicatequina (2), epigallocatequina (3), ácido clorogénico (4), ácido cafeico (5) (Figura 3) e catequina, com atividade antioxidante superior à de extratos etanólicos de maçã, uvas e de tomate (Chen *et al.*, 2008). Desses seis fenólicos (que não representam mais de 20% do total de fenólicos totais), o ácido gálico apresentou maior atividade antioxidante. O extrato etanólico de dióspiro Mopan apresentou ainda um teor de fenólicos totais oito vezes maior que o de extratos de tomate, justificando a sua maior atividade antioxidante. (Chen *et al.*, 2008; Kashif *et al.*, 2017).

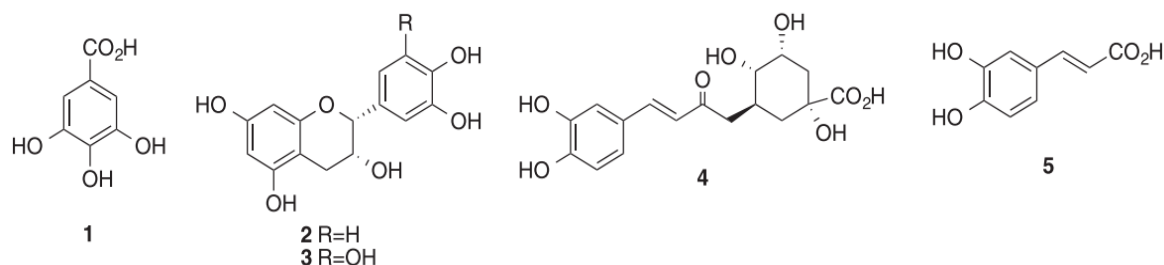


Figura 3 - Compostos fenólicos isolados em dióspiro Mopan: 1- Ácido Gálico, 2- Epicatequina, 3- Epigallocatequina, 4- Ácido Clorogénico e 5- Ácido Cafeico. Adaptado de Kashif *et al.*, (2017).

Outros polifenólicos investigados no fruto de dióspiro incluem ácido ferúlico, ácido tânico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, galato de epicatequina e galato de catequina (Lee *et al.*, 2012). Esses e outros compostos polifenólicos têm um papel potencial na prevenção de danos ao stress oxidativo através da eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Zhide Zhou *et al.*, 2016), prevenção da peroxidase lipídica (Toschi *et al.*, 2000) podendo ser úteis na prevenção de diferentes condições patológicas da pele.

Em outro estudo, diferentes polifenóis foram isolados do extrato metanólico das folhas de dióspiro, incluindo: hiperosídeo, isoquercetina, trifolin, astragalin, crisontemin, quercetina-3-O-(2''-galoyl-β-D-glucopiranosídeo), e kaempferol-3-O-(2''-galoyl-β-D-glucopiranosídeo) (Xue *et al.*, 2011). Entre esses polifenóis, a crisontemin apresenta atividade moderada contra a enzima tirosinase, o hiperosídeo e o trifolin têm atividade antifúngica (Li *et al.*, 2005), a isoquercetina possui atividade anti-inflamatória (Rogerio *et al.*, 2007) e a astragalin mostra efeitos antialérgicos (Kotani *et al.*, 2000).

Foram identificados em diferentes partes da árvore de *Diospyros kaki*, antocianidinas, flavan-3-ols e flavonóis. Proantocianidinas condensadas de alto peso molecular estão presentes em vacúolos de células, sendo a catequina, a galactocatequina, o ácido gálico, a epigallocatequina e a

epigalactocatequina-3-O-galato as principais subunidades das proantocianidinas condensadas nos frutos (Akagi *et al.*, 2011). As folhas de dióspiro contêm muitos flavonóides benéficos, incluindo a quercetina, kaempferol e a catequina (Sun *et al.*, 2011). Os flavonóides presentes nos extratos mostraram possuir potente atividade antioxidante, sendo capazes de eliminar aniões superóxido, radicais hidroxilo com bom poder redutor e atividade quelante de ferro superior à da rutina (Sun *et al.*, 2011).

O fruto do dióspiro contém diferentes tipos de carotenóides, incluindo xantofilas e carotenos. Recentemente, foram separados e otimizados, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina e β -caroteno utilizando-se a metodologia da superfície de resposta (Zaghdoudi *et al.*, 2015). O β -caroteno, também conhecido como "provitamina A", confere uma cor amarela dourada, sem dúvida tem um valor cosmético seletivo, a luteína e a zeaxantina fornecem proteção à retina contra danos oxidativos causados pela radiação UV e o licopeno (Figura 4) pode reduzir o eritema induzido pela radiação UV (Kashif *et al.*, 2017).

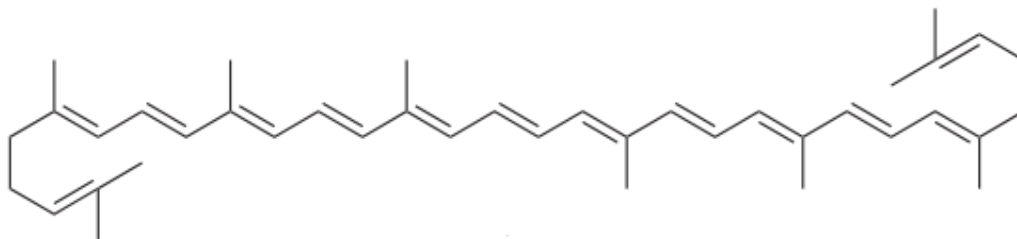


Figura 4 - Estrutura química do licopeno, carotenóide responsável pela cor vermelha do dióspiro, que apresenta atividade de redução do eritema induzido pela radiação UV. Adaptado de (Kashif *et al.*, 2017).

Outro grupo de fitoconstituintes bioativos presentes no dióspiro são os taninos. Os principais taninos presentes incluem flavano-elagitanina (molécula de flavan-3-ol ligada ao tanino hidrolisável por ligação CC), procianidinoelagitanina (proantocianidinas e elagitaninas) e seus produtos degradados, como galocatequina, catequina, catequina-galato e galocatequina-galato (Gu *et al.*, 2008). Em um estudo recente, os taninos do dióspiro foram extraídos por extração assistida por ultrassom (39,56% como equivalentes de catequina) e os ensaios demonstraram possuir efeitos de radioproteção contra espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas por radiações gama (Zhide Zhou et al., 2016).

Taninos de diferentes fontes foram estudados por seus efeitos antivirais, antibacterianos, antioxidantes, dermatoses pediátricas, efeitos anti-inflamatórios e radio protetores. Os taninos são utilizados clinicamente há muitos anos e sua importância na aplicação dermatológica ganhou importância significativa por causa de seus efeitos adstringentes, é usado como cicatrizante, hemostático, protetor, anti-inflamatório e contra coceira (Kashif *et al.*, 2017).

Diferentes triterpenóides foram identificados das folhas de *Diospyros kaki*, incluindo ácido ursólico, ácido 19-hidroxi-ursólico e ácido 19,24-di-hidroxi-ursólico, que demonstraram atividade supressora contra a geração de superóxido induzida por estímulos e fosforilação de tirosil. Outros terpenóides relatados incluem lupeol, ácido betulico, ácido pomólico, ácido betulínico e o ácido coussárico. Estes dois últimos demonstraram possuir efeitos anti-inflamatórios por inibição da via NF-κB e também podem inibir NO e PGE2 juntamente com uma supressão acentuada de TNF-α, IL-6 e IL-1β em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS. De referir que diferentes condições da pele manifestadas por inflamação, como “acne vulgar inflamatória”, estão associadas a citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1α e IL-1β (Kashif *et al.*, 2017).

Em Cho *et al.*, (2011) o extrato etanólico de folhas de dióspiro foi testado em queratinócitos HaCaT e ratos, por seus efeitos protetores contra inflamação cutânea induzida por UVB. A radiação UVB leva a uma viabilidade celular reduzida com maior produção de quimiocinas. O extrato foi capaz de recuperar a viabilidade celular e também suprimiu a geração de quimiocinas (CCL2 e CCL27) em queratinócitos HaCaT. Houve redução significativa no dano da pele após a administração oral de extrato etanólico de dióspiro em camundongos irradiados por UV sendo que estudos microscópicos revelaram uma redução na infiltração de células inflamatórias, na hiperplasia e no espessamento da epiderme (Cho *et al.*, 2011).

Como demonstrado em diversos estudos, o *Diospyros kaki* por ser rico em compostos ativos, apresenta inúmeras potenciais aplicações na área de dermatologia e de cosméticos, dentre as quais podemos destacar: atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória, inibição da collagenase e elastase que podem reduzir a formação de rugas, inibição da melanogênese com efeitos de clareamento da pele, propriedades antialérgicas e uso potencial na prevenção de dermatites, redução de sebo e óleo na pele, proteção contra radiação UV e diminuição da quantidade e tamanho dos poros aparentes da pele. A Tabela 3 resume alguns de seus fitoconstituintes importantes e suas respectivas aplicações dermatológicas e cosméticas.

Tabela 3 - Fitoquímicos isolados em partes da planta do *Diospyros kaki* que tem aplicação na área dermatológica ou cosmética. Adaptado de (Kashif *et al.*, 2017).

Princípio Ativo	Parte da planta	Forma farmacêutica	Ação farmacológica de produtos dermatológicos e/ou cosméticos
• Ácido gálico	Folhas e frutos	Diluições de ácido gálico e preparação tópica	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflamatório • Antimicrobiano • Inibe a liberação de histamina • Suprime a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6) e quimiocinas (CCL7 e CXCL8) • Efeito despigmentação e clareamento da pele • Efeito antienvelhecimento

Continuação da Tabela 3

Princípio Ativo	Parte da planta	Forma farmacêutica	Ação farmacológica de produtos dermatológicos e/ou cosméticos
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido rotungênico • Ácido 24-hidroxiursólico • Ácido ursólico • Ácido oleanólico • Ácido espatódico 	Folhas	Extrato metanólico	<ul style="list-style-type: none"> • Efeitos inibitórios na proteína tirosina fosfatase 1B
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido coussárico • Ácido betulínico 	Folhas	Frações purificadas	<ul style="list-style-type: none"> • Efeitos anti-inflamatórios com supressão de NO, PGE2, TNF-α, IL-6 e IL-1β
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido clorogênico 	Folhas e frutos	Diluição de 0–500 μ M	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a atividade da tirosinase e suprime a melanogênese nas células de melanoma B16 • Proteger a pele contra danos oxidativos induzidos por UV • Efeitos anti-inflamatórios
<ul style="list-style-type: none"> • β-Caroteno 	Casca e polpa do fruto	-	<ul style="list-style-type: none"> • Atribuir a cor “amarelo dourado” à pele • Protege a pele contra os danos UV
<ul style="list-style-type: none"> • 2-metoxi-4-vinilfenol 	Pele do fruto	Extrato metanólico	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade anti tirosinase (maior que a arbutina)
<ul style="list-style-type: none"> • Extrato bruto 	Fruto	Extrato etanólico	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade anti tirosinase comparável à da arbutina
<ul style="list-style-type: none"> • Extrato etanólico e suas frações purificadas 	Folhas	Frações purificadas do extrato etanólico	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade anti tirosinase • Inibição da collagenase • Síntese de colágeno promovida em fibroblastos cultivados • Atividade da xantina oxidase • Efeitos inibitórios da elastase
<ul style="list-style-type: none"> • Epicatequina 	Folhas e frutos	Amostras diluídas	<ul style="list-style-type: none"> • Atenuação de dano oxidativo induzido por UVA em fibroblastos da pele humana
<ul style="list-style-type: none"> • Epigallocatequina 	Folhas e frutos	Creme tópico	<ul style="list-style-type: none"> • Foto protetor (UV-B) • Anti-inflamatório • Reduz a síntese de melanina
<ul style="list-style-type: none"> • Isoquercetina (quercetina-3-O-glucosídeo) • Hiperina (quercetina-3-O-galactosídeo) 	Pele do fruto	Extrato acetônico	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a biossíntese de melanina em células de melanoma B16 de rato (superior ao ácido kójico e arbutina)
<ul style="list-style-type: none"> • Licopeno 	Fruto	-	<ul style="list-style-type: none"> • Reduz o nível de eritema da pele
<ul style="list-style-type: none"> • Quercetin-3-O- β-d-glucopiranosil-(1$\rightarrow$6)-β-d-glucopiranosídeo 	Cálice do fruto	Fração purificada de extrato acetona-água 70%	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da síntese de melanina • Hipopigmentação • Inibe a atividade da tirosinase • Redução da expressão de proteínas melanogênicas
<ul style="list-style-type: none"> • Taninos, incluindo flavano-elagitanina e Procianidinoelagitanina 	Polpa do fruto	Extrato metanólico aquoso	<ul style="list-style-type: none"> • Potentes propriedades antioxidantes • Redução dos níveis de ERO da exposição à radiação gama nas células HEK 293T • Redução da apoptose celular
<ul style="list-style-type: none"> • Luteína e zeaxantina 	Fruto	-	<ul style="list-style-type: none"> • Proteção contra danos UV e ERO

1.4 A pele: principais funções e estrutura

A pele é o maior e mais visível órgão do corpo e tem várias características-chave necessárias para interagir dinamicamente com o ambiente. Sua principal função é formar uma barreira contra os riscos ambientais, como: radiação ultravioleta (UV), insultos químicos, insultos físicos e microrganismos. Ela

também previne a desidratação, regula a temperatura e possui propriedades auto-curativas/cicatrizantes (Honari *et al.*, 2017).

Secundariamente e não menos importante, a pele tem funções de órgão sensorial pois, de acordo com os estímulos ambientais, o organismo apresenta as respostas adequadas para manter a sobrevivência. Também possui funções de um organismo endócrino, já que é responsável pela síntese, processamento e metabolização de uma vasta gama de estruturas proteicas, glicanos e lípidos (Chuong *et al.*, 2002). Por certo, as células da pele humana sintetizam várias hormonas, incluindo fatores de crescimento e esteróides sexuais além de vitaminas essenciais, como a vitamina D (Makrantonaki & Zouboulis, 2007).

Conforme pode ser observado na Figura 5, a pele é organizada em duas camadas primárias, epiderme e derme, que juntas são constituídas por componentes epiteliais, mesenquimais, glandulares e neuro vasculares (D'Orazio *et al.*, 2013).

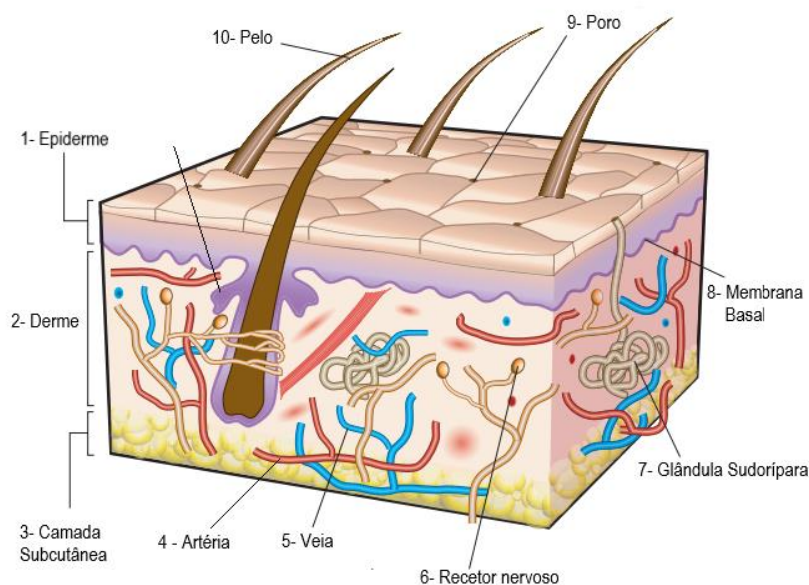


Figura 5 - Esquema da pele. 1- Epiderme. 2- Derme. 3- Camada subcutânea. 4- Artéria. 5- Veia. 6- Recetor Nervoso. 7- Glândula Sudorípara. 8- Membrana Basal. 9- Poro. 10- Pelo. Adaptado de MacNeil (2007).

As principais células que compõem a epiderme e derme são os queratinócitos, os melanócitos e os fibroblastos (Ha *et al.*, 2019). Os queratinócitos são os tipos de células mais comuns na epiderme e formam a camada superficial externa da pele. Os melanócitos são encontrados na camada inferior da epiderme e fornecem a cor da pele. Os fibroblastos formam a camada dérmica inferior e fornecem força e elasticidade (MacNeil, 2007).

A epiderme é a camada mais externa da pele e tem cerca de 0,05 a 1 mm de espessura, dependendo da parte do corpo. Ela é formada principalmente por três tipos de células: queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans (Honari *et al.*, 2017). Estruturalmente, a epiderme é uma barreira física eficiente (Ramos-e-Silva & Jacques, 2012), resistindo à penetração de microrganismos e possíveis toxinas, mantendo a umidade e os nutrientes dentro do corpo. Para além da barreira física, ela também forma uma barreira química/bioquímica e uma barreira imunológica adaptativa (Proksch *et al.*, 2008). A Figura 6 apresenta a barreira epidérmica com as suas principais funções.

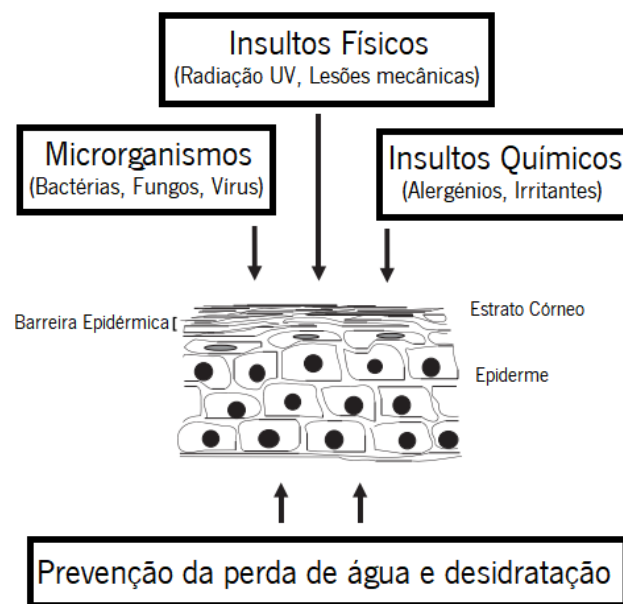


Figura 6 - As funções da barreira epidérmica: de “fora→dentro”, formar uma barreira contra entrada de insultos físicos, como radiação UV e lesões mecânicas, insultos químicos como alergênicos e substâncias irritantes, e contra microrganismos; e de “dentro→fora” evitar a perda de água do organismo. Adaptado de Proksch *et al.* (2008).

A barreira física consiste principalmente no estrato córneo (SC), mas a epiderme nucleada, em particular as junções célula-célula e proteínas citoesqueléticas associadas, fornecem outros componentes importantes. A barreira química/bioquímica consiste em lipídios, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e macrófagos. A barreira imunológica (adaptativa) é composta por constituintes humorais e celulares do sistema imunológico (Proksch *et al.*, 2008).

Os queratinócitos são o tipo de célula mais abundante na epiderme. Sua capacidade de se auto renovar através de um processo contínuo de proliferação, diferenciação e morte celular, permitem a compartimentalização da epiderme em diferentes estratos que representam os diferentes estágios da maturação dos queratinócitos. A diferenciação epidérmica começa com a migração de queratinócitos do estrato basal, que é a camada mais interna da epiderme. A medida que os queratinócitos basais proliferam, as células passam pelo processo de maturação e diferenciação e as mais velhas migram em

direção à superfície, formando as outras quatro camadas da epiderme, conhecidas como: camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea (Seeley *et al.*, 2004).

A derme é um sistema integrado de matrizes celulares e acelulares fibrosas que acomoda estruturas nervosas e vasculares, bem como apêndices derivados da epiderme. Muitos tipos de células residem na derme, incluindo fibroblastos, macrófagos, mastócitos e células imunes circulantes. A derme é responsável pela elasticidade da pele, flexibilidade e resistência à tração. Oferece proteção contra ferimentos mecânicos, retém água e auxilia na regulação térmica. Ela também contém e suporta recetores de estímulos sensoriais e é um elemento-chave na cicatrização de feridas (Kolarsick *et al.*, 2011).

A força mecânica da pele é dada pela derme, que é composta principalmente pela matriz extracelular (MEC) onde os fibroblastos sintetizam alguns de seus componentes, como o colagénio e a elastina, que a sustentam e lhe dão elasticidade. O colagénio é um dos principais materiais resistentes ao stress da pele. As fibras elásticas, por outro lado, desempenham um papel na manutenção da elasticidade, mas fazem muito pouco para resistir à deformação e à rutura da pele (Sadaf Hashim Hussain *et al.*, 2013).

A derme tem duas camadas, a superficial (camada papilar) e a mais profunda (camada reticular). A camada papilar é uma fina camada de derme localizada imediatamente abaixo da epiderme e cobre as papilas dérmicas. A matriz do tecido conjuntivo hospeda células do tecido conjuntivo distribuídas aleatoriamente, colagénio principalmente do tipo III, misturado a uma rede de fibras elásticas soltas e muitos capilares que nutrem as camadas avasculares da epiderme e regulam a temperatura corporal. A camada reticular é uma mistura de tecido conjuntivo denso contendo principalmente feixes de fibras de colagénio tipo I com fibras elásticas grossas. A derme hospeda também folículos capilares, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, vasos sanguíneos, nervos e recetores sensoriais (Arda *et al.*, 2014).

A hipoderme, é uma camada de tecido conjuntivo laxo que liga a pele aos órgãos internos. Ela contém gordura subcutânea e tecido laxo, proporcionando amortecimento, termorregulação e estabilidade da pele, conectando a derme aos órgãos internos (Farage *et al.*, 2007).

1.5 Os Radicais Livres e o envelhecimento da pele

Espécies reativas de oxigénio (ERO), espécies reativas de nitrogénio (ERN), hidrogénio atômico, alguns metais pesados de transição, cloro, determinados medicamentos, radiação ionizante e resíduos ambientais são tipos diferentes de radicais livres (Valko *et al.*, 2007). Os radicais livres ou espécies reativas são inevitavelmente gerados pelo organismo, já que são necessários no processo de respiração

celular que ocorre nas mitocôndrias, a fim de gerar a energia na forma de adenosina trifosfato (ATP)(Poyton *et al.*, 2009).

O efeito nocivo dos radicais livres que causam potencial dano biológico é denominado stress oxidativo e stress nitrosativo. Isso ocorre em sistemas biológicos quando há uma superprodução de ERO/ERN por um lado e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos por outro. Em outras palavras, o stress oxidativo resulta das reações metabólicas que usam oxigênio e representam um distúrbio no status de equilíbrio das reações pró-oxidantes e antioxidantes nos organismos vivos. Por esse motivo, o stress oxidativo tem sido implicado em várias doenças humanas, bem como no processo de envelhecimento. O equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais dos radicais livres é um aspecto muito importante dos organismos vivos (Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2007).

As ERO podem ter efeitos benéficos, pois podem agir como esterilizadores químicos em nosso mecanismo de defesa ou operar como moléculas reguladoras em várias vias de sinalização intracelular (Martin & Feng, 2009), outro exemplo benéfico de ERO em concentrações baixas/moderadas é a indução de uma resposta mitogénica (Valko *et al.*, 2007). Entretanto, no geral, as ERO são considerados compostos tóxicos. Em 1956, Denham Harman propôs que as ERO são determinantes do processo de envelhecimento, pois em excesso podem danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando à disfunção celular e à morte (Harman, 1956).

A geração de ERO, incluindo oxigênio singleto, radical hidroxilo, anião superóxido e peróxido de hidrogênio, bem como a libertação de ferro 'livre', leva a níveis significativos de stress oxidativo (Cefali *et al.*, 2016). Em pesquisas recentes, níveis alterados de ERO foram implicados em doenças como Alzheimer, Parkinson, aterosclerose, artrite reumatoide, diabetes, psoríase, fibrose cística, hipertensão, isquemia e cancro (Benz & Yau, 2008).

A pele está exposta ao stress oxidativo, tanto de origem endógena como exógena, estando poucos tecidos no corpo sujeitos a semelhantes níveis de exposição. As fontes exógenas incluem poluentes do ar, o ozono e altas concentrações de oxigênio, radiações ionizantes e não-ionizantes, presença de bactérias patogénicas, vírus, e diferentes químicos e toxinas exógenas. As fontes endógenas incluem enzimas associadas à produção indireta de ERO, como por exemplo, a xantina oxidase que converte a xantina em ácido úrico, algumas células como os neutrófilos envolvidas no processo imune do organismo, algumas doenças (Kohen, 1999) e produção de energia pelas células (Inoue, 2017). A Tabela 4 resume as principais fontes de espécies reativas a que a pele está exposta.

Tabela 4 - Principais causas de stress oxidativo na pele. Adaptado de Kohen (1999)

Causas	
Fontes Exógenas	Poluentes (fumaça de cigarro)
	Gases atmosféricos (ozônio)
	Químicos (ácidos, herbicidas, toxinas)
	Agentes patogénicos (vírus, bactérias)
	Radiação (UV, radiação ionizante)
Fontes Endógenas	Enzimas (xantina oxidase, NO sintase)
	Células (Neutrófilos)
	Processos patológicos (eventos isquémicos e pós isquémicos)
	Doenças (psoríases, cancro)
	Produção de energia celular

Os sinais do envelhecimento tornam-se evidentes ao longo do tempo e as alterações cutâneas constituem a sua primeira evidência óbvia (Makrantonaki & Zouboulis, 2007). O envelhecimento cutâneo é o resultado cumulativo de dois componentes comumente denominados “intrínseco” e “extrínseco” que serão minuciados na Tabela 5.

O processo de envelhecimento intrínseco ou cronológico é uma consequência inevitável de alterações fisiológicas e genéticas e não ocorre apenas na pele, mas também em todos os outros tecidos e órgãos do corpo e é resultante do declínio “geneticamente programado” das funções que garantem o bom funcionamento do organismo. Já o componente extrínseco depende de fatores externos, como exposição à luz solar, poluição, tabagismo, hábitos alimentares, entre outros e é estimado em 80% dos sinais visíveis do envelhecimento da pele (Rodan *et al.*, 2016).

A luz solar é o componente externo mais prejudicial à pele e por esse motivo, o envelhecimento extrínseco é muitas vezes referido como fotoenvelhecimento. O fotoenvelhecimento é caracterizado por rugas, hiperpigmentação, telangiectasia, queratose actínica e maior risco de cancro de pele em áreas expostas ao sol, como rosto e pescoço (Inoue, 2017).

Tabela 5 - Principais causas, mecanismos moleculares e manifestações clínicas dos processos intrínsecos e extrínsecos de envelhecimento da pele. Adaptado de (Cavinato, 2018).

	Causas	Mecanismos moleculares	Manifestações histológicas	Manifestações clínicas
Envelhecimento Intrínseco	Passagem do tempo	Encurtamento de telômeros	Diminui a espessura da epiderme	Rugas finas
	Genética	Stress oxidativo	Achatamento da junção dermoepidermal	Deficiência da função da barreira da pele
		Diminuição da função do sistema de reparo de danos a ADN	Aumenta a perda de água transepidermal	Aumenta a vulnerabilidade
		Diminuição do tempo de renovação da epiderme	Atrofia do colagénio reticular da derme	Pele seca
		Aparecimento de células senescentes	Atrofia do sistema de fibras elásticas	Pele embotada
		Redução do número de melanócitos e células de Langerhans	Atrofia dérmica	Pele enrugada
Envelhecimento extrínseco	Exposição a raios UV	Inflamação	Perda progressiva dos glicosaminoglicanos Redução do colagénio fibrilar	Rugas profundas
	Fumaça de cigarro	Danos ao ADN	Perda do colagénio VII da junção dermoepidermal	Distúrbios de pigmentação
	Hábitos alimentares	Stress oxidativo	Elastose solar (acumulação das fibras elásticas parcialmente degradadas)	Palidez
	Poluição ambiental	Aparecimento de células senescentes	Remodelação da Matriz extracelular	Elasticidade reduzida
		Aumento da expressão e da atividade da matriz metaloproteinase	Níveis reduzidos de ácido Hialurónico	Flacidez
		Diminuição da expressão dos pró colagénios	Híper queratose	Danos à função da barreira da pele
		Produção anormal de melanina	Hipertrofia dérmica	Aumento da vulnerabilidade

A radiação solar UV penetra na derme para atingir o tecido subcutâneo e afeta os componentes epidérmicos e dérmicos da pele, seus efeitos deletérios são cumulativos, irreversíveis e atualmente são uma grande preocupação para a saúde. Ela é capaz de produzir alterações bioquímicas e fisiológicas, incluindo alterações no colágeno e nas fibras elásticas, perda de tecido adiposo subcutâneo e alterações foto carcinogénicas (Cefali *et al.*, 2016).

Os radicais peroxil, o oxigênio molecular singleto e os aniões superóxido são os principais ERO formados na pele humana exposta à irradiação UV, o que pode resultar na degradação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Essa degradação resulta em várias condições patológicas da pele, como eritema, envelhecimento prematuro e até carcinomas dermatológicos (Kashif *et al.*, 2017). Além disso, a oxidação proteica estimula a liberação de moléculas de sinais inflamatórios e a peroxirredoxina 2 (PRDX2) tem sido reconhecida como um sinal inflamatório. Muitos autores têm documentado a relação entre stress oxidativo e inflamação. As evidências indicaram que o stress oxidativo desempenha um papel patogênico nas doenças inflamatórias crônicas (Tarique Hussain *et al.*, 2016).

A inflamação é um mecanismo de defesa natural contra patógenos e está associada a muitas doenças patogénicas, como infeções microbianas e virais, exposição a alérgenos, radiação e produtos químicos tóxicos, doenças autoimunes e crônicas, obesidade, consumo de álcool, uso de tabaco e dieta hipercalórica (Tarique Hussain *et al.*, 2016). Ela é geralmente mediada por diferentes estímulos exógenos e endógenos que podem ativar o sistema imunológico celular levando-o a produzir algumas citocinas pró-inflamatórias. A ciclooxygenase-2 (COX-2) na pele humana é o principal agente-chave na inflamação induzida por UV, formação de rugas, edema, hiperplasia epidérmica e carcinogénese (Kashif *et al.*, 2017).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina bacteriana exógena que pode ativar macrófagos, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator necrótico tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2). A inflamação é regulada pela hemeoxigenase-1 (HO-1), que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias. O fator-kB nuclear (NF-kB) tem sido considerado um fator importante envolvido na resposta imune e inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias podem induzir também a expressão de moléculas de adesão vascular e dérmica, quimiotaxia de células inflamatórias e ativação de outros mediadores inflamatórios como leucotrienos e prostaglandinas (Kashif *et al.*, 2017).

A inflamação crônica acompanhada de uma reação inflamatória fraca pode ocorrer repetidamente e sem sinais como inchaço, febre, erupção e dores. A inflamação crônica é a reação inflamatória constante propagada pela produção de citocinas e migração de células imunes, que é induzida por

ligantes endógenos, quando as células são expostas ao stress e danos e também pode ser uma reação inflamatória devida a xenobióticos extrínsecos. Ela resulta em síndromes metabólicas, tumores malignos, resposta autoimune, doenças alérgicas, cardiovasculares e neurodegenerativas (Inoue, 2017).

Neste contexto, as pesquisas na área dermatológica e de cosméticos têm evoluído na busca por novos métodos de estudo e novas matérias primas, com o objetivo de desenvolver produtos capazes de melhorar e/ou reverter os sinais do envelhecimento, mantendo sempre a segurança de uso, estabilidade e eficácia, propiciando maior bem-estar aos consumidores.

1.6 Cosméticos

Atualmente, com o aumento da esperança média de vida, há pressão da opinião pública para a manutenção de uma aparência jovem até uma idade mais tardia, a preservação da aparência jovem representa socialmente, um requisito para a idealização da beleza. Entretanto, este fenómeno não é recente, uma vez que a história da humanidade demonstra uma constante busca da juventude e a superação do envelhecimento (Makrantonaki & Zouboulis, 2007).

Há rastros de que os cuidados cosméticos são utilizados pelo homem desde o Paleolítico, quando utilizavam gorduras animais para proteger o corpo e argilas com sumos de plantas e sementes para adorná-lo. Milhares de anos depois nas culturas orientais antigas, extratos de ervas, sementes e águas aromatizadas, eram usados como ingredientes cosméticos. Sumérios e Babilónios preparavam unguentos e comercializavam essências aromáticas e perfumes, entretanto foram os egípcios que se especializaram na produção dos cosméticos e Cleópatra se converteu em um expoente da beleza que se exaltava com o uso de remédios e cosméticos naturais (Nardinic *et al.*, 2015).

De acordo com as normas europeias, o “REGULAMENTO (CE) N.º 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO,” define produto cosmético, como qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contato com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais, com exceção das substâncias ou misturas que se destinem a ser ingeridas, inaladas, injetadas ou implantadas no corpo humano.

A definição de cosméticos é muito similar em todo o mundo, apesar disto existem diferenças entre os países no que diz respeito às definições legais de medicamentos e cosméticos, requisitos de registro e restrições ao uso de ingredientes podem fazer alguns produtos, como os filtros solares, serem

regulamentados como cosméticos na Europa, enquanto são regulamentados como medicamentos nos Estados Unidos (Toklu *et al.*, 2019).

Como demonstrado na Figura 7, uma ampla gama de produtos pode ser categorizada como cosméticos e cosmecêuticos. Eles podem ser classificados em produtos para cuidados com a pele, cuidados com os cabelos, agentes colorantes, fragrâncias e produtos para cuidados gerais.

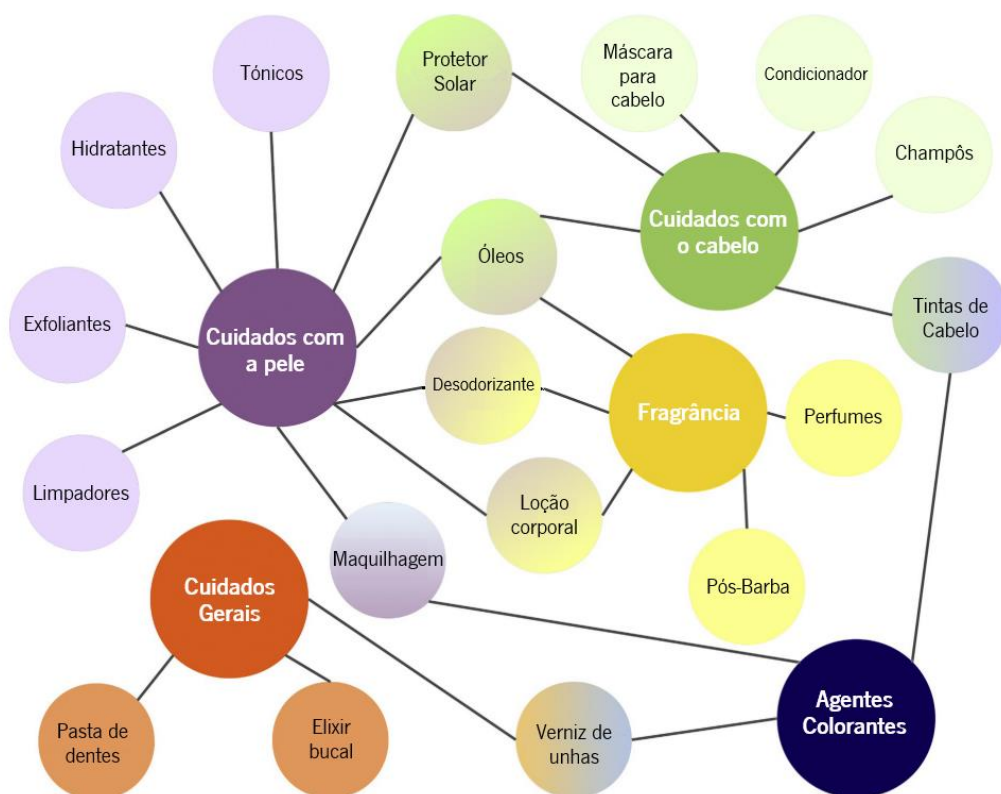


Figura 7 - Os principais tipos de produtos cosméticos e/ou cosmecêuticos disponíveis no mercado, divididos por categorias. Adaptado de Cavinato (2018).

Os produtos para a pele são projetados para alterar a aparência ou a textura da pele. Os produtos capilares, por sua vez, têm a função de modificar a aparência, a estrutura ou a cor dos cabelos. Os corantes são produtos decorativos capazes de alterar temporariamente a cor da pele, do cabelo e das unhas. As fragrâncias são formulações perfumadas direcionadas para alterar os odores naturais do corpo. E os produtos de cuidados gerais são aqueles projetados para promover a limpeza e o cuidado de outras partes do corpo além da pele e do cabelo. Cada uma dessas categorias pode ser dividida em várias subcategorias, sendo que alguns produtos podem pertencer a mais de uma categoria ao mesmo tempo e, dessa forma, exercer mais de uma função (Cavinato, 2018).

O mercado de cosméticos está em crescimento e, apesar da crise econômica mundial dos últimos anos, mais de 5 bilhões de produtos cosméticos ainda são vendidos a cada ano, sendo os itens mais consumidos os cuidados com a pele (Barbulova *et al.*, 2015).

Avanços científicos e tecnológicos significativos promoveram a convergência entre as indústrias farmacêutica, nutricional e cosmética, permitindo a criação de novas áreas de atividade e novas classes de produtos de cuidados pessoais, como cosmecêuticos, nutracêuticos e nutricosméticos. O termo cosmecêutico deriva da interseção entre produtos farmacêuticos e cosméticos. Cosmecêuticos ou dermocosméticos são definidos como produtos de aplicação tópica que não são apenas cosméticos, pois têm a capacidade de alterar a estrutura e fisiologia da pele e cabelos, mas não são considerados medicamentos, pois não são submetidos aos mesmos testes rigorosos (Husein el Hadmed & Castillo, 2016). Exemplos de cosmecêuticos populares incluem hidratantes, retinoides, antioxidantes e despigmentantes (Brandt *et al.*, 2011).

Devido às crescentes demandas de marketing, muito investimento foi feito em pesquisas para explorar os efeitos potenciais dos ingredientes ativos na pele. Atualmente a indústria de cosméticos e cosmecêuticos comprovam suas alegações de eficácia com dados científicos e ensaios clínicos. A vasta gama de técnicas disponíveis para investigar as respostas da pele a múltiplos estímulos, com base em um entendimento robusto da fisiologia da pele e suas respostas variadas aos insultos ambientais, trouxe uma nova era no desenvolvimento cosmético e dermocosmético (Cavinato, 2018).

A importância da pesquisa cosmética não está relacionada apenas à melhoria da aparência geral da pele, mas também visa oferecer uma melhor qualidade de vida, atuando através da prevenção e tratamento de distúrbios da pele relacionados ao processo de envelhecimento, com benefícios não apenas para a própria pele, mas para o organismo como um todo (Rodan *et al.*, 2016).

1.7 Produção de cosméticos com plantas

O reino vegetal oferece infinitos benefícios ao homem, que soube utilizá-los de inúmeras formas e para múltiplos propósitos. Se utilizadas com sabedoria, as plantas, através de suas cores, aromas e princípios ativos, são capazes de restituir a força, aliviar condições físicas adversas e trazer bem-estar e beleza (Nardinic *et al.*, 2015).

Uma variedade de constituintes das plantas tem efeitos positivos na pele. Os polifenóis são uma grande família destes constituintes que ocorrem naturalmente nas plantas e podem ser encontrados principalmente em frutas, vegetais, nozes, folhas, cascas e sementes. Eles são muito conhecidos por sua forte atividade antioxidante e por possuírem substancial efeito de fotoproteção da pele (André *et al.*,

2017). Eles funcionam como antioxidantes exógenos, devido a um grupo hidroxilo (-OH) ligado a um anel aromático que atua como um doador de hidrogênio ou elétron para radicais livres ou outras espécies reativas (Campa & Baron, 2018).

Os flavonóides são utilizados em dermatologia e cosméticos há muito tempo. A principal razão para a crescente popularidade dessas substâncias são suas atividades bioquímicas benéficas e a sua capacidade de penetrar na pele. Os dados disponíveis indicam que os compostos desse grupo penetram pelo do estrato córneo e podem atingir as camadas viáveis da epiderme e derme (Piana *et al.*, 2013)

Novos compostos de materiais vegetais, com capacidade de absorver ou bloquear a radiação UV, foram extensivamente pesquisados para o desenvolvimento de produtos para a proteção da pele contra a radiação solar (Cefali *et al.*, 2016). Há também um número crescente de estudos avaliando os efeitos antioxidantes de extratos de plantas incorporados em cremes e loções para uso tópico. Alguns compostos fenólicos, como epigallocatequina-3-galato (EGCG) do chá verde, demonstraram proteger contra danos no ADN induzidos por UV e supressão imunológica, permitindo que esse componente seja incorporado em formulações convencionais de filtro solar para aumentar a foto proteção fornecida pelos filtros UV (Matsui *et al.*, 2009).

Globalmente, os cosméticos derivados de plantas têm mercados amplos com tendência de crescimento a cada ano. Analisando a razão pela qual estes produtos vêm se destacando no mercado internacional, pode-se constatar que em parte decorre das várias funções terapêuticas que eles exercem sobre a pele, que recentemente tem recebido grande atenção por parte das pessoas, além de normalmente terem características de baixa toxicidade se comparados aos cosméticos tradicionais (Yujuan Li *et al.*, 2018).

Produtos botânicos são definidos como produtos derivados de plantas. Em várias pesquisas estes produtos têm demonstrado o potencial de neutralizar alguns dos sinais de envelhecimento da pele, apresentando funções de fotoproteção, diminuição da perda transepidérmica de água (TEWL - *Transepidermal Water Loss*), aumento da elasticidade da pele, aumento da formação de colagênio, diminuição da pigmentação facial e efeitos antioxidantes na pele (Campa & Baron, 2018). Alguns destes produtos, com suas aplicações e tipos de estudos realizados serão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Exemplos de produtos botânicos com suas funções antienvhecimento e os tipos de estudos e resultados observados. Adaptado de (Campa & Baron, 2018)

Produto botânico	Tipos de estudos	Potenciais efeitos antienvhecimento	Efeitos antienvhecimento observados em humanos
Óleo de Argão (<i>Argania sponosa</i>)	Estudos em animais e em humanos.	Diminuição da hiperpigmentação devido a inibição da tirosinase, diminuição da perda de água transepidermica, melhora da elasticidade e efeito antioxidante.	Diminuição da perda de água transepidermica, melhora da elasticidade.
Óleo de coco (<i>Cocos nucífera</i>)	Estudos <i>in vitro</i> , em animais e em humanos.	Emoliente, umectante, diminuição da perda de água transepidermica, anti-inflamatório, diminuição do tempo de cicatrização, aumento do colagénio.	Diminuição da perda de água transepidermica.
Açafrão (<i>Crocus sativus</i>)	Estudos <i>in vitro</i> .	Antioxidante, protege o esqualeno contra a peroxidação induzida por UV, evita a liberação de mediadores inflamatórios, anti-inflamatório.	N/A
Matricária (<i>Tanacetum parthenium</i>)	Estudos <i>in vitro</i> , em animais e em humanos.	Anti-inflamatório (inibe NF-κB), melhora a atividade endógena de reparo do ADN, diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias, antioxidantes.	Antioxidante, diminui o eritema causado por radiação UV.
Chá verde (<i>Cammelia sinensis</i>)	Estudos <i>in vitro</i> , em animais e em humanos.	Antioxidante, fotoprotetor, imunomodulador, anti-angiogénico, anti-inflamatório.	Diminuição do VEGF e HIF-1α, prevenção parcial de danos oxidativos causados por UV, redução da depleção de células de Langerhans.
Margarida (<i>Calendula officinalis</i>)	Estudos <i>in vitro</i> , em animais e em humanos.	Antioxidante	Melhora a tensão da pele.
Romã (<i>Punica granatum</i>)	Estudos <i>in vitro</i> , em animais e em humanos.	Anti-inflamatório, protege o fibroblasto da morte celular induzida por UV, aumento do reparo do ADN.	Diminuição do eritema facial, diminuição da pigmentação facial devido à inibição da tirosinase.
Soja (<i>Glycine max</i>)	Estudos <i>in vitro</i> , em animais e em humanos.	Antioxidante, aumento da proliferação de fibroblastos e aumento da síntese de colágeno I e III, diminuição da MMP-1, aumento do colágeno e elastina.	Aumento do colágeno facial tipo I e III, diminuição do eritema após a exposição a radiação UVB, melhora da pigmentação facial, melhora da textura da pele, redução de linhas finas, melhora do tom de pele.

Para que uma planta possa ser incorporada a um produto tópico, como os cosméticos ou cosmeceúticos, elas passam por um processo altamente complexo, com várias etapas de processamento químico, que influenciam muito o resultado final do extrato botânico a ser adicionado à fórmula. Uma única planta tem centenas de fitoquímicos e compostos ativos, sendo que a parte da planta escolhida para se obter o extrato é, portanto, crucial e pode incluir frutos, folhas, raízes, cascas, flores e caule. As diferentes partes da planta possuem constituintes químicos variados, além disso, condições sazonais e

climáticas, bem como a quantidade de água disponível, são fatores adicionais que influenciam a qualidade de um extrato obtido. Por fim, a eficácia do extrato da planta adicionada a uma preparação tópica depende de sua concentração, que às vezes é adicionado em quantidades tão pequenas que fornece mais marketing do que benefícios à pele (Allemann & Baumann, 2009).

A aplicação de ingredientes naturais nos produtos cosméticos pode ser ainda melhor quando se utiliza matrizes naturais amplamente disponíveis, principalmente quando se é possível obtê-las a baixo custo. Essa demanda pode ser efetivamente atendida pelos subprodutos de frutas que permanecem no processamento industrial. Na verdade, essa abordagem poderia resolver um problema ecológico, uma vez que o crescimento do setor agroindustrial levou à geração de grandes quantidades de resíduos de frutas e vegetais. Sem dúvida, os extratos obtidos dos subprodutos representam uma alternativa “verde” em relação aos extratos regulares de derivados de plantas, comumente usados em cosméticos. Além de seus comprovados efeitos benéficos na pele humana, os subprodutos agroalimentares têm a vantagem de serem bio sustentáveis e baratos (Barbulova *et al.*, 2015).

Embora atualmente o tratamento do envelhecimento da pele seja tecnologicamente mais invasivo, os produtos à base de plantas ainda são relevantes podendo ser altamente eficazes. Pesquisas científicas continuam a corroborar os benefícios dos usos tradicionais de muitas plantas para a pele e procuram elucidar mecanismos bioquímicos de ação para um número crescente de fitoquímicos. Adicionalmente à importância de novas pesquisas de otimização para a aplicação destes ingredientes naturais nos cosméticos, os ensaios clínicos para a sua validação científica relativamente à segurança e eficácia destes extratos e compostos nestas formulações é extremamente necessária (Mukherjee *et al.*, 2011).

1.8 Avaliação da segurança e eficácia de produtos cosméticos

O processo para desenvolvimento de um produto cosmético envolve várias etapas, que vão desde análise das tendências de mercado e dos regulamentos específicos, definição e estudo das substâncias da formulação, escolha das principais características e atributos do produto, até por fim sua validação, garantindo assim a sua segurança e eficácia aos consumidores.

Segundo Wang *et al.* (2015), as principais exigências dos consumidores em relação aos produtos cosméticos são itens seguros, eficazes, protetores, resilientes, naturais e com boa qualidade sensorial, conforme pode ser observado na Figura 8. Para a maioria destes requisitos existem testes instrumentais e ensaios *in vitro* e *in vivo* que podem ser realizados para garantir a segurança, qualidade e destaque do produto no mercado.



Figura 8 - Requisitos dos consumidores para os produtos cosméticos. Adaptado de Wang *et al.* (2015).

De acordo com o “REGULAMENTO (CE) N.º 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO” (2009) o requisito mais importante dos produtos cosméticos é ser seguro para a saúde humana quando usados em condições de utilização normal ou razoavelmente previsíveis. Para garantir isto, a empresa responsável deve certificar de que foram submetidos a uma avaliação da segurança com base nas informações relevantes estabelecidas neste regulamento que determina requisitos legais obrigatórios para todos os produtos cosméticos comercializados na Comunidade Europeia.

A aplicação de formulações cosméticas pode levar a efeitos indesejáveis causados por um de seus constituintes, sendo as fragrâncias e os conservantes a principal causa desses efeitos, que são de natureza alérgica e podem variar de leve urticária a dermatite de contato. Os principais elementos na avaliação da segurança de um produto cosmético são: o uso pretendido do produto e a concentração dos ingredientes na formulação (Mahmood & Akhtar, 2013).

No sentido de evitar e diminuir as probabilidades de efeitos indesejáveis é recomendado a realização de testes de compatibilidade confirmatória dos cosméticos em voluntários humanos. Para estudos de irritação da pele, há métodos subjetivos de avaliação visual que geralmente são aplicados e garantem bons resultados. Como nesses testes o objetivo é demonstrar uma ausência de efeito, nem sempre é necessário que o teste seja comparativo, ou seja, envolva controles positivos e negativos. Por outro lado, técnicas não invasivas utilizando instrumentos de medição, podem ser aplicadas para quantificar os resultados, torná-los mais objetivos e até para medir alguns sintomas subclínicos como eritema, secura e descamação da pele (Mahmood & Akhtar, 2013).

O conhecimento das vias de penetração na pele é essencial na avaliação da segurança química, sistema de liberação de medicamentos e formulação de produtos cosméticos (Honari *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, vários modelos *in vitro*, *ex vivo*, *in silico* e matemáticos foram desenvolvidos para estudar e prever a permeação da barreira cutânea e a penetração de agentes exógenos na pele. Porém nenhuma dessas metodologias pode simular completamente as condições reais em seres humanos. Há também alguns métodos de avaliação *in vivo* que envolvem procedimentos invasivos e exibem certas desvantagens. Assim, justifica-se o desenvolvimento constante de novos métodos *in vivo* para pesquisa de barreira cutânea e penetrações transcutâneas (Darlenski *et al.*, 2009).

Os dispositivos de medição comercialmente disponíveis que permitem a avaliação quantitativa da função do estrato córneo e fornecem dados contínuos são um avanço importante na dermatologia experimental. A medição da hidratação da superfície da pele ganhou considerável interesse nos últimos anos porque o teor de água do estrato córneo influencia várias características físicas da pele, como função da barreira, penetração do medicamento e propriedades mecânicas (O'Goshi & Serup, 2005).

Os corneômetros ganharam aceitação mundial como um instrumento eficiente para medir a variação do conteúdo de água na epiderme, particularmente a hidratação da pele e o efeito dos tratamentos. Essa aceitação também se deve à sua alta reprodutibilidade, fácil manuseio, curto tempo de medição e economia (O'Goshi & Serup, 2005).

Muitos produtores de cosméticos usam a medição TEWL para comprovar clinicamente os efeitos e atributos de seus produtos, como suavidade, redução de reações irritativas da pele, hidratação da pele, reparação da pele, efeito protetor contra danos UV e antitranspirante. Esse teste também pode rastrear ingredientes que tenham um efeito benéfico na função de barreira e oferecer a possibilidade de monitorar *in vivo*, na pele humana, o efeito do tratamento tópico de maneira objetiva e não invasiva (Rogiers, 2001).

A avaliação biometrológica de produtos cosméticos foi um grande passo no desenvolvimento de novos produtos e permitiu aos fabricantes garantir aos consumidores a segurança e eficácia dos produtos cosméticos comercializados. Sem essa instrumentação é quase impossível determinar os efeitos dos produtos na pele. A avaliação subjetiva e objetiva da eficácia dos produtos, no entanto, é mutuamente dependente. Uma medição objetiva não pode ser executada sem um gráfico de interpretação subjetiva para os resultados medidos; uma avaliação subjetiva da pele sem a técnica de medição adequada também não é capaz de obter resultados precisos (Fluhr, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo final deste trabalho foi desenvolver uma formulação cosmecêutica contendo o extrato metanólico de folhas ou do extrato de resíduo alcoólico do dióspiro (*Diospyros kaki*), com valorização de subprodutos industriais e validá-la *in vivo*, garantindo sua segurança e eficácia para os consumidores.

2.2 Objetivos específicos:

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção do material vegetal do dióspiro: folhas verdes (colhidas nos meses de fevereiro, abril e julho) e folhas vermelhas (colhidas no mês de outubro) e o resíduo da fermentação alcoólica (biomassa fermentada resultante da produção de vinagre de dióspiro), para obtenção dos extratos a serem estudados;

- Preparação e processamento dos materiais/matéria prima para a produção dos extratos;

- Produção dos extratos metanólicos das folhas verde e vermelhas e do subproduto da fermentação alcoólica do dióspiro;

- Análise qualitativa do perfil fitoquímico dos extratos utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC);

- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos, utilizando ensaios bioquímicos (DPPH, ICA, Óxido Nítrico e Superóxido);

- Avaliação da atividade de citotoxicidade e citoproteção dos extratos, utilizando as linhas celulares queratinócitos HaCaT e fibroblastos L929;

- Desenvolvimento de formulações cosmecêuticas contendo os extratos de dióspiro;

- Avaliação *in vivo* das formulações cosmecêuticas desenvolvidas, recorrendo a voluntários e utilizando instrumentos de medição da pele.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os principais materiais e reagentes utilizados nos ensaios deste trabalho estão listados na Tabela 7.

Tabela 7 – Materiais e reagentes utilizados nos ensaios.

Material	Marca
Cloreto de potássio (KCl)	Sigma-Aldrich
Cloreto-4-hidrato de ferro II (Fe^{2+})	Sigma-Aldrich
Coluna para HPLC LiChrospher® 100 RP-18 de fase reversa	Merck
DCF-DA (2', 7'-diclorofluorescina-diacetato)	Sigma-Aldrich
Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich
DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	Sigma-Aldrich
EDTA (Ácido etileno diamino tetra acético)	Sigma-Aldrich
Etanol	Fergus
FBS (Soro fetal bovino)	Biochrom
Ferrozina (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt)	Sigma-Aldrich
L-glutamina	Sigma-Aldrich
Meio DMEM (do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich
Meio RPMI do (inglês Roswell Park Memorial Institute)	Sigma-Aldrich
Metanol (CH_3OH)	Sigma-Aldrich
Mix antimicótico e antibiótico	Sigma-Aldrich
MTT (Brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio])	Sigma-Aldrich
NBT (Azul de nitro tetrazólio)	Roche
NED (N-(1-naftil) etilenodiamida)	Sigma-Aldrich
PMS (Metossulfato de fenazina)	ACROS Organics
SNP (Nitoprussiato de sódio)	Sigma-Aldrich
Sulfanilamida	-
t-BHP (hidroperóxido de terc-butilo)	Sigma-Aldrich
Tripsina	Biochrom
Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)	Sigma-Aldrich

Os principais equipamentos utilizados nos ensaios estão listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Equipamentos utilizados durante os ensaios.

Equipamento	Marca
Aagitador Orbital SO1	Stuart
Aparelho de HPLC-DAD LabChrom Elite	Hitachi
Balança Analítica AG245	Mettler Toledo
Banho de aquecimento 461	Buchi
Banho de imersão GD100	Grant Instruments
Câmara de fluxo laminar BIO II A	Telstar
Câmara de Neubauer 0,0025mm ²	Blau Brand
Centrífuga 2-16k	Sigma
Centrífuga 5804 R	Eppendorf
Cutometer dual MPA 580	Courage+Khazaka
Equipamento de água purificada Elix 5	Millipore
Equipamento de água ultrapura Mili-Q Synthesis A10	Millipore
Incubadora de CO ₂	Sanyo
Instrumento de dispersão Ultra-Turrax T25	IKA-WERKE
Leitor de microplacas iMark	Bio-Rad
Leitor de Microplacas SpectraMax Plus 384	Molecular Devices
Leitor de placas Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific
Liofilizador de laboratório Alpha 2-4 LDplus	CHRIST
Medidor de PH PH538	WTW
Micro centrífuga MicroStar12	VWR
Microscópio Invertido CK2	Olympus
Microscópio Invertido de Fluorescência IX71	Olympus
Misturador de laboratório L5T	Silverson
Rotavapor RE 121	Buchi
Tanque de Limpeza por Ultrasom 2510	Branson

4. MÉTODOS

4.1 Recolha do material vegetal

O material vegetal para fazer os extratos foi colhido em Portugal, numa quinta na cidade de Santo Tirso, distrito do Porto. As folhas verdes foram colhidas nos meses de fevereiro, abril e julho de 2017 e as vermelhas no mês de outubro de 2017. Estes períodos foram escolhidos no intuito de comparar as principais diferenças nos compostos ativos e a ação dos extratos nos diferentes ensaios celulares e bioquímicos. Para coleta, foram considerados os aspetos gerais das folhas, como: o estado de conservação, cor e aparência, sendo colhidas somente folhas sem danos visíveis ou manchas.

Os frutos que deram origem ao subproduto da fermentação alcoólica foram colhidos durante o mês de outubro de 2017, na mesma quinta em Santo Tirso. O material para o extrato de resíduo alcoólico foi fornecido pela investigadora Bárbara Ferreira e é resultante da biomassa de uma fermentação alcoólica de dióspiro (*Diospyros kaki*) usada na produção de vinagre em novembro de 2017.

4.2 Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos de folhas vermelhas e de folhas verdes, as folhas selecionadas foram lavadas e secas inicialmente à temperatura ambiente e posteriormente colocadas numa estufa a uma temperatura constante de 40°C por um período de uma semana. Após o processo de secagem, as folhas foram moídas num copo triturador e transformadas em pó fino e homogêneo; 100g deste pó foi pesado e colocado em um litro de solução de metanol e água destilada na proporção de 80:20 pelo período de sete dias à temperatura ambiente e em local escuro. Após esse tempo, a solução resultante foi filtrada com auxílio de um filtro de papel, foi centrifugada durante 5 minutos a 5000 RPM. O sobrenadante foi recolhido para um balão de vidro e o metanol foi evaporado no Rotavapor, sob pressão controlada e à temperatura de 35°C. O concentrado foi congelado a -80°C e posteriormente liofilizado. O extrato seco obtido foi pesado e armazenado à temperatura ambiente e em local escuro para posterior utilização.

Para o extrato de resíduo alcoólico, biomassa resultante da fermentação alcoólica do dióspiro foi recolhido e filtrado com o auxílio de um tecido de organza, para que se retirasse o excesso de líquido ainda existente. Após liofilização do material sólido este foi moído num copo triturador e transformado em pó fino e homogêneo, 100g do pó foram adicionados num litro de solução de metanol e água destilada na proporção de 60:40 durante sete dias à temperatura ambiente e em local escuro. Tal como

anteriormente a solução obtida foi filtrada e centrifugada por 5 minutos a 5000 RPM, o sobrenadante foi recolhido num balão de vidro e o metanol foi evaporado no Rotavapor, sob pressão controlada à temperatura de 35°C. O concentrado foi congelado a -80°C e posteriormente liofilizado. O extrato seco obtido foi pesado e armazenado à temperatura ambiente e em local escuro para posterior utilização.

Tanto os extratos de folhas como o de resíduo alcoólico foram ressuspensos em DMSO na concentração de 100mg/mL, armazenados em frascos âmbar que foram identificados e conservados em frigorífico à temperatura de 4°C durante todo o período da realização dos ensaios.

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é uma técnica versátil, robusta e amplamente utilizada para a separação de compostos naturais e é usada na química analítica e fitoquímica para identificar e quantificar os componentes individuais de uma mistura. Ela consiste na separação de diferentes constituintes de uma mistura, conforme as suas diferentes afinidades e polaridade, usando pressões altas para mover solventes através de uma coluna (Boligon & Athayde, 2014; Piana *et al.*, 2013). Vários autores descrevem o uso de HPLC para caracterização e quantificação de metabolitos secundários em extratos vegetais, principalmente compostos de fenol, esteróides, flavonóides, alcalóides (Boligon & Athayde, 2014).

Esta técnica utiliza uma coluna que contém uma fase estacionária, uma move a fase móvel e um detetor que mostra os tempos de retenção das moléculas. O tempo de retenção é caracterizado pelo tempo em que determinado composto sai da coluna e varia de acordo com as interações entre a fase estacionária, as moléculas analisadas e o solvente usado (Malviya *et al.*, 2010).

A cromatografia de fase reversa é a técnica de separação mais usada em HPLC devido à sua ampla gama de aplicações. Estima-se que mais de 65% de todas as separações por HPLC são realizadas no modo de fase reversa. As razões para isso incluem a simplicidade e versatilidade deste método, pois ele é capaz de lidar com compostos de polaridade e massa molecular diversas para identificar metabolitos secundários das plantas (Boligon & Athayde, 2014).

Para o processamento das amostras de folhas vermelhas, folhas verdes e resíduo alcoólico de dióspiro, foi utilizado o aparelho de HPLC-DAD (HITACHI, LaChrom Elite, Japão) controlado pelo software de computador EZChrome Elite. Os procedimentos foram realizados conforme método descrito em Dias *et al.* (1999).

As amostras para análise qualitativa de HPLC foram preparadas a partir dos extratos descritos anteriormente, para uma concentração final de 7,5 mg/mL em solução de metanol-água na proporção (80:20).

Para a identificação dos compostos foi injetado 20 µL de cada extrato. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna de fase reversa (LiChrospher 100. RP-18e. 5 µm) à temperatura ambiente. A detecção foi realizada numa faixa entre 250-600 nm e os cromatogramas foram registrados a 260, 280 e 350 nm. O sistema de solvente utilizado foi um gradiente de metanol, tendo-se usado o eluente A (ácido fórmico 0,1% em metanol) e o eluente B (ácido fórmico 0,1% em água ultrapura). A eluição foi efetuada usando o gradiente descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Descrição do gradiente de eluição da análise por HPLC-DAD.

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	5	95
5	5	95
30	50	50
40	90	10
45	90	10
50	5	95
60	5	95

4.4 Ensaios bioquímicos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das plantas tem recebido grande atenção por parte dos investigadores, uma vez que o elevado dano oxidativo foi identificado como responsável pelo desenvolvimento e progressão de diversas doenças. A atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único modelo de ensaio antioxidante, e na prática, vários procedimentos de ensaios *in vitro* são realizados para avaliar as atividades antioxidantes com as amostras de interesse. Atualmente, aproximadamente 19 métodos *in vitro* são usados para fins de avaliação de antioxidantes (Alam *et al.*, 2013).

Nestes ensaios, as plantas são geralmente avaliadas pela sua função como agentes redutores, doadores de hidrogénio, inibidores da produção de oxigénio singlete ou quelantes de metais (Pisoschi & Negulescu, 2012). Neste trabalho foram escolhidos os métodos DPPH, ICA, óxido nítrico e superóxido como pormenorizado em seguida, para avaliar os potenciais antioxidantes, sequestradores de radicais livres e como quelantes dos extratos de folhas e do resíduo alcoólico do dióspiro.

4.4.1 Atividade de sequestro do Superóxido

Os aniões superóxido desempenham papel importante na formação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radical hidroxilo e oxigênio singlete, que induzem danos oxidativos em lipídios, proteínas e ADN (Sun *et al.*, 2011). Eles são formados *in vivo*, através de três mecanismos principais: cadeia respiratória da mitocôndria, xantina oxidase e pela NADPH oxidase nos fagócitos (Apel & Hirt, 2004).

Um sistema não enzimático pode ser usado para avaliar o potencial de sequestrar o radical superóxido: o metossulfato de fenazina (PMS) é reduzido pela nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e reage com o oxigênio para produzir radicais superóxido. Esses radicais reagem com o cloreto de nitroazul-tetrazólio (NBT), reduzindo-o a formazano, um composto azul com absorção máxima a 560nm. Na presença de substâncias capazes de captar radicais superóxido, a taxa de redução de NBT diminui e, conseqüentemente, há uma diminuição na intensidade da cor que pode variar de amarelo claro a roxo escuro (Hanson *et al.*, 2006). Neste ensaio foi usado a metodologia de (Valentão *et al.*, 2001) com algumas modificações.

Para avaliar a atividade de sequestro do anião superóxido, os extratos foram diluídos em tampão fosfato nas seguintes concentrações: folhas vermelhas (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL), folhas verdes (12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL) e resíduo alcoólico (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL). Numa microplaca de 96 poços, foi adicionado a cada poço, 50 µL de extrato dissolvido em tampão, 50 µL de uma solução de NADH 1,97 mM, 150 µL de uma solução de NBT 81,5 µM e 50 µL de uma solução de PMS 16 µM. O ácido ascórbico, um antioxidante padrão, foi usado como referência química para comparar com o poder antioxidante dos extratos.

Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e a atividade anti-radicalar foi determinada espectrofotometricamente no leitor de microplacas a 560 nm após 5-7 minutos de reação, em que o tempo 0 corresponde à adição da solução de PMS. Todas as soluções foram preparadas diariamente e mantidas no escuro a 4°C.

Para calcular a percentagem de atividade de sequestro do anião superóxido foi usada a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição da redução NBT} = \frac{A_c - (A_a - A_b)}{A_c} \times 100$$

Onde:

A_c – absorvância do controlo

A_a – absorvância da amostra

A_b – absorvância do branco

Os resultados estão expressos em EC_{50} , ou seja, a concentração necessária para eliminação de 50% do radical superóxido e foram obtidos através da percentagem de inibição da redução de NBT em relação ao controlo. Portanto, na presença de extratos capazes de eliminar o anião superóxido, a taxa de redução do NBT diminui e, conseqüentemente, diminui a absorvância. Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism 8.0*.

4.4.2 Atividade quelante de Ferro (ICA)

Os metais de transição possuem um papel importante na geração de ERO nos organismos vivos. O ferro existe em dois estados de oxidação distintos: iões ferrosos (Fe^{2+}) e férricos (Fe^{3+}), sendo os últimos a forma biologicamente inativa do ferro. Entretanto, o Fe^{3+} pode ser reduzido à forma ativa Fe^{2+} , com produção de radicais hidroxilo, podendo estes causar peroxidação lipídica, modificação de proteínas e danos no ADN. A presença de agentes quelantes pode inativar os iões metálicos e potencialmente inibir os processos dependentes de metais (Andjelković *et al.*, 2006).

O ensaio da atividade quelante de ferro (ICA) que avalia a capacidade quelantes de Fe^{+2} dos extratos é quantificado espectrofotometricamente utilizando um complexo que resulta da conjugação de ferrozina (FZ) com ferro (Fe^{+2}) (Russo *et al.*, 2005). Neste trabalho foi utilizado um ensaio com base no método colorimétrico da ferrozina proposto por Carter (1971), que na presença do ião ferro, forma um complexo de cor magenta, cuja absorvância pode ser medida a 562 nm. Neste método, o potencial antioxidante é observado pela diminuição da absorvância visível pela descoloração da reação, que determina a quantidade de iões ferro remanescentes não quelados na mistura reacional. Dessa forma, quanto menor for a absorvância e a intensidade da coloração, maior será a capacidade de quelação dos iões ferro, e conseqüentemente, maior será o potencial antioxidante (Carter, 1971; Min *et al.*, 2011)

Numa microplaca de 96 poços foram adicionados respetivamente, 50 μ L de extrato (nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 μ g/mL, para folhas verdes e 156,25; 312,5; 625; 1250 e 2500 μ g/mL para folhas vermelhas e resíduo alcoólico), 50 μ L de sulfato de ferro (0,12 mM) preparado

com água ultrapura e 50 µL de ferrozina (0,6 mM) preparada com água ultrapura. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro, a placa foi levada ao leitor de placas SpectraMaxPlus onde foi feita a leitura da absorvância a 570 nm. Para os brancos foi utilizada água ultrapura em substituição à Ferrozina. O EDTA foi utilizado como referência para fazer uma curva de calibração e como referência química para comparação com o poder de quelação de ferro dos extratos. As diferentes soluções foram preparadas nos dias dos ensaios e mantidas protegidas da luz.

A atividade quelante de ferro expressa em percentagem de ferro quelado é calculada conforme a fórmula apresentada pela seguinte equação:

$$\% ICA = \frac{A_c - (A_a - A_b)}{A_c} \times 100$$

Onde:

A_c – absorvância da ferrozina com ferro, sem extrato;

A_a – absorvância da ferrozina com ferro e extrato;

A_b – absorvância do extrato sem ferrozina.

Os resultados expressos em EC_{50} foram obtidos a partir da percentagem de ICA relativamente à concentração de extrato e representam a concentração necessária para inibir a formação de 50% do complexo Fe-Ferrozina. Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism 8.0*.

4.4.3 Ensaio de redução do DPPH

Este ensaio é comumente aplicado na avaliação da atividade antioxidante de alimentos e plantas devido à sua simplicidade, eficiência e custo. O DPPH· é um radical livre que pode aceitar eletrões ou átomos de hidrogénio de antioxidantes. Conforme pode ser observado na Figura 9, após reagir com uma substância antioxidante, o DPPH é reduzido a hidrazina e sua cor púrpura característica muda para amarelo. Essa alteração colorimétrica permite avaliar a atividade antioxidante de diferentes substâncias através da leitura espectrofotométrica (Carmona-Jiménez *et al.*, 2014), sendo a tonalidade da solução proporcional à sua capacidade antioxidante (Miguel, 2007).

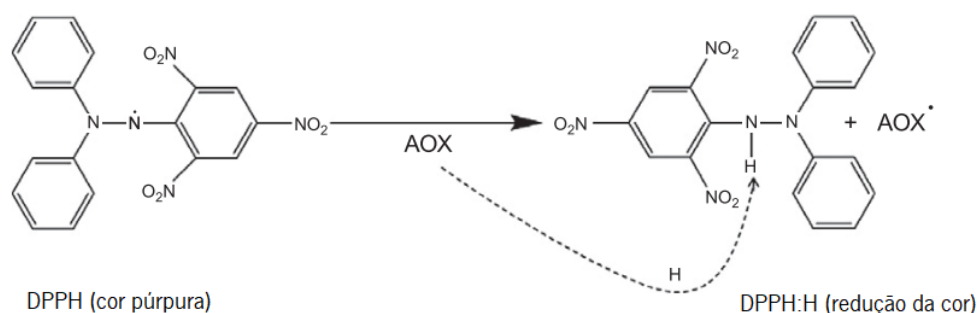


Figura 9 - Diagrama esquemático do ensaio DPPH. A doação de hidrogênio do antioxidante (AOX) para a molécula DPPH, origina a sua forma reduzida DPPH:H que causa a uma diminuição na cor da amostra e consequentemente na sua absorvância. Adaptado de Kusumawati & Indrayanto, (2013).

Para avaliar a atividade anti-radicalar, foram preparadas várias diluições dos extratos em etanol 100%, de forma a obter as seguintes concentrações finais: folhas vermelhas (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL), folhas verdes (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) e resíduo alcoólico (50; 100; 250; 500 e 1000 µg/mL). Na microplaca de 96 poços foram adicionados 10 µL de cada concentração de extrato e 140 µL de solução de DPPH (400 µM), exceto para os brancos em que foram adicionados 10 µL de cada concentração de extrato e 140 µL de etanol 100%. Para controlo positivo foi usado Trolox, um antioxidante de referência, em concentrações de (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µM) preparadas a partir de uma solução stock de 2 mM. O controlo negativo foi obtido pela adição de 10 µL de etanol e 140 µL da solução de DPPH. As amostras foram agitadas e mantidas à temperatura ambiente e no escuro por 60 minutos. Após esse tempo, foi medida a absorvância a 517 nm no leitor de microplacas SpectraMaxPlus. A solução de DPPH foi preparada no dia do ensaio e armazenada no escuro a 4°C.

A atividade de redução do DPPH é expressa em percentagem e é calculada de acordo com seguinte equação:

$$\% \text{ redução DPPH} = \frac{A_c - (A_a - A_b)}{A_c} \times 100$$

Onde:

A_c – absorvância do controlo

A_a – absorvância da amostra

A_b – absorvância do branco

Os resultados estão expressos em EC₅₀ obtidos em relação ao controlo e variam de acordo com a concentração de antioxidante necessária para causar uma diminuição de 50% na absorvância do DPPH.

Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism 8.0*.

4.4.4 Inibição da produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico, por conter um eletrão desemparelhado, é classificado como um radical livre exibindo uma reatividade importante com certos tipos de proteínas e outros radicais livres. A inibição *in vitro* do radical óxido nítrico é uma medida da atividade antioxidante. Sabe-se que o composto nitroprussiato de sódio (SNP) se decompõe em solução aquosa a pH fisiológico produzindo óxido nítrico. Em condições aeróbias, o $\text{NO}^\bullet$ reage com o oxigénio para produzir produtos estáveis (nitrato e nitrito). Os iões nitrito diazotizados com N-(1-naftil) etilenodiamida (NED) produzem um cromóforo rosa, cujas quantidades podem ser determinadas usando o reagente de Griess (Alam *et al.*, 2013; Boligon *et al.*, 2014).

O método baseia-se no fato de que, na presença de antioxidantes, há uma inibição da produção do radical óxido nítrico em solução salina que pode ser determinado com o reagente de Griess a 562 nm. Uma metodologia modificada a partir de (Colle *et al.*, 2012) foi utilizada para quantificação do NO.

Para avaliar a capacidade de captação de óxido nítrico dos extratos de dióspiro, foram preparadas diluições dos extratos em água ultrapura nas seguintes concentrações: 23,4375; 46,875; 93,75; 187,5 e 375 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos das folhas verdes e de folhas vermelhas e de 25; 50; 100; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de resíduo alcoólico. Numa microplaca de 96 poços foi adicionado 50 μL de SNP com 50 μL de cada concentração de extrato para as amostras e brancos das amostras e 50 μL de água ultrapura e 50 μL de SNP para o controlo e branco do controlo. A placa ficou por 140 minutos à luz e a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi adicionado 50 μL de reagente de Griess (Sulfanilamida a 1% e NED a 0,1% numa proporção de 1:1) às amostras e ao controlo. Aos brancos, do controlo e da amostra, foram adicionados 50 μL de tampão de ácido fosfórico, quando foi incubado por mais 10 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Após este período, a absorvância foi lida no leitor de microplacas a 570 nm. O ácido ascórbico, um antioxidante padrão, foi usado como referência química para comparar com o poder antioxidante dos extratos.

Os valores são expressos em percentagem de inibição da produção de nitrito relativamente ao controlo. Portanto, se os extratos tiverem uma boa capacidade de eliminar o $\text{NO}^\bullet$, a produção de nitrito diminui, assim como a absorvância.

Para calcular a percentagem de inibição da produção de óxido nítrico, foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição da produção de NO} = \frac{(A_c - A_{bc}) - (A_a - A_{ba})}{(A_c - A_{bc})} \times 100$$

Onde:

A_c – absorvância do controlo (SNP com reagente de Griess, sem extrato);

A_a – absorvância da amostra (SNP com reagente de Griess e extrato);

A_{bc} – absorvância do branco do controlo (SNP, sem extrato e sem reagente de Griess);

A_{ba} – absorvância do branco da amostra (extrato com SNP, sem reagente de Griess).

Os resultados estão expressos em EC_{50} e foram obtidos a partir da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico em relação à concentração do extrato, e representam a concentração de extrato necessária para inibir a produção de 50% de óxido nítrico. Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism* 8.0.

4.5 Ensaios *in vitro* usando fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT como linhas celulares

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Esta técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Ainda hoje é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro (Emanuele, 2014).

Existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. Quando comparada ao uso de animais, a economia, o uso de um ambiente controlado e a homogeneidade da amostra são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente a cultura de células, apesar de ser um modelo *in vitro*, que apresenta algumas diferenças em relação ao modelo *in vivo*, é a principal alternativa para a substituição dos animais nos experimentos de pesquisas (Emanuele, 2014).

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares, os queratinócitos humanos (linha celular HaCaT, ATTC) e os fibroblastos de ratinho (linha celular L929, ATTC) como principais meios para avaliação da citotoxicidade e citoproteção dos extratos de dióspiro. Ambas linhas celulares foram

fornecidas pela professora Ana Isabel Freitas T. Oliveira, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

4.5.1 Manutenção da Cultura Celular

Inicialmente, uma ampola de células congeladas de cada linhagem celular, armazenado em nitrogênio líquido, foi descongelado e o conteúdo, foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, onde foi cuidadosamente ressuspenso em 6 mL de meio completo. A suspensão de células foi então centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos e o sedimento ressuspenso em 6 mL de meio completo fresco, que foi transferido para uma frasco T25 de cultura estéril.

Para o procedimento de subcultura e preparação de ensaios, as soluções de meio de cultura, do PBS (Tampão Fosfato Salino) e da tripsina foram aquecidas em banho-maria, a 37°C. Todos os procedimentos foram realizados em camara de fluxo laminar. Para a desagregação das células do substrato, foi efetuada a sua lavagem com PBS e foi adicionada tripsina a 0,25%. Após confirmação ao microscópio que as células se encontravam destacadas foi colocado meio de cultura nos frascos, de modo a inibir a tripsina e o conteúdo foi suspenso de modo a ficar homogéneo.

As células de fibroblastos L929 foram cultivadas e mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS – *Fetal bovine serum*) e 1% de antibióticos. Foram subcultivadas 2 vezes por semana quando atingiam pelo menos 80% de confluência. As células de queratinócitos HaCaT, foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de FBS 2% de Glutamina e 1% de antibióticos. Foram subcultivadas 1 vez por semana quando atingiam pelo menos 80% de confluência. As culturas foram mantidas a 37°C numa incubadora de CO₂ humidificada contendo 5% de CO₂.

4.5.2 Avaliação de viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com MTT

Este ensaio parte do princípio de que as células metabolicamente ativas, têm a capacidade de reduzir o sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazólio), através da ação das enzimas desidrogenase mitocondriais. O sal de MTT tem coloração amarela, em solução aquosa. Após redução, precipita, convertendo-se em formazano de cor púrpura, conforme ilustração da Figura 10. O formazano intracelular resultante pode ser solubilizado e quantificado espectrofotometricamente sendo proporcional à quantidade de células viáveis (Mosmann, 1983). Neste trabalho foi utilizada metodologia de Ali-Boucetta *et al.* (2011) com algumas modificações.

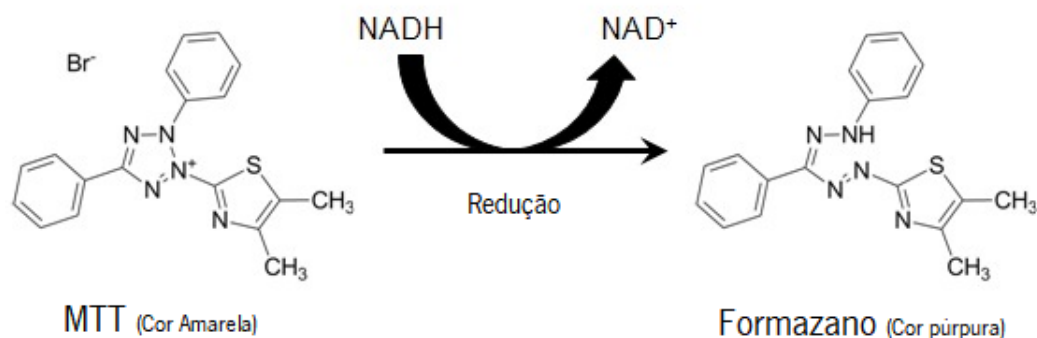


Figura 10 - Ilustração relativa à formação do produto formazano. Adaptado de Riss *et al.*, (2004).

A solução de MTT foi preparada, reconstituindo-se o pó do MTT em PBS 1x estéril para uma concentração final de 5 mg/mL. Foram feitas alíquotas de 2 mL e armazenadas a -20°C e protegido da luz até seu uso.

Após o término do período de incubação com os extratos e/ou insultos, de acordo com os ensaios, o meio foi aspirado da placa com 96 poços. Para os ensaios foi feita a diluição da solução MTT com meio sem FBS (na proporção de 1:10) e colocado em banho aquecido a 37°C. Foi adicionado 100 µL dessa solução a cada poço, a placa foi envolvida em papel alumínio e mantida na incubadora de atmosfera humidificada (5% de CO₂), a 37°C por 2 horas. Após este período, todos os poços foram aspirados e foi adicionado 200 µL de DMSO:Metanol (proporção 1:1) para solubilizar os cristais de formazano. A placa foi novamente envolvida em papel alumínio e colocada no agitador orbital até a solubilização dos cristais. A absorvância foi lida a 570nm no leitor de microplacas SpectraMax Plus 384.

Os resultados são expressos como a percentagem de viabilidade celular em comparação com as células de controle não tratadas, que é calculada usando esta equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_a}{A_c} \times 100$$

A_a – absorvância da amostra

A_c – absorvância do controle (células não tratadas)

Este ensaio foi usado para a avaliação da citotoxicidade dos extratos de dióspiro nas linhas celulares e posteriormente, os ensaios de citoproteção contra o insulto oxidativo t-BHP (hidroperóxido de terc-butilo).

4.5.3 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* avaliam se um composto é tóxico para as células em cultura por determinação do número de células viáveis restantes após um período de incubação definido e comparação com o controlo. É um método conveniente e económico que prediz toxicidade *in vivo* medindo um marcador substituto para indicar o número de células viáveis em comparação com controles não tratados. Os métodos para estimar o número de células viáveis em cultura são geralmente baseados na medição de um indicador de atividade metabólica (Riss *et al.*, 2004). Neste ensaio vamos avaliar a toxicidade dos extratos de dióspiro nas células.

As placas de 96 poços foram plaqueadas com 200 μ L por poço de suspensão de células em meio FBS a uma densidade de 1×10^5 células para L929 e 2×10^5 para HaCaT. Após 24h, o meio de cultura foi substituído por 150 μ L meio sem FBS contendo várias concentrações de extrato de folhas vermelhas, folhas verdes e de extrato de resíduo alcoólico (Tabela 10) e para o controlo somente o meio sem FBS. Após 3h ou 24h de incubação com os extratos, conforme o ensaio planeado, foi realizado o ensaio colorimétrico do MTT, descrito anteriormente, para avaliar a viabilidade celular e o possível efeito tóxico que os extratos exercem nas células para cada concentração de extrato testada.

Tabela 10 - Concentrações de extratos usadas no ensaio de citoproteção e citotoxicidade.

	Queratinócitos HaCaT	Fibroblastos L929
Extrato de Folhas Vermelhas	10, 25, 50 e 100 μ g/mL	10, 25, 50 e 100 μ g/mL
Extrato de Folhas Verdes	10, 25, 50 e 100 μ g/mL	10, 25, 50 e 100 μ g/mL
Extrato de Resíduo Alcoólico	25, 50, 100 e 250 μ g/mL	25, 50, 100 e 250 μ g/mL

Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism 8.0*.

4.5.4 Ensaio de Citoproteção contra insulto t-BHP

As placas de 96 poços foram plaqueadas com 200 μ L por poço de suspensão de células em meio DMEM com 10% FBS a uma densidade de 1×10^5 células para L929 e meio RPMI com 10% de FBS a uma densidade de 2×10^5 para HaCaT. Após 24h, o meio de cultura foi substituído por 150 μ L meio sem FBS contendo várias concentrações de extrato de folhas vermelhas, folhas verdes e de extrato de resíduo alcoólico (Tabela 10) e para os controlos somente o meio sem FBS. Após 2h ou 21h de pré-incubação

com os extratos (esquema da Figura 11), foi adicionado nos poços 50 μ L de t-BHP na concentração de 4 mM para as L929 e 1 mM para HaCaT por 3h para induzir stress oxidativo, exceto nos poços para controlo de vida. Foi também efetuado um controlo positivo em que as células (em meio sem FBS) foram incubadas com o insulto oxidativo (3h). Em seguida, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT, descrito anteriormente, para avaliar a viabilidade celular e o possível efeito protetor dos extratos nas células para cada concentração de extrato testada.

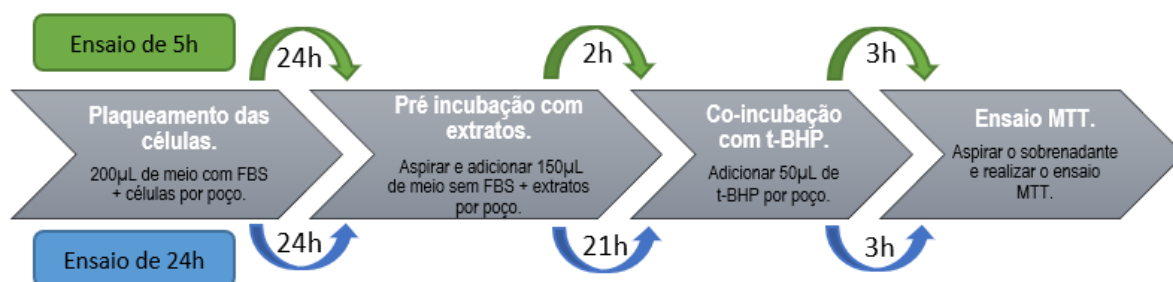


Figura 11- Esquema representativo do ensaio de citoproteção de 5 horas e de 24 horas com o tempo entre os procedimentos.

Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism 8.0*.

4.5.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigénio (ERO) com DCFDA em fibroblastos L929

Com a primeira descrição do uso do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) como um ensaio fluorimétrico para peróxido de hidrogênio, tornou-se popular o uso da diclorofluoresceína (DCF) como uma sonda para avaliar a formação de peróxido de hidrogênio intracelular. A teoria subjacente ao uso do DCFDA é que os derivados da fluoresceína que não são fluorescentes emitem fluorescência após serem oxidados pelo peróxido de hidrogênio. A fluorescência emitida é diretamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio. Quando aplicado a células intactas, o DCFDA atravessa as membranas celulares e é hidrolisado enzimaticamente por esterases intracelulares em DCF não fluorescente. Entretanto, na presença de espécies reativas de oxigênio (ERO), o DCF é oxidado em diclorofluoresceína altamente fluorescente (DCF). Portanto, a fluorescência intracelular do DCF pode ser usada para quantificar o stress oxidativo geral nas células (Hong Wang & Joseph, 1999).

As placas de 96 poços foram plaqueadas com 200 μ L por poço de suspensão de células em meio com FBS a uma densidade de 1×10^5 células. Após 24h, o meio de cultura foi substituído por 150 μ L meio sem FBS contendo as seguintes concentrações de extrato de folhas vermelhas (25 μ g/mL), folhas

verdes (25 µg/mL) e de extrato de resíduo alcoólico (250 µg/mL). Após 2 horas de pré incubação com os extratos, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com 100 µL de PBS 1X. O PBS foi aspirado, foi adicionado 100 µL de DCFDA 25 µM diluído em PBS 1X, por 45 minutos a 37°C. Os poços foram novamente lavados com PBS 1X, e as células foram incubadas com t-BHP 4mM por 3 horas. Os poços foram lavados com PBS 1X, foram adicionados 50 µL de tripsina por poço e, após desagregação (do fundo da placa), foram adicionados 200 µL de PBS 1X por poço. Com o auxílio da pipeta multicanal, 150 µL de suspensão de células de cada poço foram transferidos para uma placa de fundo transparente e lateral preta (própria para medição da fluorescência) sendo a leitura efetuada a 485 nm (comprimento de onda de excitação) e 535 nm (emissão) num leitor de microplacas Fluoroskan Ascent FL.

Os valores para cada poço foram divididos pela média dos valores dos poços de controle e multiplicados por 100 para obter o aumento relativo da fluorescência em comparação com as células de controle não tratadas. Os resultados são expressos como a percentagem de fluorescência, que é calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ intensidade da fluorescência} = \frac{A_a}{A_c} \times 100$$

A_a – absorvância da amostra

A_c – absorvância do controlo (células não tratadas)

Foram realizados no mínimo três ensaios independentes e todos os parâmetros determinados graficamente usando o software *GraphPad Prism 8.0*.

4.6 Produção de formulação cosmética/cosmecêutica

Foram desenvolvidas 3 formulações, uma formulação com os extratos de folhas verdes (formulação teste - fvd), outra com extrato de folhas vermelhas (formulação teste - fvm) e uma para controlo sem a adição dos extratos (formulação controlo - fc). As formulações foram desenvolvidas tendo por base 5 fases (Tabela 11), sendo que a fase C varia de acordo com o extrato adicionado ou água destilada em substituição ao extrato para o controlo.

Para a preparação das formulações cosméticas, foram pesados separadamente os ingredientes de cada fase, que estão especificados na Tabela 11, para um volume de aproximadamente 100 mL.

Tabela 11 - Fases da preparação das formulações, com os ingredientes e as quantidades. Na fase D, foram adicionados os respectivos extratos do dióspiro e no creme controle foi adicionado água em substituição ao extrato.

Fase	Ingrediente	Quantidade
A	Glicerol	2,5g
	Água desionizada	65g
	Ácido cítrico	0,05g
	Betaína	2g
B	Óleos Base (Onagra, grainha de uva, azeite, jojoba e cânhamo)	10g
	Manteiga de Karité	1,5g
	Manteiga de Cacau	1,5g
	Montanov® 68	3,5g
	Goma Xantana	1,2g
	Álcool Cetílico	0,5g
	BHT (hidroxitolueno butilado)	0,05g
C	Propanediol (Zemea)	1,5g
	Extrato de folha verde ou de folha vermelha ou água	0,1g
	Água desionizada	12,5g
D	Aloe Vera pó	0,1g
	Dermofeel® PA-12	0,8g
	Ácido Hialurónico	0,05g
E	Óleos essenciais (Olibano, <i>Tea tree</i> , Verbena, <i>Petitgrain</i> , Toranja e <i>Ylang-Ylang</i>)	1mL
	Euxyl® PE-9010	0,5mL

A fases A e B foram aquecidas separadamente em banho maria. Depois de atingirem a temperatura de 70°C, adicionou-se a fase A à fase B com o auxílio do misturador de laboratório (Silverson L5T) misturando vigorosamente, que resultou em uma mistura de cor branca. Ao mesmo tempo, em um falcon de 45 mL foi preparada a fase C, onde o extrato foi dissolvido em Zemea e, posteriormente, misturado com água desionizada até não haver nenhum precipitado. Foram adicionados à fase C os componentes da fase D pela seguinte ordem: *Aloe vera* em pó, ácido hialurónico e, por último, o Dermofeel. O falcon foi levado ao vórtex e posteriormente ao ultrassom até a mistura estar homogênea e sem precipitado. Esta mistura (Fase C+D) foi adicionada à mistura (Fase A+B) ainda no misturador. Após a total homogeneização das fases, o creme foi retirado do misturador e os componentes da Fase E foram adicionados e misturados lentamente até total incorporação na formulação. O pH foi medido para verificar se seria necessária correção, o que não se verificou uma vez que este apresentou um valor

de pH igual a 5.5. Por fim, os cremes foram transferidos para recipientes fechados, previamente esterilizados, e foram armazenados em local protegido da luz e à temperatura ambiente até sua utilização.

4.6.1 Teste microbiológico

A pele e as mucosas são protegidas do ataque microbiano por uma barreira mecânica natural bem como por vários mecanismos de defesa, contudo o uso de cosméticos contaminados pode causar infecção microbiana. Isso pode se tornar particularmente preocupante quando os cosméticos são usados ao redor dos olhos, nas mucosas, na pele lesionada, em crianças menores de 3 anos de idade, em idosos e em pessoas com comprometimento do sistema imunológico ("Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.," 2016).

Para garantir a qualidade do produto e a segurança do consumidor é necessário realizar análises microbiológicas de rotina de cada lote do produto acabado que chega ao mercado, sendo que os produtos cosméticos são divididos em duas categorias para definição dos limites do controle de qualidade microbiológico, conforme pode ser observado na Tabela 12. Os limites quantitativos e qualitativos são baseados na norma europeia EN ISO 17516: 2014 Cosméticos - Microbiologia - Limites microbiológicos. A norma europeia EN ISO 17516: 2014 foi aprovada pelo CEN em 9 de agosto de 2014 e atualmente é amplamente utilizada pela indústria de cosméticos como padrão internacional ("Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.," 2016).

Tabela 12 - Limites microbiológicos em produtos cosméticos, dividido por categoria de produtos. Adaptado de ("Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.," 2016).

Tipos de microrganismos	Categoria 1	Categoria 2
	Produtos especificamente destinados a crianças menores de três anos, área dos olhos ou membranas mucosas	Outros produtos
Microrganismos mesófilos aeróbicos totais (bactérias mais levedura e bolor)	$\leq 1 \times 10^2$ UFC* por g ou mL	$\leq 1 \times 10^3$ UFC* por g ou mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausência em 1g ou 1mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausência em 1g ou 1mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausência em 1g ou 1mL
<i>Candida albicans</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausência em 1g ou 1mL
* UFC: Unidades formadoras de colônias		

Para avaliar se os cremes produzidos não estavam contaminados com microrganismos acima do permitido, eles foram submetidos a um teste microbiológico para se detetar possíveis contaminações. Este teste baseia-se na quantificação de microrganismos mesófilos viáveis, com capacidade de desenvolvimento em meios de cultura e temperaturas de incubação que permitem o crescimento da grande maioria destes microrganismos.

Em um tubo falcon de 15 mL foi colocado 1 g de creme e acrescentado 9 mL de meio LB líquido (1% de Triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl), o falcon foi agitado no vórtex até a mistura estar homogênea. Após isto, foi pipetado 1 mL do conteúdo do falcon para uma placa de Petri contendo meio LB sólido (1% de Triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl e 2% de agar), distribuindo uniformemente com auxílio de um espalhador; a placa foi selada com Parafilm e foi incubada numa estufa a 35°C durante 48 horas. As placas foram analisadas quanto a formação de colônias de microrganismos quando completaram 24 horas de incubação e após o término das 48 horas.

4.6.2 Testes de estabilidade por centrifugação

Para avaliar a estabilidade, amostras dos cremes foram submetidos a um teste de centrifugação para observar a ocorrência de separação de fases, que indicam instabilidade ou incompatibilidade dos componentes da formulação.

Em um tubo falcon de 15 mL foram pesados, em uma balança analítica AG245, 6 g de cada formulação a ser testada. Os falcons foram levados à centrífuga Sigma 2-16k e centrifugados a 5000 rpm, por 30 minutos em temperatura ambiente, por 2 ciclos consecutivos com intervalo de 10 minutos entre os ciclos. Após término do segundo ciclo, os falcons foram levados a banho maria com a temperatura de 45°C por 30 minutos e novamente levados à centrifugação por 30 minutos a 5000 rpm. Ao fim as amostras foram analisadas macroscopicamente em relação ao aparecimento de sobrenadante ou separação de fases.

4.7 Avaliação *in vivo* dos efeitos imediatos da aplicação da formulação cosmética

Com o objetivo de avaliar a segurança e os efeitos imediatos dos cremes, foram usados equipamentos de medição biometrológica da pele para avaliar parâmetros como hidratação, perda transepidérmica de água (TEWL) e formação de eritema na pele de voluntários. Para avaliação destes parâmetros, uma série de técnicas não invasivas foram desenvolvidas e validadas permitindo uma avaliação dos efeitos dos cosméticos mediante dados objetivos e mensuráveis. Um exemplo de

equipamento que se utiliza destas técnicas é o Cutometer® dual MPA 580 do fabricante Courage & Khazaka, que apresenta sondas para avaliação de vários parâmetros que são registados no software fornecido com o aparelho. As sondas Corneometer® CM 825 (hidratação), Tewameter® TM 300 (perda de água transepidérmica) e Mexameter® MX 18 (eritema), são amplamente utilizadas e foram escolhidas para a avaliação *in vivo* dos efeitos imediatos das formulações deste trabalho.



Figura 12 - Equipamento Cutometer® dual MPA 580 do fabricante Courage & Khazaka, com as sondas Corneometer®, Tewameter® e Mexameter® utilizadas neste trabalho.

Para a realização desta avaliação, 7 voluntários (6 mulheres e 1 homem) com idade entre 20 e 35 anos foram esclarecidos sobre o propósito, procedimentos, riscos e benefícios do teste. Eles receberam indicações para que não fossem aplicados outros produtos tópicos na região dos antebraços nas 24 horas antes do início e durante o período de teste, bem como para evitarem a exposição solar e o uso de roupas apertadas na área de teste.

Para os testes foram feitas 2 marcações na parte interna inferior de cada braço, perfazendo um total de 4 marcações por voluntário, conforme ilustrado na Figura 13, sendo uma marcação para formulação controle (fc), uma para formulação com folhas verdes (fvd), uma para formulação com folhas vermelhas (fvm) e uma para controle negativo (cn), onde é analisada a pele sem aplicação de nenhum creme. Após as marcações no braço dos voluntários, foi realizada a primeira medição (t0) para avaliação de cada local demarcado sem a aplicação dos produtos. As leituras foram feitas com as sondas Corneometer® CM 825, Tewameter® TM 300 e Mexameter® MX 18, respetivamente. Após a primeira medição, os cremes foram espalhados em suas respetivas áreas, com movimentos circulares e o tempo foi registado. A segunda medição (t6) foi realizada após 6 horas da primeira medição. Todas as medições foram feitas após 20 minutos de aclimação em temperatura e humidade do ar controlados (20-22°C e 45-55%, respetivamente).

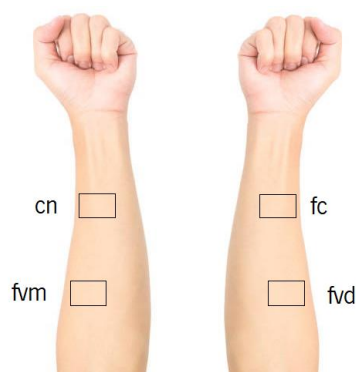


Figura 13 - Esquema de marcação nos braços dos voluntários para avaliação dos efeitos das formulações. Foram realizadas 4 marcações: (cn) para controle negativo, sem aplicação de nenhum produto; (fc) para formulação controle, sem os extratos de dióspiro; (fvm) para formulação de folhas vermelhas; e (fvd) para formulação de folhas verdes.

4.7.1 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

As medições da perda transepidérmica de água na pele são úteis para identificar danos na pele causados por certos produtos químicos, insultos físicos (como “fita adesiva”) ou condições patológicas como eczema, pois as taxas de TEWL aumentam na proporção do dano, mesmo antes que ele seja clinicamente visível. Portanto, pode ser considerada a ferramenta que avalia a função no que diz respeito à integridade da barreira física da epiderme (Fluhr, 2011).

Para determinação da TEWL, foi utilizada a sonda Tewameter® TM 300 (Cutometer® dual MPA 580). Esta sonda usa o método de câmara aberta (Figura 14), sendo a TEWL calculado a partir da medição fornecida por dois sensores de humidade e temperatura precisamente orientados dentro da câmara (Fluhr, 2011). A medição é baseada no princípio de difusão descrito por Adolf Fick e os resultados são expressos em gramas por metro quadrado por hora ($\text{g/m}^2/\text{h}$) (Rogiers, 2001). De acordo com o manual do equipamento os valores variam de 0-10 para pele muito saudável, 10-15 para pele saudável, 15-25 pele normal, 25-30 pele cansada e acima de 30 pele em estado crítico. A sonda do aparelho permaneceu por aproximadamente 1 minuto sobre a pele dos antebraços e o valor médio das 10 medidas obtidas após a estabilização dos valores foi empregado nos cálculos.

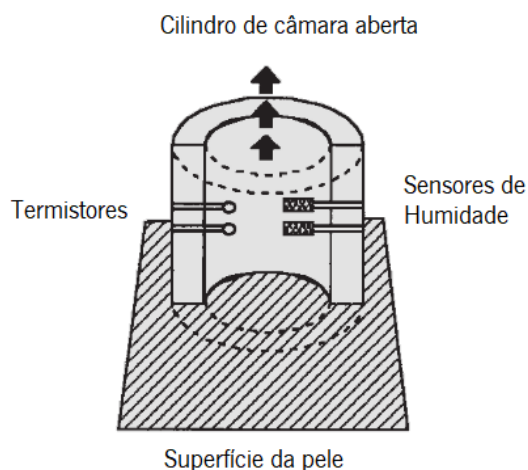


Figura 14 - Câmara aberta da sonda Tewameter que mede a perda transepidérmica de água da pele através de sensores de temperatura e humidade. Adaptado de Rogiers (2001).

4.7.2 Determinação da hidratação da pele

Para a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo (hidratação da pele) foi utilizada a sonda Corneometer CM 825 (Cutometer® dual MPA 580), que através de elétron (Figura 15) mede o teor de hidratação do estrato córneo baseado no princípio da medida da capacitância elétrica, ou seja, na variação da constante dielétrica do meio em função da quantidade de água presente. A capacitância variável total da superfície da pele é convertida em unidades arbitrárias (UA) de hidratação da pele e varia de 0 a 130, onde <30 corresponde a muito secas, de 30-40 a seca e >40 a suficientemente hidratada. Estes valores são válidos para pele saudável e em ambientes em condições normais de temperatura e humidade (20°C e 40-60% de humidade). Foram efetuadas 10 medições por área no antebraço dos voluntários, sendo calculada a média dos valores obtidos.

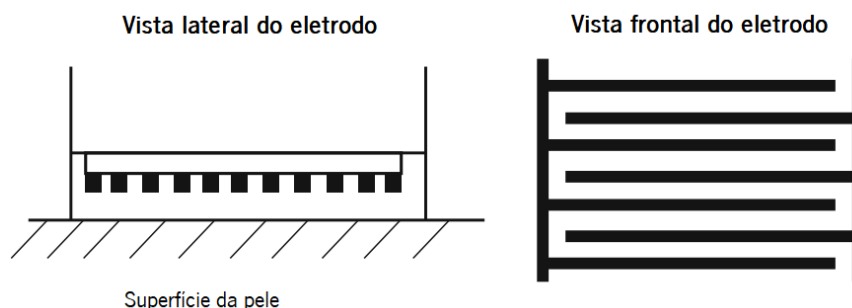


Figura 15 - Representação esquemática da sonda de medição de capacitância do aparelho (Corneometer CM 825). Vistas frontal e lateral dos eletrodos interdigitais. Os eletrodos são cobertos com um material vitrificado e, conseqüentemente, não estão em contato direto com a superfície da pele.

4.7.3 Determinação de formação de eritema na epiderme

Para a determinação da formação de eritema na pele, o que poderia indicar reações indesejáveis às formulações testadas, foi utilizada a sonda Mexameter® MX 18 do equipamento Cutometer® dual MPA 580, onde a medição se baseia na absorção/reflexão de luz (Figura 16). Ela emite luz LED em três comprimentos de onda, sendo que a luz refletida é detectada e usada para calcular a luz absorvida pelo eritema e melanina de acordo com fórmulas predefinidas. Os resultados correspondem aos picos de absorção espectral de melanina e eritema, respectivamente, fornecendo índice de melanina e índice de eritema em uma escala de 0 a 999 em unidades arbitrárias (UA). (Wright *et al.*, 2016)

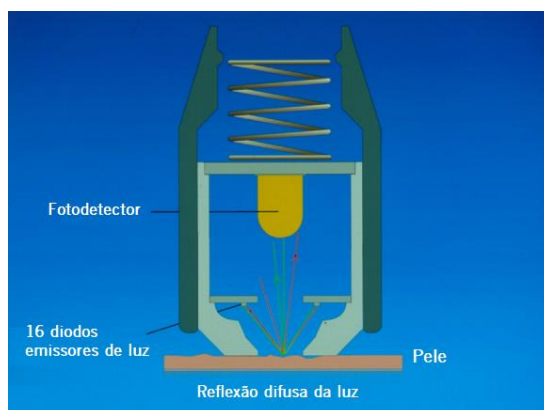


Figura 16 - Sonda Mexameter® MX 18 usada para avaliação de eritema e melanina na pele. A sonda contém 16 diodos emissores de luz dispostos circularmente que emitem luz em três comprimentos de onda: 568 nm (verde), 660 nm (vermelho) e 880 nm (infravermelho). A luz refletida pela pele é medida por um fotodetector, um medidor simples de refletância. Adaptado de Busch *et al.*, (2016).

O Mexameter foi calibrado diariamente usando uma referência padrão. Um anel de proteção da luz foi usado na sonda durante as medições nos participantes para bloquear a luz externa. Foram realizadas 10 medições para cada marcação no braço dos voluntários, sendo calculada a média dos valores obtidos.

4.8 Análise Estatística

As diferenças estatísticas nos grupos experimentais foram avaliadas pelo método de teste não paramétrico (*ANOVA*) e o valor de p foi considerado significativo quando $p \leq 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa *GraphPad Prism 8*.

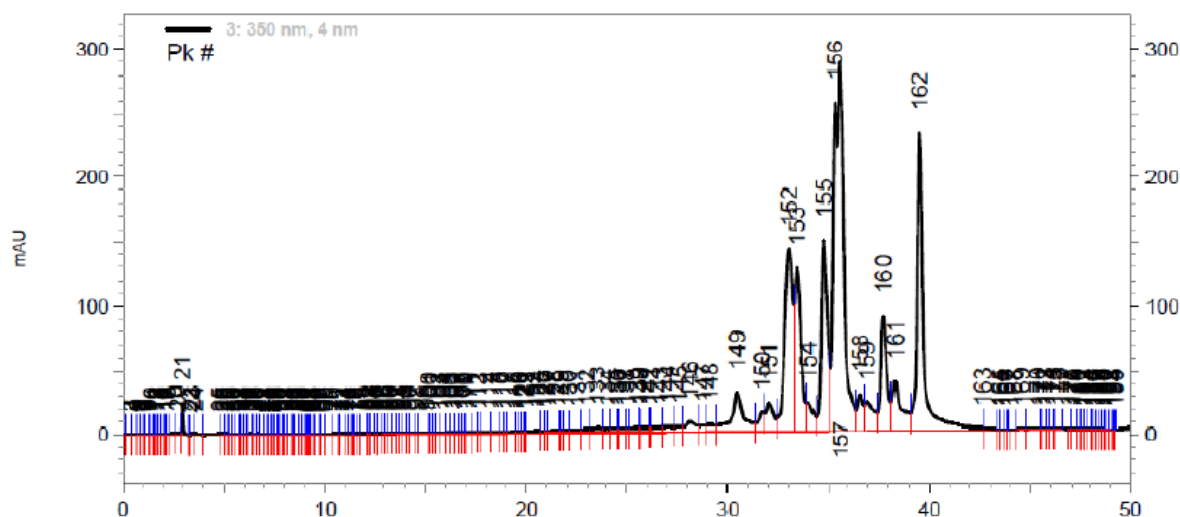


Figura 18 - Cromatograma HPLC-DAD (350 nm) do extrato de folhas vermelhas de *Diospyros kaki*.

O extrato de resíduo alcoólico como esperado, demonstrou ter uma composição bem diferente dos extratos de folhas. Foram identificados dois ácidos fenólicos simples, quatro catequinas, flavonóide glicosilado, procianidina, quercetina e kaempferol (Tabela 13).

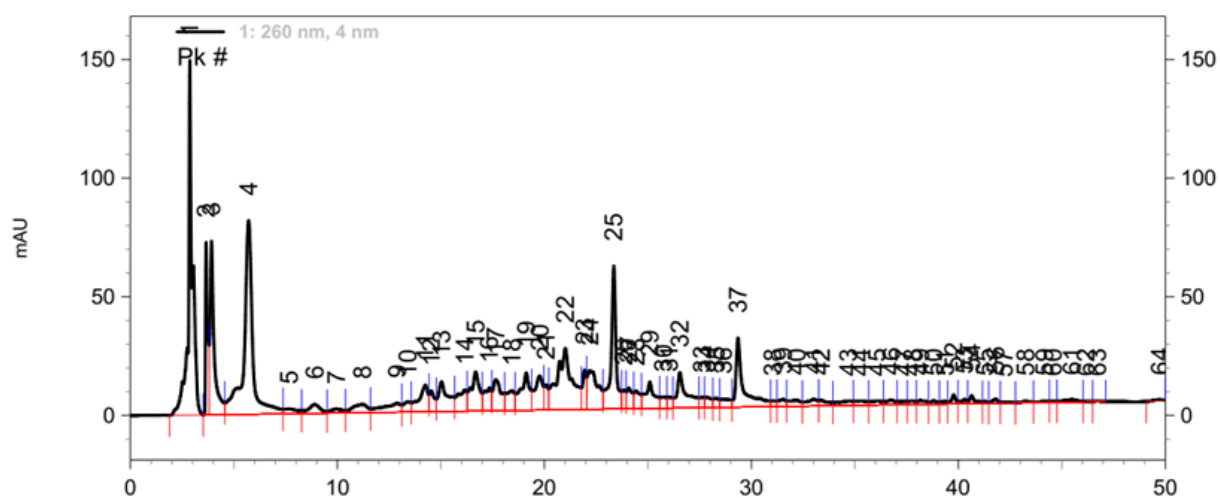


Figura 19 - Cromatograma HPLC-DAD (260 nm) do extrato de resíduo alcoólico de *Diospyros kaki*.

Estes resultados demonstraram que ambos extratos de folhas são constituídos, principalmente, por compostos fenólicos, nomeadamente flavonóis (kaempferol, quercetina e seus derivados) e flavonas (derivados de luteolina), o que vai de encontro aos compostos reconhecidos em extratos de folhas de dióspiro, em trabalhos anteriores (Kawakami et al., 2011; Xie et al., 2015; Xue et al., 2011; Zhi Zhou et al., 2019).

Os flavonóis de folhas de dióspiro são relatados como tendo efeitos preventivos contra hipertensão, dermatite e lesão induzida por peróxido de hidrogênio (Kawakami *et al.*, 2011). Em sua pesquisa

Kawakami *et al.* (2011) isolaram 8 glicosídeos de flavonóis das folhas de dióspiro em desenvolvimento. Segundo eles os glicosídeos de flavonóis são uma família diversificada de compostos comumente encontrados em frutas e vegetais que apresentam atividades biológicas especiais, como atividades inibitórias contra a xantina oxidase, atividade antioxidante e inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintase.

Tabela 13 – Compostos obtidos através da análise de HPLC dos extratos de dióspiro.

Amostra	Pico nº	Composto
Folhas verdes	149	Derivado do ácido clorogénico
	152	Derivado glicosilado do kaempferol
	155	Derivado glicosilado da quercetina
	156	Derivado glicosilado do kaempferol
	158	Derivado glicosilado da luteolina
	159	Flavonóis derivados do kaempferol
	160	Flavonóis derivados do kaempferol
	163	Quercetina
	166	Kaempferol
Folhas Vermelhas	149	Derivado glicosilado do kaempferol
	152	Derivado glicosilado da quercetina
	153	Derivado glicosilado do kaempferol
	155	Derivado glicosilado da luteolina
	156	Flavonóis derivados do kaempferol
	157	Flavonóis derivados do kaempferol
	160	Quercetina
	162	Kaempferol
Resíduo Alcoólico	2	Ácidos fenólicos simples
	3	Ácidos fenólicos simples
	4	Catequina
	11	Catequina
	13	Catequina
	15	Catequina
	17	Catequina
	22	Flavonóide glicosilado
	25	Procianidina
	32	Quercetina
	37	Kaempferol

No que diz respeito ao extrato de resíduo alcoólico de dióspiro, ainda não existem referências na literatura. Este tipo de extrato metanólico resulta da biomassa fermentada do dióspiro e não diretamente do fruto (Pérez-Burillo *et al.*, 2018) ou sumo (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2015), onde já foram efetuados estudos. A presença dos compostos identificados neste extrato (Tabela 13) indicam à partida, uma boa capacidade antioxidante, já que os compostos fenólicos, como os flavonóides e derivados de ácidos fenólicos, são referidos na literatura como compostos que possuem capacidade antioxidante (Kawakami *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2011).

Assim, a partir da análise fitoquímica, é possível antecipar que os extratos de *Diospyros kaki* possuam um bom potencial antioxidante. No entanto, são necessários uma variedade de outros ensaios para confirmar esta capacidade, tal como se descreve em seguida.

5.2 Ensaios bioquímicos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

5.2.1 Atividade de sequestro do radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Os extratos metanólicos de folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro demonstraram capacidade de sequestro do radical superóxido (Figura 20). As concentrações testadas de extrato de resíduo alcoólico apresentaram resultados inconclusivos e, portanto, não foram considerados.

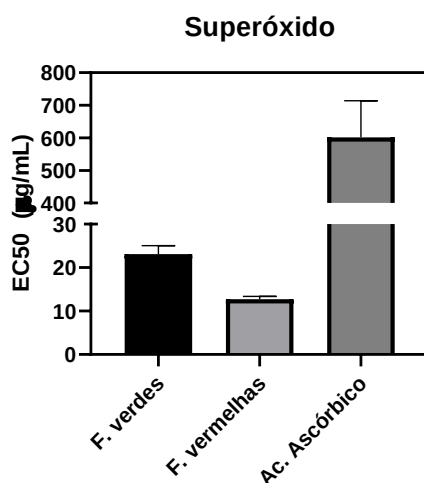


Figura 20 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de eliminação do superóxido, comparando com o Ácido Ascórbico (antioxidante padrão).

Ambos extratos exibiram uma boa capacidade de sequestro do radical superóxido, superior ao antioxidante de referência (ácido ascórbico). O extrato de folhas vermelhas apresentou um EC50 de $12,75 \pm 0,6192 \mu\text{g/mL}$, e o de folhas verdes, um EC50 de $23,11 \pm 1,959 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 14). Em

contrapartida, o ácido ascórbico utilizado como antioxidante de referência apresentou valor médio de $601,7 \pm 112 \mu\text{g/mL}$. Quando comparados entre si, os extratos não apresentaram diferenças significativas ($p=0,9329$). Entretanto, ao serem comparados com o ácido ascórbico ambos apresentaram alto nível de significância ($p<0,0001$), demonstrando sua eficiência na eliminação do radical superóxido (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividade de eliminação do superóxido dos extratos de folhas de dióspiro e do antioxidante ácido ascórbico e comparação da significância dos resultados.

Amostras	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença estatística	
Ácido Ascórbico	$601,7 \pm 112$	Ácido Ascórbico vs. F. verdes	$p<0,0001$ (****)
F. verdes	$23,11 \pm 1,96$	Ácido Ascórbico vs. F. vermelhas	$p<0,0001$ (****)
F. vermelhas	$12,75 \pm 0,62$	F. verdes vs. F. vermelhas	$P=0,9329$ (ns)

Com estes resultados é possível notar uma elevada atividade antioxidante das amostras em estudo (extratos metanólicos das folhas vermelhas e verdes), indicada pelo seu baixo valor de EC50, inferior ao ácido ascórbico, usado como referência neste ensaio. Resultado semelhante foi obtido por Sun *et al.*, (2011) ao analisarem o extrato de folhas de *Diospyros kaki*, cujo EC50 foi de $41,58 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$, valor significativamente melhor que os da rutina, composto antioxidante de referência (EC50 $130,58 \pm 3,58 \mu\text{g/mL}$) usado naquele estudo. A elevada atividade “*Scavenging*” de superóxido do extrato foi atribuída à presença dos seus constituintes bioativos (Sun *et al.*, 2011). Cabe salientar que o extrato de folhas obtido por Sun *et al.*, (2011) demonstraram menor capacidade antioxidante que os extratos analisados neste trabalho, embora tenham especificado a colheita das folhas no mês de outubro, mesmo mês em que as folhas vermelhas foram colhidas. Tal diferença, na eliminação do radical superóxido entre os extratos, pode estar relacionada às variáveis ambientais locais, ao tipo de cultivo, clima, manejo ou processamento da matéria-prima.

Os extratos de produtos naturais possuem compostos bioativos que podem variar qualitativamente e quantitativamente, agindo de diversas formas frente à inativação dos diferentes radicais livres. Os radicais superóxido matam células, inativam enzimas e degradam o ADN, as membranas celulares e os polissacarídeos. Desempenham ainda um papel importante durante a peroxidação de ácidos gordos insaturados (Sakanaka & Ishihara, 2008). Por este motivo, o estudo dos efeitos sequestradores de radical superóxido dos nossos extratos, é uma das formas mais importantes de esclarecer o mecanismo da atividade antioxidante (Zhishen *et al.*, 1999) e demonstrar seus benefícios terapêuticos atuando na redução do stress oxidativo.

5.2.2 Atividade quelante de Ferro (ICA)

Um importante mecanismo de atividade antioxidante é a capacidade de quelar metais de transição que catalisam a decomposição do peróxido de hidrogénio e as reações do tipo Fenton (Manian *et al.*, 2008). Portanto, considerou-se importante rastrear a capacidade quelante de ferro (II) dos extratos.

A capacidade quelante de Fe^{2+} de várias amostras foi determinada pela medição do complexo ferro-ferrozina (Figura 21). O EDTA, forte quelante de ferro, foi usado como quelante de referência e demonstrou a melhor atividade, com um EC_{50} de $5,756 \pm 0,5696 \mu\text{g/mL}$, seguido pelo extrato de folhas verdes com $276,8 \pm 37,49 \mu\text{g/mL}$, extrato de folhas vermelhas com $939,2 \pm 167,4 \mu\text{g/mL}$ e o de resíduo alcoólico com $1126 \pm 143,4 \mu\text{g/mL}$ que necessitou da maior concentração de extratos para quelar 50% do ferro da amostra.

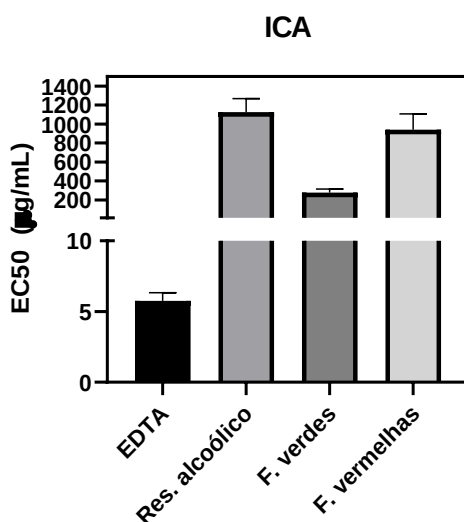


Figura 21 - Gráfico representativo do EC_{50} dos extratos de dióspiro para o ensaio de atividade quelante de ferro, comparando com o EDTA um agente quelante muito usado.

Quando comparado o EDTA com os extratos testados houve uma diferença significativa entre ele e todos os extratos ($p < 0,0001$). Há também diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre o extrato de folhas verdes e os outros dois extratos (de resíduo alcoólico e de folhas vermelhas). Já quando comparado o extrato de resíduo alcoólico com o de folhas vermelhas foi obtido um ($p = 0,0012$), que também demonstra diferenças significativas na atividade quelante destes extratos (Tabela 15).

Tabela 15 – Atividade quelante de ferro dos extratos de dióspiro e do agente quelante EDTA e comparação da significância dos resultados.

Amostras	EC50 (µg/mL)	Diferença estatística	
		EDTA vs. Res. Alcoólico	$p < 0,0001$ (****)
		EDTA vs. F. verdes	$p < 0,0001$ (****)
		EDTA vs. F. vermelhas	$p < 0,0001$ (****)
EDTA	5,756 ±0,57	Res. Alcoólico vs. F. verdes	$p < 0,0001$ (****)
Resíduo alcoólico	1126 ±143,4	Res. Alcoólico vs. F. vermelhas	$P = 0,0012$ (**)
F. verdes	276,8 ±37,49	F. verdes vs. F. vermelhas	$p < 0,0001$ (****)
F. vermelhas	939,2 ±167,4		

Sun *et al.*, (2011), verificaram a atividade quelante de extratos de folhas de *Diospyros kaki*. No seu estudo os resultados não foram expressos em EC50 o que não nos permite comparar diretamente os resultados, entretanto, o EDTA obteve uma capacidade de quelar ferro de 87.34% para uma concentração de 6.25 µg/mL e o extrato etanólico de folhas utilizado, obteve 77.38% de quelação para uma concentração de 50 µg/mL. Em concordância com o nosso ensaio, o EDTA obteve uma atividade quelante superior. Foi descrito que extratos ou compostos com atividade quelante inibem a peroxidação lipídica pela estabilização dos metais de transição (Sun *et al.*, 2011). Por isso, os autores ainda sugeriram que o efeito quelante baixo a moderado dos extratos de folhas de *Diospyros kaki* poderá ser, pelo menos, parcialmente benéfico na proteção contra danos oxidativos.

Os agentes quelantes formam ligações covalentes com os metais, por isso, são eficazes como antioxidantes secundários reduzindo o potencial redox e estabilizando a forma oxidada do íon metálico (Končić *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011) Os antioxidantes secundários não convertem os radicais livres em produtos mais estáveis, mas diminuem a taxa de oxidação por vários mecanismos diferentes. Um dos mecanismos de ação mais importantes destes antioxidantes é a quelação de metais pró-oxidantes como o ferro e outros metais de transição que promovem a oxidação, atuando como catalisadores de reações de radicais livres (Končić *et al.*, 2011).

Assim, apesar dos extratos mostrarem uma atividade significativamente menor que a do quelante de referência, pode-se especular que os efeitos quelantes destes extratos poderão conferir alguma proteção contra danos oxidativos.

5.2.3 Ensaio de redução do DPPH

Os extratos metanólicos de folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro demonstraram capacidade para reduzir o radical DPPH. Os resultados obtidos da atividade sequestradora do radical DPPH destes extratos e do composto de referência trolox são apresentados na Figura 22. O extrato de resíduo alcoólico

formou um precipitado, não apresentando resultados coerentes durante os ensaios e por este motivo, os seus valores não são apresentados.

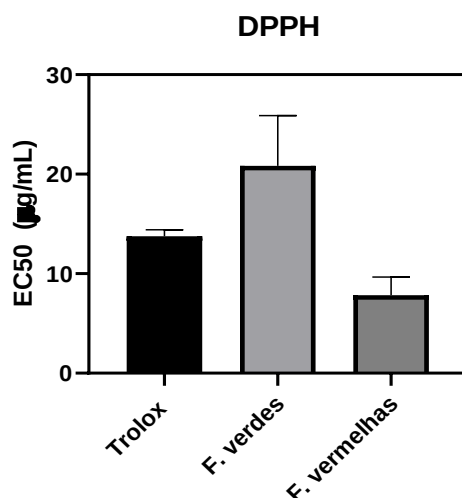


Figura 22 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de redução do DPPH, comparando com o Trolox (antioxidante de referência).

Conforme pode ser observado na Tabela 16, o extrato de folhas vermelhas apresentou atividade antioxidante significativamente maior no sequestro do DPPH ($EC_{50} = 7,85 \pm 1,81 \mu\text{g/mL}$) quando comparada à do Trolox ($EC_{50} = 13,77 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$) e do extrato de folhas verdes ($EC_{50} = 20,84 \pm 5,05 \mu\text{g/mL}$). Esta atividade sequestradora de radicais livres superior, evidenciada pelo extrato de folhas vermelhas, pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos e de flavonóides em maior concentração quando comparados ao extrato de folhas verdes e ao Trolox.

De acordo com Li *et al.*, (2018) os compostos fenólicos diminuem a ação de radicais livres no organismo. Assim, é possível estabelecer uma relação entre a atividade de sequestro de DPPH e a quantidade de compostos fenólicos identificados nos extratos de folhas de dióspiro, uma vez que estas substâncias podem reduzir este radical à sua forma menos reativa, a hidrazina, por meio da fixação de um hidrogênio que é removido das substâncias fenólicas (Sousa *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011).

Tabela 16 - Redução do radical DPPH dos extratos de folhas de dióspiro e do antioxidante Trolox e comparação da significância dos resultados.

Amostras	EC50 (µg/mL)	Diferença estatística	
Trolox	13,77 ± 0,6358	Trolox vs. F. verdes	$P=0,0002$ (***)
F. verdes	20,84 ± 5,053	Trolox vs. F. vermelhas	$P=0,0014$ (**)
F. vermelhas	7,847 ± 1,813	F. verdes vs. F. vermelhas	$p<0,0001$ (****)

Chang *et al.*, (2019) constatou correlações significativas da capacidade antioxidante com o conteúdo fenólico de folhas de oito variedades de dióspiro influenciadas pelo mês em que foram colhidas (setembro, outubro ou novembro). As folhas colhidas em meses com maior exposição solar e temperatura ambiente mais alta, apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, contribuindo para melhores propriedades antioxidantes. Para cada variedade de dióspiro, os teores de polifenóis e flavonóides totais foram maiores nas folhas colhidas em setembro, decrescendo respectivamente nas folhas colhidas em outubro e novembro. Além disso, ainda constataram que a variedade e o tempo de colheita foram fatores que influenciaram a composição e conteúdo de compostos fenólicos nas folhas de dióspiro.

No nosso trabalho, as oscilações nas condições ambientais, de temperatura, exposição solar e principalmente na variação da época de colheita das folhas verdes (fevereiro, abril e julho) pode ter afetado seu potencial antioxidante, representado pelo maior valor do EC50, quando comparado ao extrato de folhas vermelhas (outubro), explicando a necessidade de uma concentração superior do extrato de folhas verdes para reduzir metade dos radicais livres (DPPH) em solução.

Embora se tenha verificado diferença significativa entre o EC50 dos extratos de folhas de dióspiros e do Trolox, a capacidade antioxidante observada nos nossos extratos foi maior que as relatadas por Chang *et al.* (2019) para extratos etanólicos de folhas de dióspiro e para Sun *et al.* (2011) para o extrato de flavonóides totais de folhas de dióspiro.

Em suma, os nossos resultados experimentais indicam que os extratos de folhas vermelhas e verdes de dióspiro possuem atividade antioxidante, podendo ser aproveitados como fonte de antioxidantes naturais.

5.2.4 Inibição da produção de Óxido Nítrico

Os resultados da inibição da produção de óxido nítrico (NO) são mostrados na Figura 23, que compara o EC50 dos extratos de folhas verdes e folhas vermelhas com o ácido ascórbico, o antioxidante de referência utilizado. O extrato de folhas vermelhas apresentou o menor EC50 ($51,32 \pm 6,97 \mu\text{g/mL}$), por isso obteve a melhor atividade de inibição de óxido nítrico, seguido pelo de folhas verdes com $98,79 \pm 8,655 \mu\text{g/mL}$ e por último o ácido ascórbico, com $238,8 \pm 26,67 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 17). O extrato de resíduo alcoólico apresentou resultados inconsistentes durante os ensaios e por isso seus dados não são apresentados.

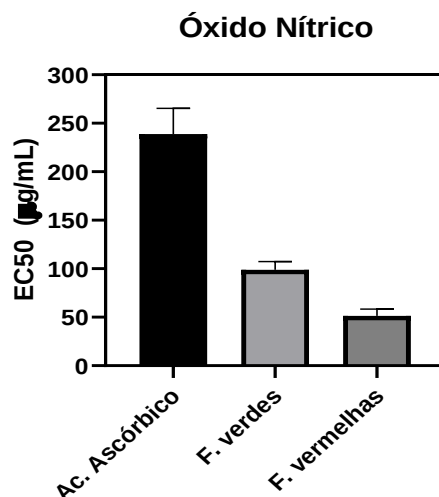


Figura 23 - Gráfico representativo do EC50 dos extratos de dióspiro para o ensaio de inibição da produção de óxido nítrico, comparando com o ácido ascórbico (antioxidante de referência).

Ao comparar os extratos de folhas com o ácido ascórbico e entre eles, diferenças significativas ($p < 0,0001$) foram observadas (Tabela 17), com destaque para o extrato de folhas vermelhas que apresentou uma inibição de óxido nítrico aproximadamente 4,7 vezes maior que a do ácido ascórbico, já o de folhas verdes apresentou uma inibição aproximadamente 2,4 vezes maior que a do antioxidante de referência. Assim, a elevada inibição deste radical livre, comprova a atividade antioxidante dos extratos testados, indicando-os como potenciais fontes de antioxidantes naturais a serem empregados na indústria farmacêutica e de cosméticos.

Tabela 17 – Inibição da produção de óxido nítrico apresentada pelos extratos de folhas do dióspiro e o ácido ascórbico e comparação da significância dos resultados.

Amostras	Média (µg/mL)	Diferença estatística	
Ácido Ascórbico	238,8 ± 26,67	Ácido Ascórbico vs. F. verdes	$p < 0,0001$ (****)
F. verdes	98,79 ± 8,655	Ácido Ascórbico vs. F. vermelhas	$p < 0,0001$ (****)
F. vermelhas	51,32 ± 6,97	F. verdes vs. F. vermelhas	$p < 0,0001$ (****)

O papel fisiológico do óxido nítrico (NO) evoluiu ao longo dos anos, passando de um simples neurotransmissor e vasodilatador para um modulador complexo de processos inflamatórios (Direito *et al.*, 2017). Sob condições fisiológicas normais, ele tem efeito anti-inflamatório e é um forte neurotransmissor nas sinapses dos neurônios, o que contribui para a regulação da apoptose (Sharma *et al.*, 2007). Entretanto, se produzido em excesso em situações anormais, é considerado um mediador pró-inflamatório que está envolvido em vários distúrbios inflamatórios, por exemplo nas articulações, intestino e pulmões. Assim sendo, inibidores da produção de óxido nítrico representam um avanço importante na terapêutica de doenças inflamatórias (Blantz & Munger, 2002; Sharma *et al.*, 2007).

Considerando os resultados obtidos neste estudo pode-se constatar a eficiência do uso do extrato de folhas verdes e vermelhas na inibição do radical óxido nítrico, que está relacionado com o desenvolvimento de inúmeras patologias, quando em excesso no organismo. O óxido nítrico participa em processos inflamatórios aumentando a permeabilidade vascular e formando edemas (Takács *et al.*, 2002). Daí a importância de se testar soluções antioxidantes e anti-inflamatórias capazes de atuar na proteção contra o stress oxidativo, prevenindo danos à pele e criando formulações cosméticas eficazes e seguras.

A atividade anti-inflamatória dos extratos de *Diospyros kaki* sobre espécies reativas que participam em processos biológicos, como o óxido nítrico, ainda é pouco estudada, demonstrando a importância dos resultados obtidos no presente estudo. Os extratos são misturas complexas de variadas substâncias que podem ou não agir sinergicamente nas atividades avaliadas, portanto, mais pesquisas são sugeridas para verificar os reais efeitos fisiológicos destes compostos no organismo.

5.3 Ensaios *in vitro* usando fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT como linhas celulares

5.3.1 Ensaio de Citotoxicidade

O termo "citotoxicidade" é usado para descrever a cascata de eventos moleculares que interferem na síntese macromolecular, causando danos funcionais e estruturais nas células. A escolha da linha celular para testes de citotoxicidade *in vitro* permanece controversa e um grande número de linhas celulares têm sido utilizados (Ozdemir *et al.*, 2009).

Linhas celulares imortalizadas, como os fibroblastos de ratinho (linha celular L929, ATTC) ou queratinócitos humanos (linha celular HaCaT, ATTC) são adequadas em ensaios de citotoxicidade devido à facilidade de controlar suas condições de cultura (Moharamzadeh *et al.*, 2007; Ozdemir *et al.*, 2009). Adicionalmente, estas linhas celulares foram escolhidas por pertencerem à pele e por isto são indicadas para ensaios com extratos que serão aplicados em formulações cosméticas.

Além das linhas celulares escolhidas e das concentrações de extratos utilizadas, Moharamzadeh *et al.*, (2007) citam o tempo de exposição como outro parâmetro importante no teste de citotoxicidade. Tal fator foi considerado no presente trabalho para a definição dos tempos de incubação (5h e 24h) dos extratos com as células.

Para a determinação das concentrações não tóxicas dos diferentes extratos de dióspiro (extrato de resíduo alcoólico-ERA, extrato de folhas verdes e extrato de folhas vermelhas) foi utilizado o ensaio de viabilidade celular do MTT.

No grupo de controlo de vida (negativo) não foi aplicado nenhum extrato, ou seja, as células deste grupo foram apenas cultivadas em meio de cultura (DMEM) para os fibroblastos L929 e RPMI para os queratinócitos HaCaT, os valores deste grupo correspondem a 100% de viabilidade celular. Foi também efetuado um grupo de controlo de morte (controlo positivo), em que as células foram incubadas com 20% DMSO, os resultados para este controlo apresentaram valores sempre abaixo de 10% para a viabilidade celular, uma redução significativa ($p < 0,0001$), por isso não foram mostrados nos gráficos.

Para verificar se as diferenças observadas na viabilidade das células expostas às várias concentrações de extratos são estatisticamente significativas, foi usado o teste *ANOVA One-Way*. Assim, foi possível avaliar a significância estatística dos valores obtidos para cada concentração de extrato.

5.3.1.1 Linha celular fibroblastos L929

A Figura 24 representa graficamente os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular dos fibroblastos L929 expostos aos extratos do dióspiro por 5 horas.

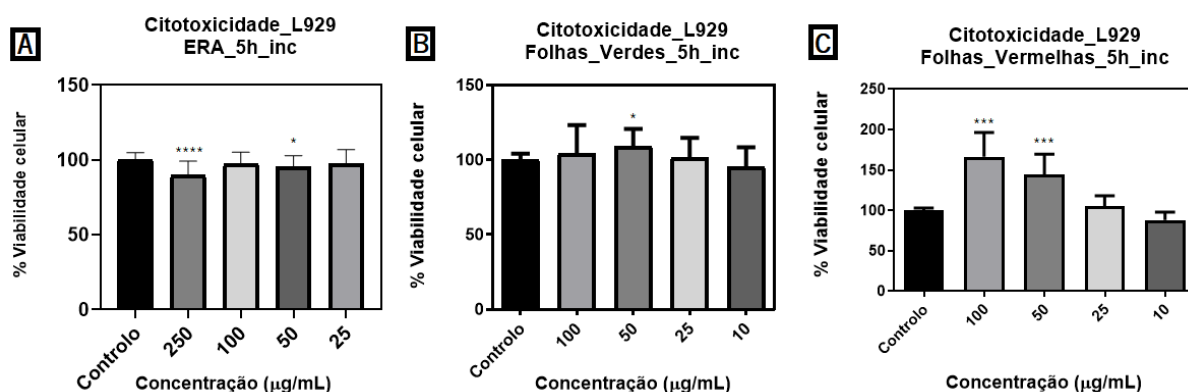


Figura 24 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 5 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

A incubação com o extrato de resíduo alcoólico apresentou citotoxicidade significativa nas concentrações de 250 µg/mL ($p < 0,0001$) e de 50 µg/mL ($p = 0,0139$) (Figura 24A, Tabela 18). O extrato de folhas verdes demonstrou aumento da viabilidade celular significativo para a concentração de 50 µg/mL ($p = 0,0267$). Já o extrato de folhas vermelhas apresentou valores de viabilidade celular superiores aos do controlo, estatisticamente significativos para as concentrações de 100 µg/mL ($p = 0,0003$) e 50

$\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0009$). Este aumento da viabilidade celular nas concentrações de $100 \mu\text{g/mL}$ e $50 \mu\text{g/mL}$ pode indicar um aumento na proliferação celular ou da atividade metabólica das células, provocado pelo extrato de dióspiro. Existem métodos mais específicos para avaliar a proliferação celular, como a citometria de fluxo (Lili Wang *et al.*, 2011) e o ensaio de citotoxicidade baseada na enzima lactato desidrogenase - LDH (Smith *et al.*, 2011), que deverão ser futuramente realizados.

De facto, Sun *et al.*, (2011) também observaram aumento significativo de células viáveis em ensaios com extratos de folhas de *Diospyros kaki* em células de osteoblastos MC3T3-E1 de rato. Para um período de incubação de 4 horas com extratos, os resultados revelaram aumento significativo ($p < 0,01$) na viabilidade celular para todas as concentrações testadas ($5 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$ e $20 \mu\text{g/mL}$). Eles justificaram este resultado referindo que o extrato de dióspiro pode atuar facilitando a captação de glicose e subsequentemente aumentando as concentrações de piruvato, levando ao aumento da energia celular e à proliferação das células.

Tabela 18 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas.

Citotoxicidade L929 - 5h					
	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	89,6 $\pm$ 9,493	97,12 $\pm$ 7,987	95,37 $\pm$ 7,434	97,54 $\pm$ 9,183	-
Folhas Verdes	-	104,5 $\pm$ 18,66	109,2 $\pm$ 11,47	101,7 $\pm$ 12,99	95,33 $\pm$ 12,97
Folhas Vermelhas	-	166,4 $\pm$ 30,04	144,2 $\pm$ 25,26	105,6 $\pm$ 12,48	88,14 $\pm$ 9,865

A Figura 25 apresenta os gráficos da viabilidade celular demonstrada pelos fibroblastos L929 nos ensaios com os extratos de dióspiro após 24 horas de incubação.

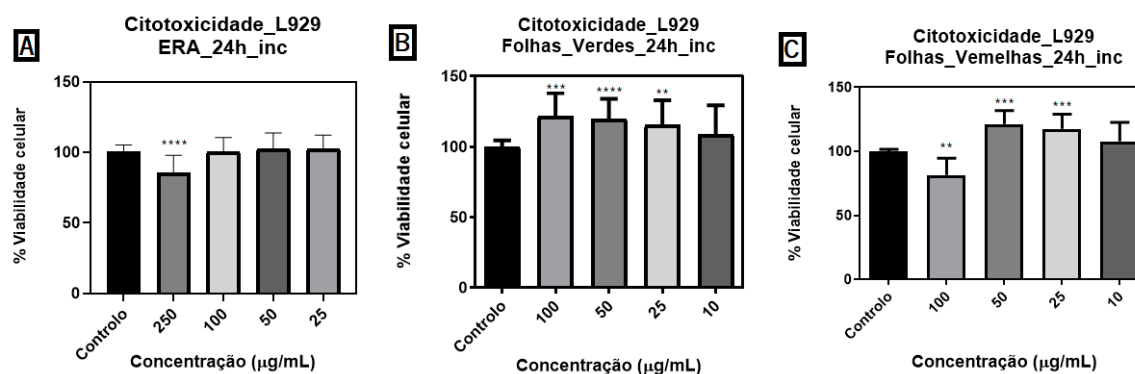


Figura 25 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 24 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

Tal como os resultados obtidos para os ensaios anteriores (5 horas de incubação), o extrato de resíduo alcoólico mostrou toxicidade significativa para a concentração de 250 µg/mL ($p < 0,0001$) (Figura 25A, Tabela 19) após 24 horas de incubação. O extrato de folhas verdes apresentou valores de viabilidade celular superiores para todas as concentrações testadas (Tabela 19). Este aumento da % de viabilidade celular é estatisticamente significativo em relação ao controlo para as concentrações de: 100 µg/mL ($p = 0,0006$); 50 µg/mL ($p < 0,0001$) e 25 µg/mL ($p = 0,0058$). De igual modo o extrato de folhas vermelhas apresentou aumento significativo na viabilidade celular para as concentrações de 50 µg/mL ($p = 0,0001$) e 25 µg/mL ($p = 0,0006$). No entanto na de 100 µg/mL, este extrato mostrou citotoxicidade visto ter diminuído significativamente ($p = 0,0057$) a viabilidade celular ($81,55 \pm 13,08\%$) em comparação com o controlo.

Tabela 19 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas.

	Citotoxicidade L929 - 24h				
	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	85,53 $\pm$ 12,29	100,3 $\pm$ 10,27	102,4 $\pm$ 11,23	102,5 $\pm$ 9,724	-
Folhas Verdes	-	121,6 $\pm$ 16,53	119,7 $\pm$ 14,35	115,4 $\pm$ 17,56	108,6 $\pm$ 20,76
Folhas Vermelhas	-	81,55 $\pm$ 13,08	121,3 $\pm$ 10,43	117,6 $\pm$ 11,4	107,8 $\pm$ 14,91

Quando comparados os ensaios de 5 horas e 24 horas de incubação, o extrato de folhas vermelhas, apresentou aumento da toxicidade relacionada ao tempo de incubação para a concentração de 100 µg/mL, que teve citotoxicidade significativa no ensaio de 24 horas. Já o extrato de folhas verdes, após 24 horas de incubação, apresentou aumento da viabilidade celular para todas as concentrações, com aumentos significativos para as três maiores concentrações testadas.

5.3.1.2 Linha celular queratinócitos HaCaT

Os ensaios de citotoxicidade também foram realizados com a linha celular HaCaT e os resultados estão representados na Figura 26 (5 horas de incubação com extratos) e na Figura 27 (24 horas de incubação com os extratos).

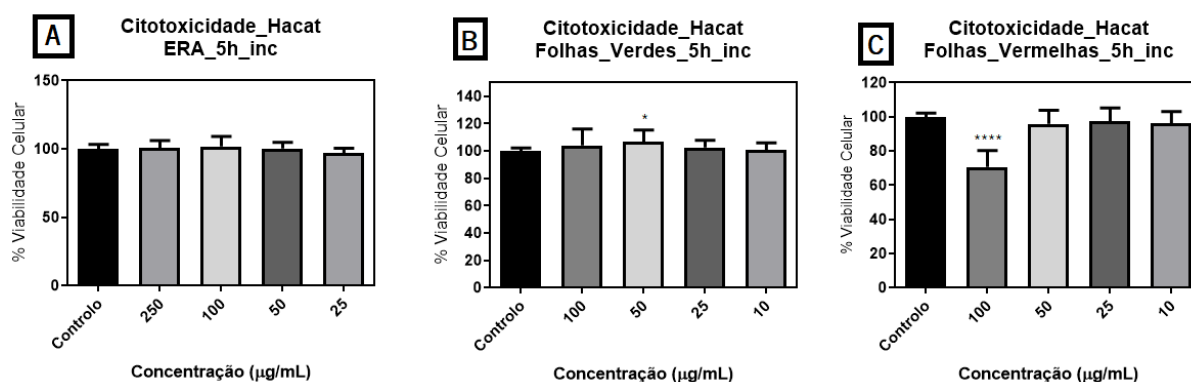


Figura 26 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 5 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

O extrato de resíduo alcoólico apresentou viabilidades celulares (Tabela 20) bem próximas das células tratadas apenas com meio (controlo), não evidenciando citotoxicidade nesta linha celular, quer após 5 horas (Figura 26A) ou 24 horas (Figura 27A) de incubação.

De igual modo, o extrato de folhas verdes não mostrou qualquer toxicidade após 5 ou 24 horas de incubação. Após de 5 horas de incubação com este extrato, houve um aumento significativo para a concentração de 50 µg/mL ($p = 0,0226$). O mesmo se verificou após 24 de incubação para as concentrações de 100 e 50 µg/mL ($p < 0,0001$), em comparação com as células controlo (Tabela 21), podendo ser devido a um efeito de proliferação celular ocasionado por este extrato.

Tabela 20 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas.

Citotoxicidade HaCaT - 5h					
	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	100,7 ±5,506	102 ±7,286	100,5 ±4,502	96,84 ±3,69	-
Folhas Verdes	-	104,2 ±12,02	106,8 ±8,552	102,6 ±5,296	100,7 ±5,202
Folhas Vermelhas	-	70,77 ±9,59	95,94 ±7,894	97,21 ±7,923	96,02 ±7,113

Já o extrato das folhas vermelhas apresentou viabilidades celulares muito próximas do controlo negativo, com exceção da concentração de 100 µg/mL, que mostrou citotoxicidade significativa quer após 5 horas de incubação ($p < 0,0001$) (Figura 26C) quer após 24 horas de incubação ($p < 0,0001$) (Figura 27C).

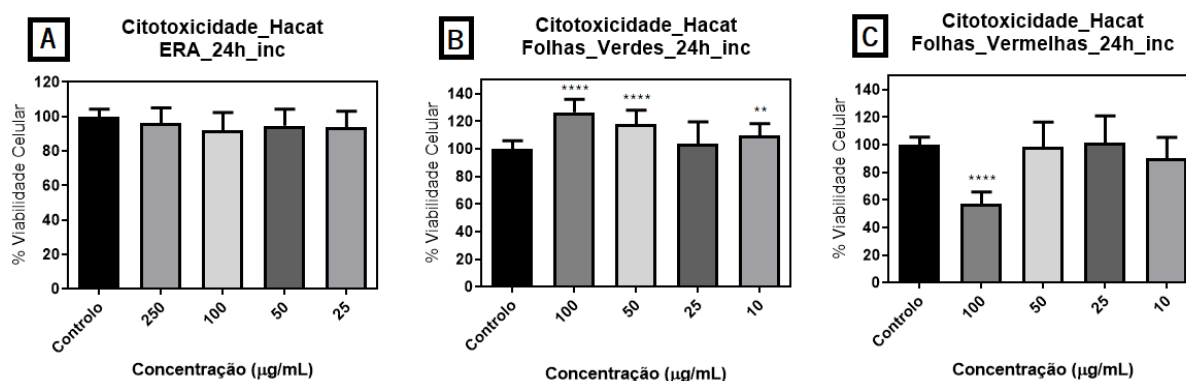


Figura 27 - Gráficos representativos da citotoxicidade dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 24 horas de incubação com extratos. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo negativo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

Shon *et al.*, (2014) avaliaram a citotoxicidade de 20 extratos etanólicos de frutas e de ervas medicinais cultivadas na Coreia em queratinócitos humanos, incluindo 3 extratos etanólicos de dióspiro (*Matsumoto Wase Fuyu*, *Nishimura Wase* e *Taishu*). Os extratos foram testados nas concentrações de 100 µg/mL e 400 µg/mL com pré-incubação de 24 horas. Na concentração de 100 µg/mL, nenhum dos extratos de dióspiro apresentou diminuição significativa da viabilidade celular, já à concentração de 400 µg/mL apenas o extrato de dióspiro *Taishu* ocasionou redução significativa da viabilidade celular.

Tabela 21 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citotoxicidade com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas.

Citotoxicidade HaCaT - 24h					
	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	96,18 ±8,835	91,8 ±10,55	94,79 ±9,482	93,9 ±9,137	-
Folhas Verdes	-	126,7 ±9,32	118 ±10,21	103,9 ±15,85	109,8 ±8,422
Folhas Vermelhas	-	57,46 ±8,521	98,64 ±17,96	101,7 ±19,43	90,06 ±15,4

Os ensaios de citotoxicidade permitem determinar se um extrato contém quantidades significativas de compostos químicos biologicamente prejudiciais, portanto, sendo úteis para a triagem, pois servem para separar materiais tóxicos dos não tóxicos, fornecendo evidências preditivas de segurança deste extrato (Miret *et al.*, 2006). Globalmente, verifica-se que os extratos não exercem citotoxicidade significativa sobre as células da linha celular HaCaT, com a exceção do extrato de folhas vermelhas na concentração de 100 µg/mL em ambos os períodos de incubação (5 horas e 24 horas).

Após determinar as concentrações não tóxicas dos extratos, ou seja, seguras, é importante verificar se os extratos apresentam efeitos de citoproteção nas linhas celulares testadas.

5.3.2 Ensaio de Citoproteção contra insulto t-BHP

Com este estudo pretendeu-se avaliar os potenciais efeitos antioxidantes e citoprotetores dos extratos metanólicos de dióspiro contra danos oxidativos induzidos pelo insulto t-BHP em células de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT. Os extratos foram pré incubados por 2 horas ou 21 horas e posteriormente co-incubados com o t-BHP, durante 3 horas.

5.3.2.1 Linha celular fibroblastos L929

5.3.2.1.1 Duas horas de pré-incubação dos fibroblastos da linha L929 com os extratos

Neste ensaio, os fibroblastos da linha celular L929 foram pré-incubados 2 horas com os extratos e posteriormente co-incubados com o insulto oxidativo t-BHP (4 mM) durante 3 horas. A incubação das células com o t-BHP 4 mM (controlo positivo) durante 3 h, conduziu a uma diminuição significativa de cerca de 40% da viabilidade celular ($p < 0,0001$).

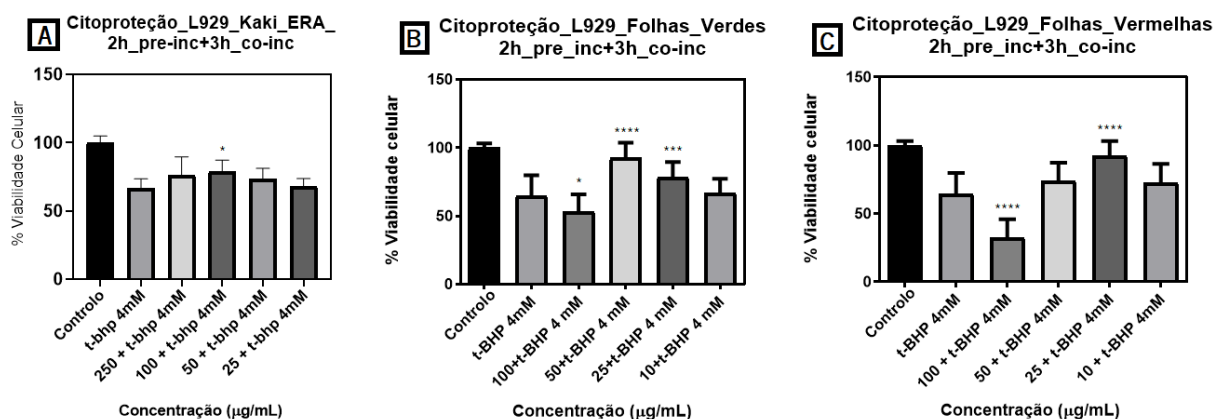


Figura 28 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 2 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

Nas condições anteriores, a pré-incubação com o extrato do resíduo alcoólico, originou um efeito citoprotetor (verificada pelo aumento da viabilidade celular em relação ao controlo positivo) significativo ($p = 0,0157$) apenas na concentração de 100 µg/mL (Fig. 28A). Já a pré-incubação com o extrato de folhas verdes (Figura 28B) originou um efeito citoprotetor significativo nas concentrações 50 µg/mL ($p < 0,0001$) e 25 µg/mL ($p = 0,0008$) e a pré-incubação com o extrato de folhas vermelhas apresentou um efeito citoprotetor significativo ($p < 0,0001$) na concentração de 25 µg/mL (Figura 28C). Apesar das concentrações de 50 µg/mL e 10 µg/mL apresentarem um aumento na viabilidade celular em relação ao controlo positivo, estes (aumentos) não foram significativos (Figura 28C, Tabela 22).

Tabela 22 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas (pré-incubação por 2 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).

Citoproteção L929 - 2h pré-incubação + 3h co-incubação						
	t-BHP	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	66,53 ±6,96	76,07 ±13,55	78,82 ±8,38	73,58 ±7,62	67,9 ±5,80	-
Folhas Verdes	64,77 ±15,03	-	53,31 ±12,53	92,46 ±11,25	78,5 ±11,08	66,52 ±10,64
Folhas Vermelhas	64,77 ±15,03	-	32,33 ±13,63	74,24 ±13,15	92,3 ±10,9	72,37 ±14,09

Em suma, a pré-incubação de 2 horas com os extratos seguido de 3h de co-incubação com o insulto oxidativo, originou citoproteção significativa (aumento da viabilidade celular em relação ao controle positivo) nas seguintes situações: (1) extrato do resíduo alcoólico (100 µg/mL), extrato de folhas verdes (50 e 25 µg/mL) e extrato de folhas vermelhas (25 µg/mL). Deste modo, o extrato de folhas verdes e de folhas vermelhas apresentam ter melhor potencial em relação ao de resíduo alcoólico visto que evidenciam citoproteção a concentrações menores.

5.3.2.1.2 Vinte e uma horas de pré-incubação dos fibroblastos da linha L929 com os extratos

Para verificar se o tempo de pré-incubação com os extratos influencia o efeito citoprotetor nas células, foram realizados ensaios com 21 horas de pré-incubação com os extratos seguido de 3 horas de co-incubação com o insulto oxidativo. Os resultados deste ensaio podem ser observados na Figura 29 e na Tabela 23.

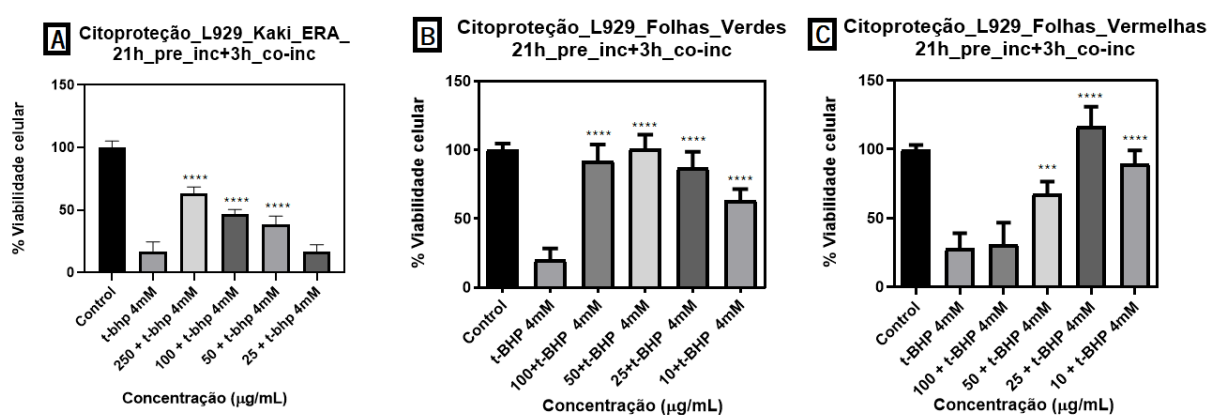


Figura 29 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em fibroblastos L929, com 21 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controle positivo (t-BHP 4mM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

Neste ensaio, a incubação das células com o t-BHP 4 mM (controle positivo) durante 3h, conduziu a uma diminuição significativa da viabilidade celular ($p<0,0001$) de cerca de 80%, superior à ocorrida no

ensaio anterior (pré-incubação de 2 h com os extratos). Este resultado pode ter sido devido ao maior período de pré-incubação que pode ter conduzido a uma situação de maior suscetibilidade celular face a insultos oxidativos.

Verifica-se que a pré-incubação com o extrato de resíduo alcoólico origina citoproteção significativa nas concentrações de 250 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL ($p < 0,0001$) (Figura 29A). De igual modo, todas as concentrações testadas do extrato de folhas verdes apresentam citoproteção (Figura 29B) significativa ($p < 0,0001$).

Já a incubação com o extrato de folhas vermelhas mostrou capacidade de citoproteção significativa ($p < 0,0001$) para todas as concentrações testadas (Figura 29C, Tabela 23) com exceção da maior concentração (100 µg/mL) que anteriormente tinha se mostrado citotóxica (ensaios de citotoxicidade, Figura 25C). A concentração de 25 µg/mL deste extrato ($116,7 \pm 14,14\%$, Tabela 23), apresentou o melhor efeito citoprotetor contra o insulto oxidativo t-BHP para este ensaio.

Tabela 23 - Viabilidade celular dos fibroblastos L929 (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas (pré-incubação por 21 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).

Citoproteção L929 - 21h pré-incubação + 3h co-incubação						
	t-BHP	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	17,23 $\pm$ 7,5	63,49 $\pm$ 5,07	46,58 $\pm$ 3,94	38,58 $\pm$ 6,58	16,66 $\pm$ 5,59	-
Folhas Verdes	20,13 $\pm$ 8,32	-	92,06 $\pm$ 11,9	100,6 $\pm$ 10,44	86,91 $\pm$ 11,7	63,03 $\pm$ 8,55
Folhas Vermelhas	27,9 $\pm$ 11,12	-	31,07 $\pm$ 15,7	67,81 $\pm$ 8,77	116,7 $\pm$ 14,14	89,28 $\pm$ 9,82

Comparando os resultados dos ensaios de pré-incubação com os extratos (após 2 horas e 21 horas de pré-incubação), verifica-se que as concentrações que originam melhor efeito citoprotetor são 50 µg/mL para o extrato de folhas verdes e 25 µg/mL no caso do extrato de folhas vermelhas em ambos os ensaios. Já o extrato de resíduo alcoólico, os resultados divergiram: após 2 horas de pré-incubação, a única concentração estatisticamente significativa foi a de 100 µg/mL; após 21 horas de pré-incubação, verificou-se um aumento significativo da viabilidade celular em comparação com o controlo positivo, portanto citoproteção, para as concentrações de 250, 100 e 50 µg/mL.

Globalmente podemos inferir que os extratos de folhas apresentaram melhores resultados de citoproteção que o de resíduo alcoólico. Adicionalmente, é possível inferir que os extratos de folhas vermelhas originam uma maior citoproteção do que os de folhas verdes já que este efeito foi originado a uma concentração inferior (25 µg/mL no caso do extrato de folhas vermelhas; 50 µg/mL no caso do extrato de folhas verdes).

Não foram encontrados na literatura ensaios de citoproteção com extratos de dióspiro para as linhas celulares utilizadas neste trabalho. Contudo, Sun *et al.* (2014) estudaram os efeitos de extratos etanólicos de folhas de dióspiro nos danos oxidativo induzidos por H₂O₂ em osteoblastos de rato MC3T3-E1, abordando seus potenciais efeitos terapêuticos ou tóxicos. Naquele trabalho, eles fizeram um pré-tratamento das células com o extrato de dióspiro durante 24 horas e após este período, incubaram com o insulto oxidativo H₂O₂ durante 6 horas. As três concentrações do extrato estudado apresentaram atividade anti-apoptótica significativa nas células tratadas com o extrato, revelando este um efeito citoprotetor. Este estudo evidenciou ainda os flavonoides presentes no extrato como responsáveis pela prevenção da apoptose e proteção das células contra os radicais de oxigênio.

Atualmente, estudos farmacológicos e clínicos indicam que o extrato de folhas de dióspiro, especialmente seus flavonóides, exibem uma ampla gama de atividades terapêuticas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antialérgicas (Sun *et al.*, 2014). Já Wattel *et al.* (2003) citam os flavonóides como antioxidantes naturais que eliminam vários tipos de radicais em uma ampla gama de sistemas de oxidação química.

Os resultados de Sun *et al.* (2014) são concordantes com os apresentados no presente trabalho que indicaram um efeito citoprotetor significativo dos extratos estudados contra o insulto oxidativo t-BHP, principalmente dos extratos de folhas. Deste modo, pode-se inferir que os vários flavonoides identificados na análise HPLC-DAD (Tabela 13) podem contribuir grandemente para este efeito citoprotetor.

5.3.2.2 Linha celular queratinócitos HaCaT

Os ensaios de citoproteção também foram realizados com os queratinócitos HaCaT para os períodos de pré-incubação de 2 e 21 horas com 3 extratos de dióspiro estudados. Os resultados podem ser observados nos gráficos da Figura 30 e na Tabela 24 (2 horas de pré-incubação) e Figura 31 e Tabela 25 (21 horas de incubação). Do mesmo modo, após o período de pré-incubação com extratos, as células foram co-incubadas 3 horas com o insulto oxidativo (t-BHP). Esta linha celular mostrou ser mais sensível aos efeitos do t-BHP visto que após 3 horas de incubação com t-BHP 1 mM (concentração 4x inferior à usada na linha celular L929), a viabilidade celular diminuiu para cerca de 40%.

5.3.2.2.1 Duas horas de pré-incubação dos queratinócitos da linha HaCaT com os extratos

O extrato de resíduo alcoólico apresentou valores bem próximos do controlo positivo (t-BHP 4mM) não mostrando efeito protetor significativo para nenhuma concentração testada (Figura 30A).

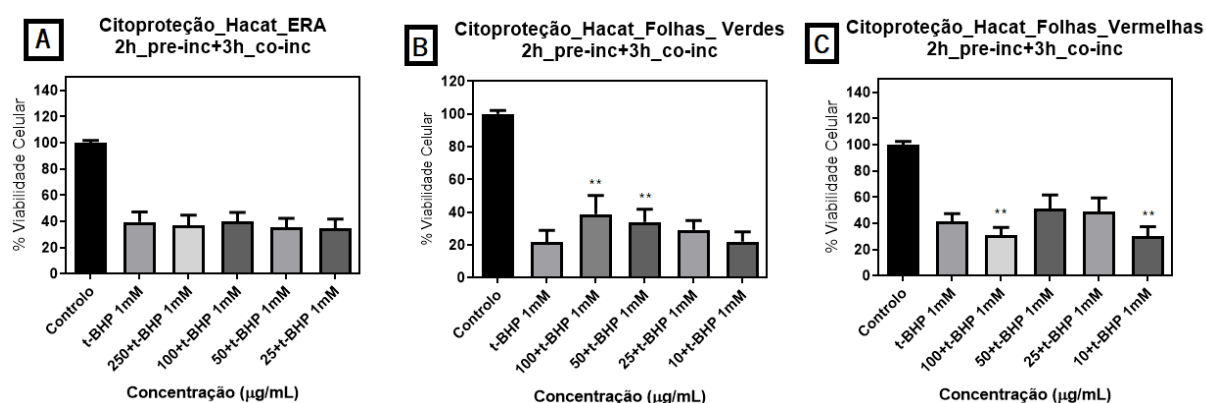


Figura 30 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 2 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verdes; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

O extrato de folhas verdes mostrou um efeito citoprotetor significativo ($p<0,01$) para as concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30B). Já o extrato de folhas vermelhas apesar de apresentar aumento da viabilidade celular em relação ao t-BHP ($41,34 \pm 6,11$) para as concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($51,47 \pm 10,32$) e 25 $\mu\text{g/mL}$ ($48,83 \pm 10,61$), este aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 30C e Tabela 24).

Tabela 24 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 5 horas (pré-incubação por 2 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).

Citoproteção HaCaT - 2h pré-incubação + 3h co-incubação						
	t-BHP	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	$39,7 \pm 7,55$	$36,89 \pm 8,04$	$40,2 \pm 6,74$	$35,34 \pm 7,14$	$34,79 \pm 7,20$	-
Folhas Verdes	$21,7 \pm 7,35$	-	$38,9 \pm 11,37$	$34,11 \pm 7,87$	$29,33 \pm 5,62$	$22,14 \pm 5,88$
Folhas Vermelhas	$41,34 \pm 6,11$	-	$31,18 \pm 5,70$	$51,47 \pm 10,32$	$48,83 \pm 10,61$	$30,16 \pm 7,39$

5.3.2.2.2 Vinte e uma horas de pré-incubação dos queratinócitos da linha HaCaT com os extratos

Assim como demonstrado no ensaio com 2 horas de pré-incubação, após 21 horas, o extrato do resíduo alcoólico não mostrou capacidade citoprotetora significativa para nenhuma concentração testada (Figura 31A).

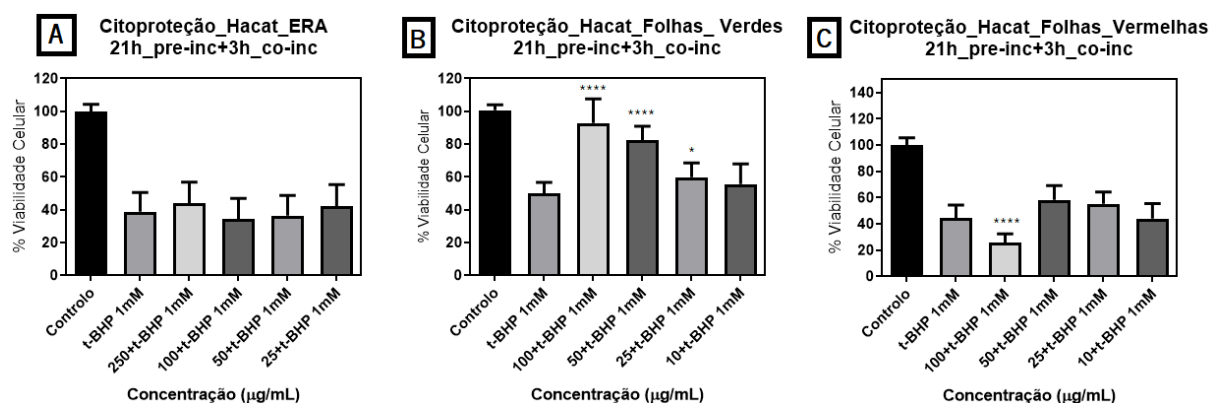


Figura 31 - Gráficos representativos da citoproteção dos extratos de dióspiro em queratinócitos HaCaT, com 21 horas de pré-incubação com extratos e 3 horas de co-incubação com extratos e o insulto t-BHP. A- Extrato de resíduo alcoólico; B- Extrato de folhas verde; C- Extrato de folhas vermelhas. Os asteriscos (*) indicam a diferença significativa relativamente ao controlo positivo (t-BHP 4mM). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. A sua ausência indica que a diferença não é significativa.

O extrato de folhas verdes mostrou citoproteção significativa para as concentrações de 100, 50 ($p < 0,0001$) e 25 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 31B). Já o extrato de folhas vermelhas não apresentou um efeito citoprotetor (Figura 31C) em nenhuma das concentrações testadas, sendo o aumento da viabilidade celular verificado nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ não significativo. Adicionalmente, a diminuição da viabilidade celular (em comparação com o controlo) verificada para a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ corrobora o efeito tóxico deste extrato a esta concentração obtido anteriormente (Tabelas 21 e 25, Figura 27C).

Tabela 25 - Viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT (representada em %) no ensaio de citoproteção com incubação dos extratos de resíduo alcoólico, folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro por 24 horas (pré-incubação por 21 horas e co-incubação por 3 horas com t-BHP).

Citoproteção HaCaT - 21h pré-incubação + 3h co-incubação						
	t-BHP	250	100	50	25	10
Resíduo Alcoólico	38,87 $\pm$ 11,74	43,8 $\pm$ 13,16	34,4 $\pm$ 12,66	36,44 $\pm$ 12,41	42,15 $\pm$ 13,34	-
Folhas Verdes	50,05 $\pm$ 6,724	-	92,92 $\pm$ 14,75	82,21 $\pm$ 8,719	59,82 $\pm$ 8,798	55,63 $\pm$ 12,43
Folhas Vermelhas	44,38 $\pm$ 10,08	-	25,6 $\pm$ 7,018	58,48 $\pm$ 10,84	55,36 $\pm$ 8,931	44,2 $\pm$ 11,32

Globalmente, o extrato que se destaca na sua capacidade citoprotetora contra insultos oxidativos é o de folhas verdes (Figura 30B e 31B). Aliado à sua baixa citotoxicidade, poderá ser um bom candidato à inclusão em formulações protetoras apropriadas à aplicação tópica.

Para efeito comparativo, não foi encontrado na literatura, pesquisas da citoproteção com extratos com folhas de dióspiro em células da pele. Entretanto, Heng *et al.* (2017) avaliaram a citoproteção de extratos aquosos de frutos de dióspiro em linhas celulares renais (CRFK) com um aumento da viabilidade celular significativa em relação ao insulto oxidativo utilizado. Kabir *et al.* (2015) apresentaram resultados

idênticos, com extratos aquosos de resíduo (casca do fruto) de dióspiro para outra linha celular renal (MA 104).

5.3.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com DCFDA em fibroblastos L929

De modo a complementar os ensaios antioxidantes e de citoproteção com L929 foi efetuado o ensaio com DCFDA para confirmar a ação antioxidante dos extratos de dióspiro e a ação protetora contra os danos oxidativos impostos pelo t-BHP.

A DCFDA é uma sonda amplamente utilizada para detetar H_2O_2 intracelular e stress oxidativo. Ela é um reagente permeável às células sendo hidrolisada intracelularmente ao anião carboxilato de DCFH e ficando retida dentro da célula. A oxidação de dois elétrons do DCFH resulta na formação de um produto fluorescente, diclorofluoresceína (DCF), que pode ser monitorado por várias técnicas baseadas em fluorescência (Kalyanaraman *et al.*, 2012). Apesar das limitações, este é um ensaio usado rotineiramente para medir a geração intracelular de H_2O_2 e outros oxidantes, ou monitorar as alterações da sinalização redox nas células em resposta à ativação intra ou extracelular com estímulo oxidativo (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

Na Figura 32 e Tabela 26 são mostrados os resultados do ensaio de atividade antioxidante dos extratos de dióspiro tendo em conta as ERO geradas pelo t-BHP 4mM em células L929.

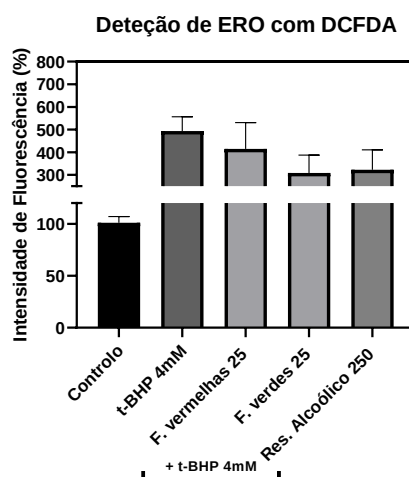


Figura 32 – Gráfico representativo do ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio com DCFDA. Pode-se observar um aumento na intensidade de fluorescência (%) para todos os poços incubados com o insulto (t-BHP). Os extratos demonstraram uma intensidade menor que a do t-BHP 4mM, indicando uma proteção contra danos oxidativos em todas as concentrações testadas.

Comparando o controlo e o t-BHP 4mM pode-se observar um aumento significativo (Tabela 26), na intensidade de fluorescência dos poços tratados com o insulto ($p<0,0001$), comprovando a efetividade deste em gerar ERO intracelulares que reagiram com DCFDA e formaram a diclorofluoresceína (fluorescente) detetada pelo leitor.

Ao analisar a intensidade de fluorescência obtida após pré-incubação com extratos em comparação com o t-BHP (Tabela 26), verifica-se uma diminuição significativa na intensidade de fluorescência ($p<0,0001$) para o extrato de folhas verdes 25 µg/mL e de residuo alcoólico 250 µg/mL, confirmando as suas capacidades antioxidantes. Nomeadamente, este ensaio confirmou a atividade citoprotetora obtida após pré-incubação com o extrato de folhas verdes e posterior co-incubação com o insulto oxidativo, quer com a linha celular L929 (Figuras 28 e 29 B) quer com a linha celular HaCaT (Figuras 30 e 31B).

Tabela 26 - Detecção de espécies reativas de oxigénio (ERO) com o DCFDA para os extratos de folhas vermelhas, folhas verdes e residuo alcoólico de dióspiro expresso em percentagem de intensidade de fluorescência e comparação da significância dos resultados.

Amostras	% de intensidade de Fluorescência	Diferença estatística	
		Controlo vs. t-BHP 4mM	$p<0,0001$ (****)
		Controlo vs. F. vermelhas 25	$p<0,0001$ (****)
		Controlo vs. F. verdes 25	$p<0,0001$ (****)
		Controlo vs. Res. Alcoólico 250	$p<0,0001$ (****)
		t-BHP 4mM vs. F. vermelhas 25	$P=0,1408$ (ns)
		t-BHP 4mM vs. F. verdes 25	$p<0,0001$ (****)
		t-BHP 4mM vs. Res. Alcoólico 250	$p<0,0001$ (****)
		F. vermelhas 25 vs. F. verdes 25	$P=0,0424$ (*)
		F. vermelhas 25 vs. Res. Alcoólico 250	$P=0,1026$ (ns)
		F. verdes 25 vs. Res. Alcoólico 250	$P=0,9953$ (ns)
Controlo	101 ±6,029		
t-BHP 4mM	493,9 ±62,81		
F. Vermelhas 25	414,3 ±116,9		
F. Verdes 25	308,3 ±78,69		
Res. Alcoólico 250	322,2 ±88,08		

Apesar de não significativa, o extrato de folhas vermelhas também apresentou uma redução da intensidade de fluorescência, corroborando os resultados de citoproteção obtidos anteriormente com a linha celular L929 (Figuras 28 e 29C).

Shon *et al.*, (2014) usou o ensaio com DCFDA para comparar a atividade inibidora de doses de 100 µg/mL de extratos de frutas e ervas medicinais contra o stress oxidativo provocado por H₂O₂ em queratinócitos humanos. Eles observaram que as doses de 100 µg/mL de extratos de frutas e ervas medicinais reduziram significativamente os níveis de DCF nos queratinócitos tratados com H₂O₂. Entre os extratos analisados, o de dióspiro *Nishimura Wase* apresentou uma atividade de inibição de 62,7%, considerada uma das melhores obtidas naquele estudo. De acordo com aquele estudo, extratos de frutas

e ervas medicinais melhoram efetivamente o stress oxidativo induzido por H₂O₂ em queratinócitos humanos.

Em Sun *et al.*, (2011) o extrato de folhas de dióspiro foi testado (em concentrações de 1,25 a 20 µg/mL) no ensaio de detecção de ERO com DCFDA em osteoblastos MC3T3-E1 de ratinho. Observou-se uma redução significativa na produção de ERO para as células incubadas com concentrações de 10 µg/mL ($p < 0,05$) e 20 µg/mL ($p < 0,01$), corroborando o efeitos do extrato de folhas verdes do presente estudo.

5.4 Produção de formulação cosmética/cosmecêutica

Diante dos resultados obtidos através dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, onde globalmente os extratos de folhas obtiveram melhor atividade antioxidante que o de resíduo alcoólico, foram preparadas duas formulações diferentes com extrato de folhas verdes (fvd) e com extratos de folhas vermelhas (fvm), além de uma formulação controlo (fc), que foram avaliadas quanto aos seus efeitos imediatos na pele.

5.4.1 Teste microbiológico

O controlo de qualidade faz parte das boas práticas de fabricação, incluindo a amostragem, os ensaios, manipulação e demais operações laboratoriais. Produtos contaminados sofrem alterações, tornando-se ineficazes pela perda de suas propriedades. Além disso, podem causar danos aos usuários pelo risco de contaminação por agentes patogénicos. Devido a esta preocupação, os produtos cosméticos devem passar por ensaios microbiológicos para assegurar que os limites de contaminação sejam aceitáveis e estejam de acordo com as normas, de forma a garantir a segurança do produto e dos consumidores. Para isso, são adicionados em sua composição conservantes que auxiliam na durabilidade do produto, impedindo crescimento de bactérias, leveduras e fungos, aumentando sua vida útil.

Os cremes foram avaliados quanto a formação de colónias de microrganismos e, de acordo com os resultados obtidos neste estudo (Tabela 27), pôde-se constatar que tanto a formulação controlo quanto a formulação com extrato de folhas verdes e a formulação com extrato de folhas vermelhas de *Diospyros kaki* estão dentro dos parâmetros de qualidade microbiológica exigidos pela norma europeia ("Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.," 2016), uma vez que não houve crescimento microbiano nas amostras analisadas nem no controlo.

Tabela 27 – Dados provenientes da avaliação microbiológica das formulações cosméticas com extratos de dióspiro, formulação controle e parâmetros de referência da norma europeia ("Revis. SCCS Notes Guid. Test. Cosmet. Ingredients their Saf. Eval. 9th Revis.," 2016).

Tipos de microrganismos	Parâmetros de Referência para produtos de Categoria 2	Formulação Controle	Formulação com extratos de folhas verdes	Formulação com extratos de folhas vermelhas
Microrganismos mesófilos aeróbicos totais (bactérias mais levedura e bolor)	$\leq 1 \times 10^3$ UFC* por g ou mL	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Candida albicans</i>	Ausência em 1g ou 1mL	Ausente	Ausente	Ausente
* UFC: Unidades formadoras de colônias				

Alguns dos componentes adicionados às formulações cosméticas testadas possuem características antimicrobianas conhecidas, como é o caso do Euxyl (James *et al.*, 2016), ácido cítrico (Oulkheir *et al.*, 2015), de *Aloe vera* (Hosseinimehr *et al.*, 2010) e dos óleos essenciais (Kalemba & Kunicka, 2005). Ademais, os extratos de muitas espécies vegetais contam com compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas, como por exemplo, taninos e compostos fenólicos (Nascimento *et al.*, 2000), que podem exibir atividade antibacteriana significativa (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019).

Os cremes obtidos atenderam aos requisitos microbiológicos, demonstrando a eficiência de seus componentes e segurança quanto a realização dos testes na pele dos voluntários sem o risco de contaminações por microrganismos.

5.4.2 Testes de estabilidade por centrifugação

O teste de centrifugação é um teste de estabilidade acelerada, baseado no princípio de que duas substâncias com densidades diferentes se separam sob força centrífuga. Ele simula de forma acelerada a atuação da força da gravidade sobre os produtos, podendo provocar movimentação das partículas em seu interior e serve para prever a estabilidade da emulsão (Mohsin *et al.*, 2016).

Este teste foi utilizado para avaliar a estabilidade física dos cremes formulados a partir do extrato de folhas verdes e do extrato de folhas vermelhas de *Diospyros kaki*, observando-se posteriormente a ocorrência ou não da separação dos componentes, precipitações, formação de sedimentos e coalescência.

A estabilidade da formulação é um fator que pode assegurar sua qualidade para uso em humanos e realização dos testes. A separação de fases, pode indicar falhas na produção ou até mesmo incompatibilidade dos componentes da fórmula (Isaac *et al.*, 2008).

Após a centrifugação e considerando a avaliação macroscópica dos produtos, não foram observadas alterações em nenhuma das três formulações testadas (creme derivado do extrato de folhas verdes; derivado do extrato de folhas vermelhas e formulação controle), sendo mantida a sua integridade física e seus aspetos originais. Estes resultados indicam não ser necessária nenhuma reformulação, já que os cremes demonstraram estabilidade e compatibilidade de seus componentes, permitindo avançar com os ensaios *in vivo* dos efeitos imediatos destes na pele dos voluntários.

5.5 Avaliação *in vivo* dos efeitos imediatos da aplicação da formulação cosmética

Após verificar a estabilidade da formulação, foram preparados ensaios para investigar a compatibilidade cutânea e os efeitos imediatos dos cremes na pele de 7 voluntários. Através do uso de equipamentos biometrológicos, foi avaliado se as formulações causaram o aparecimento de efeitos não desejados na pele, como alteração da função de barreira, irritação, aparecimento de eritema e alterações no conteúdo aquoso.

5.5.1 Determinação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Existem grandes diferenças na composição e função dos cremes hidratantes. Estes produtos são compostos por dois tipos de substâncias: as ativas, como os óleos essenciais, as vitaminas e os extratos de plantas; e os excipientes como os emulsificantes, os antioxidantes e os conservantes. É necessário mais conhecimento sobre os mecanismos e efeitos destes ingredientes sobre a pele, tais como possíveis efeitos inesperados na função e na integridade da barreira da pele (Lodén, 2012).

A análise da TEWL tem como papel fundamental verificar a integridade da barreira da pele já que ela está relacionada com a baixa perda transepidérmica de água (Lodén, 2012). Deste modo, com o equipamento Tewameter é possível avaliar, por exemplo, se determinadas formulações cosméticas contribuem para a diminuição da TEWL. De acordo com o manual do equipamento os valores variam de 0-10 para pele muito saudável, 10-15 para pele saudável, 15-25 pele normal, 25-30 pele cansada e acima de 30 pele em estado crítico.

Os resultados da avaliação da perda de água das formulações de folhas verdes (fvd) e folhas vermelhas (fvm) de dióspiro, além da formulação sem os extratos de dióspiro (fc) e da pele sem aplicação de cremes (cn), podem ser observados na Figura 33. Este gráfico compara as médias do tempo 0 (t0), quando não havia aplicação de cremes na pele, com as medias do tempo 6 (t6), após 6 horas de aplicação do cremes.

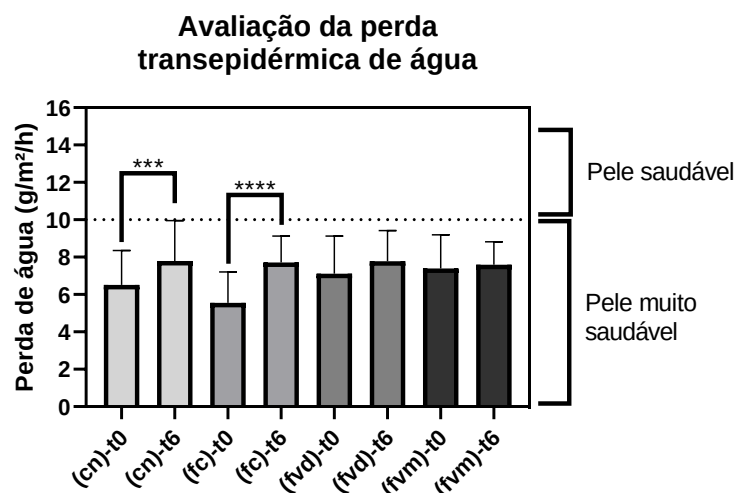


Figura 33 – Gráfico representativo da avaliação da perda transepidérmica de água. O controlo negativo (cn) e as formulações controlo (fc), folhas verdes (fvd) e folhas vermelhas (fvm) foram avaliadas no tempo 0 – t0 (sem aplicação dos cremes) e no tempo 6 – t6 (6 horas após a aplicação dos cremes) quanto a variação da perda de água das regiões demarcadas nos antebraços dos voluntários. Diferença estatística: *** $p = 0,0001$ e **** $p < 0,0001$

Ao analisar os resultados, podemos verificar que a média dos valores apresentada, comparada com a escala fornecida pelo fabricante do equipamento, revela que a pele dos voluntários é muito saudável, já que os valores se mantiveram entre 0-10.

O controlo negativo (cn) apresentou um aumento de $6,509 \pm 1,842$ g/m²/h para $7,794 \pm 2,153$ g/m²/h e a formulação controlo (fc) apresentou um aumento de $5,551 \pm 1,661$ g/m²/h para $7,713 \pm 1,412$ g/m²/h na perda de água, entre a primeira leitura (t0) e a segunda leitura (t6), variações consideradas muito significativas. Já as duas formulações que continham os extratos de dióspiro, não obtiveram aumento significativa na perda de água entre os períodos verificados.

Estes resultados revelaram que a formulação do creme, sem os extratos, não foi capaz de reduzir a perda de água da pele dos voluntários, que pode ter sido causada por fatores externos, já que houve aumento significativo também na área onde não foi aplicado nenhum creme (cn). Este ensaio foi realizado nos meses de verão e a diferença de 6 horas entre as medições pode ter sido influenciada pela exposição da pele dos voluntários no decorrer do dia, à luz solar e à altas temperaturas.

Vários fatores podem provocar alterações na perda transepidérmica de água. Em relação à influência ambiental, a incidência de luz direta pode promover o aquecimento da pele, causando aumento da transpiração, além disto, a estação do ano e o clima influenciam na humectação cutânea. Outros fatores importantes são o estilo de vida, a alimentação, o consumo regular de nicotina e álcool, o *stress* e o uso de produtos farmacêuticos e cosméticos (Gonçalves & Campos, 2009).

As formulações de folhas verdes (fvd) e de folhas vermelhas (fvm), por não terem exibido aumento na TEWL, podem indicar que estas substâncias ativas influenciaram na manutenção da água na pele, já que a única diferença entre estes cremes e a formulação controle (fc) foi a adição dos extratos de dióspiro. Provavelmente os extratos de dióspiro promoveram melhora na função de barreira da pele, impedindo que os fatores externos, ou até mesmo intrínsecos, aumentassem a evaporação de água da pele nas áreas tratadas com estes cremes.

Segundo Huang & Chang, (2008), quando a pele é danificada, sua função de barreira é prejudicada, resultando em maior perda de água. Como não ocorreram aumentos significativos na TEWL nas áreas de aplicação dos cremes de dióspiro, infere-se que eles não causaram danos imediatos ou lesões na pele dos voluntários. Entretanto para verificar se as formulações não apresentaram efeitos adversos na pele, outros parâmetros devem ser avaliados.

5.5.2 Determinação da hidratação da pele

Para avaliar a capacidade que uma formulação cosmética tem para hidratar a pele, a avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo é indispensável (O'Goshi & Serup, 2005; Wiedersberg *et al.*, 2009). Assim, nesse trabalho foi utilizado o equipamento Corneometer que emprega o método da capacitância para analisar se as formulações em estudo seriam capazes de alterar a hidratação da pele após 6 horas de sua aplicação. A capacitância variável total da superfície da pele é convertida em unidades arbitrárias (UA) de hidratação da pele e varia de 0 a 130, onde <30 corresponde a muito secas, de 30-40 a seca e >40 a suficientemente hidratada.

Os resultados da avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo das formulações estão expressos na Figura 34. Este gráfico compara as médias iniciais (t_0), quando não havia aplicação de cremes na pele, com as médias finais (t_6), após 6 horas de aplicação dos cremes.

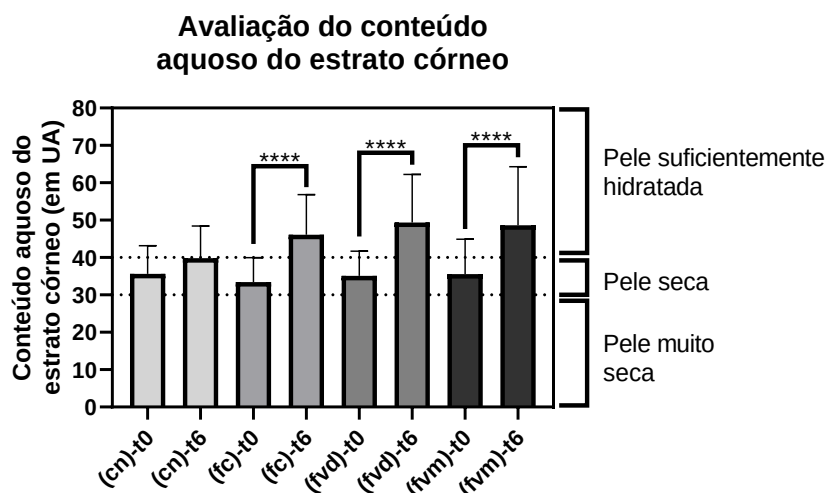


Figura 34 – Gráfico representativo da avaliação hidratação da pele. O controlo negativo (cn) e as formulações controlo (fc), de folhas verdes (fvd) e de folhas vermelhas (fvm) foram avaliadas no tempo 0 – t0 (sem aplicação dos cremes) e no tempo 6 – t6 (6 horas após a aplicação dos cremes) quanto a variação do conteúdo aquoso do estrato córneo das regiões demarcadas nos antebraços dos voluntários. Diferença estatística: **** $p < 0,0001$

Ao analisar os valores obtidos para o conteúdo aquoso presente na pele dos voluntários, verifica-se que na primeira medição t0, ainda sem a aplicação dos cremes, todas as médias ficaram entre 30-40, indicando uma “pele seca”. Entretanto, na medição t6 após a aplicação dos cremes os valores ficaram maiores que 40, com alteração na hidratação da pele para “pele suficientemente hidratada”, mudança que não ocorreu para o controlo negativo (cn), indicando que provavelmente fatores externos e fatores intrínsecos, não influenciaram na hidratação da pele, visto que o controlo negativo (cn) não apresentou diferenças significativas na hidratação da pele.

Já ao comparar a medição t0 e t6 de cada área, o controlo negativo também não apresentou aumento significativo, ao contrário das três formulações que apresentaram um aumento significativo ($p < 0,0001$) do conteúdo aquoso (Figura 34). Estes resultados indicam que os componentes das formulações possuem efeito hidratante da pele e que estes efeitos ainda podem ser observados após 6 horas de aplicação.

As formulações deste trabalho foram preparadas a partir de emulsão O/W. O tipo de emulsão, óleo em água (O/W) ou água em óleo (W/O), influencia o comportamento de hidratação da pele. As medições de capacitância para uma emulsão O/W mostram normalmente um aumento imediato e significativo na hidratação da pele após aplicação do produto (Serup *et al.*, 2006). Dependendo da eficácia do produto, os valores de capacitância podem ser mantidos por várias horas. A eficácia do produto depende da natureza e quantidade de humectantes que mantem a água na formulação (Serup *et al.*, 2006).

As formulações cosméticas são compostas por ingredientes que tem efeitos hidratantes na pele, como por exemplo, o glicerol, que atua como humectante devido sua alta propriedade higroscópica (Roussel *et al.*, 2012), a betaína que tem função humectante e condicionadora da pele e cabelos (Burnett *et al.*, 2018), alguns óleos essenciais, que além da função de aromatizantes podem desempenhar efeitos hidratantes e aumento da elasticidade da pele (Sarkic & Stappen, 2018). Outra “molécula chave” envolvida na humidade da pele é o ácido hialurônico, que possui capacidade única de reter água (Papakonstantinou *et al.*, 2012). Estes e outros compostos presentes nas formulações testadas (fc, fvd e fvm) influenciaram o resultado de hidratação demonstrado nos resultados.

Todas as formulações testadas (fc, fvd e fvm), com e sem extratos de dióspiro, apresentaram aumento muito significativo do conteúdo aquoso do estrato córneo, o que pode indicar que os extratos não tiveram papel fundamental no aumento da hidratação da pele. Esta afirmação pode ser corroborada quando se compara estatisticamente a medida t0 de todas as formulações, que não apresentaram diferenças significativas e posteriormente as medidas t6, onde também não foram constatadas alterações significativas, ou seja, as formulações demonstraram efeito hidratante equivalente em todas as regiões.

A comprovação dos efeitos hidratantes das formulações é de grande interesse, pois manter a pele adequadamente hidratada melhora o seu aspeto geral, retarda o envelhecimento cutâneo e previne ou trata determinadas doenças de pele (Gonçalves & Campos, 2009).

Enfim, as formulações apresentaram importante efeito hidratante da pele, que preliminarmente não foram causados pelos extratos de dióspiro. Como estes ensaios são para verificar a preservação da função de barreira da pele e a ausência de efeitos adversos causados pelos extratos, podemos inferir que os mesmos não apresentaram efeitos negativos na pele.

5.5.3 Determinação de formação de eritema na epiderme

Complementarmente e não menos importante, é fundamental avaliar a formação de eritema, que é um dos primeiros e principais reações da pele a agentes externos. O eritema é uma reação inflamatória cutânea aguda caracterizada por sinais de inflamação, incluindo vermelhidão, calor, sensibilidade e edema (Akhtar *et al.*, 2012). Ele é um indicador da integridade da barreira cutânea e ocorre quando a pele é exposta a substâncias irritantes, como produtos químicos, produtos de limpeza, alérgenos ou raios UV (Khosrowpour *et al.*, 2019).

Para avaliar se as formulações provocaram alguma reação adversa imediata na pele causando a formação de eritema, foi utilizado o equipamento Mexameter que através da medição dos picos de absorção espectral de hemoglobina fornece o índice de eritema, que varia de 0 a 999 unidades arbitrárias (UA). De acordo com o manual do fabricante, valores entre 0-170 indicam ausência de eritema, entre 170-330 eritema mínimo, entre 330-450 vermelhidão difusa, entre 450-570 presença de eritema forte e maior que 570 eritema extremo.

Os resultados da avaliação da formação de eritema nas áreas de aplicação das formulações são expressos na Figura 35. Este gráfico compara as médias iniciais (t0), quando não havia aplicação de cremes na pele, com as médias finais (t6), após 6 horas de aplicação dos cremes.

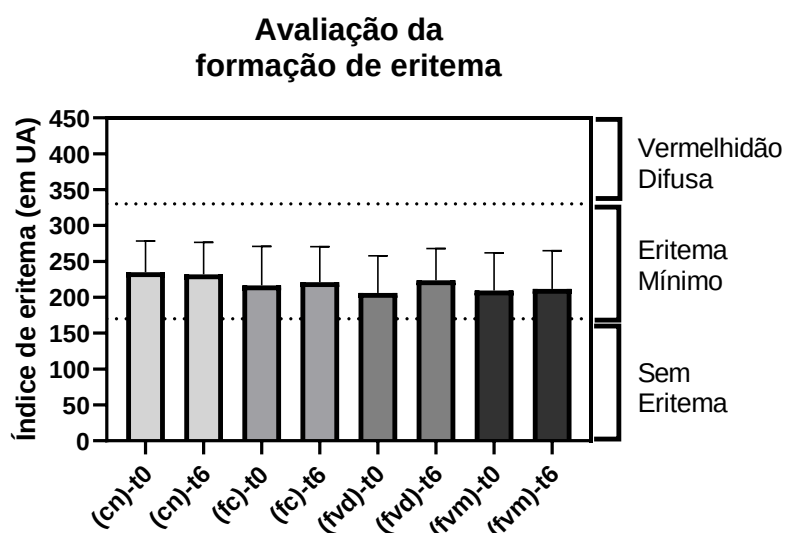


Figura 35 – Gráfico representativo da avaliação da formação de eritema. O controle negativo (cn) e as formulações controle (fc), de folhas verdes (fvd) e de folhas vermelhas (fvm) foram avaliadas no tempo 0 – t0 (sem aplicação dos cremes) e no tempo 6 – t6 (6 horas após a aplicação dos cremes) quanto a variação do índice de eritema das regiões demarcadas nos antebraços dos voluntários.

Ao se comparar as médias das medições do índice de eritema antes da aplicação (t0) e após 6 horas da aplicação (t6) das formulações (fc, fvd e fvm), não foi observado nenhum aumento significativo nos valores, o que indica que não provocaram irritação ou aumento da vermelhidão nos locais testados. O mesmo foi observado na área onde não houve aplicação de nenhum creme. Mostrando assim que a pele teve comportamento semelhante em todos os locais testados e os cremes não tiveram nenhuma

influência para este ensaio. O que é positivo, já que demonstram uma boa compatibilidade cutânea e ausência de potencial alergénico.

No período dos ensaios não foi observado nenhum sinal visual que indicasse algum tipo de reação aos cremes e os voluntários não relataram nenhum tipo de desconforto ou queixa após os períodos de teste, corroborando os resultados apresentados.

Globalmente, os resultados dos efeitos imediatos dos cremes na pele demonstraram que as formulações de folhas de dióspiro apresentam compatibilidade cutânea, sendo, portanto, consideradas seguras para aplicação na pele humana. Ademais indicam que os extratos de folhas de dióspiro exibem bom potencial para aplicações cosméticas e dermatológicas, muito provavelmente devido aos compostos fenólicos que os constituem. O baixo custo de produção e o elevado valor acrescentado destes extratos no campo cosmético é particularmente interessante, no entanto, são necessários mais estudos para se obter resultados mais conclusivos, principalmente no que diz respeito a um ensaio de eficácia clínica dos cremes.

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os cosméticos/cosmecêuticos à base de extratos de plantas têm despertado muito interesse por parte dos consumidores, que buscam cada vez mais, produtos naturais, sustentáveis, eficientes e seguros. Esta demanda, faz com que, quer as indústrias farmacêuticas e de cosméticos, quer grupos de investigação, invistam em pesquisas, procurando compreender os mecanismos de ação dos fitoquímicos mais conhecidos e buscando novas plantas e compostos naturais para serem usados nesta categoria de produtos.

O *Diospyros kaki* é uma planta que tem uma composição fitoquímica muito rica e por isso tem inúmeros benefícios para a saúde, muitos já conhecidos. Entre eles, os benefícios à pele, tornam esta planta uma boa opção a ser utilizado em formulações cosméticas. De facto, a literatura apresenta inúmeros efeitos benéficos de extratos de dióspiro à pele que têm sido associados à sua rica composição em polifenóis .

Nesta pesquisa foram investigados alguns dos benefícios do dióspiro, principalmente seus efeitos antioxidantes. Para isso foram utilizados extratos das folhas e do resíduo da fermentação alcoólica do fruto, para realização de ensaios bioquímicos (com metodologias conhecidas) e ensaios *in vitro* com linhas celulares da pele.

Nos ensaios bioquímicos, os extratos de folhas verdes e de folhas vermelhas apresentaram potente atividade antioxidante com destaque para o ensaio de superóxido e de inibição de óxido nítrico em que se obtiveram resultados de EC 50 significativamente inferiores aos compostos de referência testados. No ensaio de quelação de ferro, os resultados foram mais modestos, mostrando alguma atividade de quelação sendo esta, no entanto, bastante inferior ao composto de referência usado. No ensaio de sequestro do radical DPPH, os dois extratos de folhas apresentaram atividade significativamente superior à do composto de referência utilizado. Diante dos resultados apresentados os dois extratos de folhas têm grande potencial antioxidante, podendo ser muito benéficos em formulações cosméticas anti-envelhecimento, por exemplo.

A epiderme pode ser danificada pelo stress oxidativo causado por radicais livres, riscos químicos e radiação UV. Os queratinócitos constituem mais de 80% das células epidérmicas, portanto, a sua proteção contra o stress oxidativo é uma estratégia anti-envelhecimento importante.

Os ensaios com as linhas celulares queratinócitos HaCaT e fibroblastos L929, indicaram globalmente as concentrações não citotóxicas dos extratos que poderão ser utilizadas em formulações cosméticas. Algumas concentrações dos extratos de folhas vermelhas e de folhas verdes apresentaram viabilidades maiores que as do controlo, indicando provavelmente o aumento na proliferação ou aumento no metabolismo das células, o que pode ser um bom indicativo, já que os queratinócitos estão em constante proliferação e os fibroblastos sintetizam colagénio e elastina e ambos são importantes fatores para a renovação e manutenção da vitalidade da pele.

Todos os extratos apresentaram concentrações capazes de proteger as células contra insulto oxidativo t-BHP. Globalmente o extrato de folhas verdes apresentou melhor capacidade de citoproteção, seguido pelo de folhas vermelhas e o de resíduo alcoólico. No ensaio com DCFDA, o extrato de folhas verdes confirmou os resultados anteriores, apresentando uma diminuição significativa das ERO intracelulares causadas pelo t-BHP. Estes resultados em linhas celulares revelaram uma atividade de proteção significativa dos extratos, confirmando os ensaio bioquímicos anteriores, indicando-os como potenciais matérias-primas para produção de formulações cosméticas para a pele.

Deste modo, foram produzidas duas formulações cosméticas com folhas verdes e folhas vermelhas de dióspiro, respetivamente. Elas foram testadas com a utilização de equipamentos biometrológicos muito utilizados na avaliação de cosméticos e indicaram resultados satisfatórios quanto aos seus efeitos imediatos na pele. Os cremes aumentaram a hidratação da pele, não induziram formação de eritema e não aumentaram a perda transepidérmica de água, demonstrando que eles não provocaram reações indesejadas e preservaram a função de barreira da pele.

Como perspectivas futuras seria interessante avaliar a capacidade anti-inflamatória dos extratos de dióspiro nas linhas celulares utilizadas neste trabalho para aplicação em outros tipos de cosméticos. Adicionalmente, seria igualmente importante fazer um ensaio de eficácia clínica das formulações, a longo prazo, para verificar se os efeitos antioxidantes demonstrados nos ensaios bioquímicos e celulares serão observados também na pele, já que devido a inúmeros fatores, a reprodutibilidade dos efeitos demonstrados em ensaios *in vitro* pode ser bem diferente dos apresentados *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M., Amjad, M., Sadaf, H., Riaz, I., ... Sabaoon, N. (2017). Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 205–214.
- Akagi, T., Katayama-Ikegami, A., & Yonemori, K. (2011). Proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 130(2), 373–380.
- Akbulut, M., Ercisli, S., Yildirim, N., Orhan, E., & Agar, G. (2008). The comparison of persimmon genotypes (*Diospyros kaki* Thunb.) by using RAPD and FAME data. *Romanian Biotechnological Letters*, 13(4), 3851–3858.
- Akhtar, N., Khan, A. B., Muhammad, S., Ahmed, M., Khan, H. M. S., Rasool, F., & Saeed, T. (2012). Formulation and characterization of a cream containing terminalia chebula extract. *Forschende Komplementarmedizin*, 19(1), 20–25.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152.
- Ali-Boucetta, H., Al-Jamal, K. T., & Kostarelos, K. (2011). Cytotoxic assessment of carbon nanotube interaction with cell cultures. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 726, 299–312.
- Allemann, I. B., & Baumann, L. (2009). Botanicals in skin care products. *International Journal of Dermatology*, 48(9), 923–934.
- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98(1), 23–31.
- André, P., Haneke, E., Marini, L., & Payne, C. (2017). Cosmetic Medicine and Surgery. In *Cosmetic Medicine and Surgery* (1st ed.).
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399.
- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, 32(1), 3–13.
- Baltacioğlu, H., & Artik, N. (2013). Study of postharvest changes in the chemical composition of persimmon by HPLC. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(5), 568–574.
- Barbulova, A., Apone, F., & Colucci, G. (2014, April). Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, Vol. 1, pp. 94–104.
- Barbulova, A., Colucci, G., & Apone, F. (2015). New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, Vol. 2, pp. 82–92.
- Benz, C. C., & Yau, C. (2008). Ageing, oxidative stress and cancer: Paradigms in parallax. *Nature Reviews Cancer*, 8(11), 875–879.
- Bibi, N., Khattak, A. B., & Mehmood, Z. (2007). Quality improvement and shelf life extension of persimmon fruit (*Diospyros kaki*). *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1359–1363.

- Blantz, R. C., & Munger, K. (2002). Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*, Vol. 90, pp. 373–378.
- Boligon, A., & Athayde, M. (2014). Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin Chromatography*, 1(3), 2–3.
- Boligon, A., Machado, M., & Athayde, M. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, 4(7), 517–522.
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., ... Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR).
- Brandt, F. S., Cazzaniga, A., & Hann, M. (2011). Cosmeceuticals: Current Trends and Market Analysis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 30(3), 141–143.
- Burnett, C. L., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., ... Heldreth, B. (2018). Safety Assessment of Alkyl Betaines as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 37(1_suppl), 28S-46S.
- Busch, K. H., Bender, R., Walezko, N., Aziz, H., Altintas, M. A., & Aust, M. C. (2016). Combination of medical needling and non-cultured autologous skin cell transplantation (ReNovaCell) for repigmentation of hypopigmented burn scars. *Burns*, 42(7), 1556–1566.
- Butt, M. S., Sultan, M. T., Aziz, M., Naz, A., Ahmed, W., Kumar, N., & Imran, M. (2015). Persimmon (diospyros kaki) fruit: Hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI Journal*, 14, 542–561.
- Campa, M., & Baron, E. (2018). Anti-aging effects of select botanicals: Scientific evidence and current trends. *Cosmetics*, 5(3), 1–15.
- Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M. V., Igartuburu, J. M., & Garcia Barroso, C. (2014). Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry*.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 40(2), 450–458.
- Cavinato, M. (2018). Cosmetics and Cosmeceuticals. In *Reference Module in Biomedical Sciences*.
- Cefali, L. C., Ataíde, J. A., Moriel, P., Foglio, M. A., & Mazzola, P. G. (2016). Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(4), 346–353.
- Celik, A., & Ercisli, S. (2008). Persimmon cv. Hachiya (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit: Some physical, chemical and nutritional properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7–8), 599–606.
- Chang, Y. L., Lin, J. T., Lin, H. L., Liao, P. L., Wu, P. J., & Yang, D. J. (2019). Phenolic compositions and antioxidant properties of leaves of eight persimmon varieties harvested in different periods. *Food Chemistry*, 289(March), 74–83.
- Charles Dorni, A. I., Amalraj, A., Gopi, S., Varma, K., & Anjana, S. N. (2017). Novel cosmeceuticals from plants—An industry guided review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7(May), 1–26.
- Chen, X. N., Fan, J. F., Yue, X., Wu, X. R., & Li, L. T. (2008). Radical scavenging activity and phenolic

- compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). *Journal of Food Science*, 73(1).
- Cho, J. K., Park, J. M., Jeon, I. H., Kim, H. S., & Jang, S. Il. (2011). Effect of persimmon leaf extract on ultraviolet B-induced inflammation in HaCaT keratinocytes and mice. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(4), 583–590.
- Chuong, C., Nickoloff, B., Elias, P., Goldsmith, L., Macher, E., Maderson, P., ... K, T.-P. (2002). Section Editor : Ralf Paus , Hamburg What is the ‘ true ’ function of skin ? *Experimental Dermatology*, 11, 159–187.
- Colle, D., Arantes, L. P., Gubert, P., Da Luz, S. C. A., Athayde, M. L., Teixeira Rocha, J. B., & Soares, F. A. A. (2012). Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* leaf extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *Journal of Medicinal Food*, 15(6), 549–556.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., Zulak, K. G., Liscombe, D. K., Ashihara, H., & Facchini, P. J. (2006). Alkaloids. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (pp. 102–135).
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2007). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (i), 1–24.
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222–12248.
- Darlenski, R., Sassning, S., Tsankov, N., & Fluhr, J. W. (2009). Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 295–303.
- de Campos, S. S., Wittmann, M. T. S., Schwarz, S. F., & Veit, P. A. (2015). Biologia floral e viabilidade de pólen em cultivares de caqui (Diospyros kaki L.) E *Diospyros virginiana* L. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(3), 685–691.
- Dias, A. C. P., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Fernandes-Ferreira, M. (1999). The development and evaluation of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from in vivo and in vitro biomass of *Hypericum* species. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 22(2), 215–227.
- Direito, R., Lima, A., Rocha, J., Ferreira, R. B., Mota, J., Rebelo, P., ... Figueira, M. E. (2017). *Diospyros kaki* phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, 100–108.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- El-Hawary, S. S., Tadros, S. H., AbdelMohsen, M. M., Mohamed, M. S., El Sheikh, E., Nazif, N. M., & ElNasr, M. S. (2019). Phyto- and Bio-Chemical evaluation of *Diospyros kaki* L. cultivated in Egypt and its biological activities. *Brazilian Journal of Biology*, 69(4), 1–10.
- Emanuele, A. A. A. C. R. G. (2014). Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. *Conceitos e Métodos Para a Formação de Profissionais Em Laboratórios de Saúde - Volume 2*, 252.
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2007). Structural characteristics of the aging

- skin: A review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26(4), 343–357.
- Fluhr, J. W. (2011). Practical aspects of cosmetic testing: How to set up a scientific study in skin physiology. In *Practical Aspects of Cosmetic Testing: How to Set up a Scientific Study in Skin Physiology*.
- Fumagali, E., Gonçalves, R. A. C., Machado, M. D. F. P. S., Vidoti, G. J., & De Oliveira, A. J. B. (2008). Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(4), 627–641.
- Giordani, E., Doumett, S., Nin, S., & Del Bubba, M. (2011). Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits. *Food Research International*, 44(7), 1752–1767.
- Gonçalves, G. M. S., & Campos, P. M. B. G. M. (2009). Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 1–10.
- Gu, H. F., Li, C. M., Xu, Y. J., Hu, W. F., Chen, M. H., & Wan, Q. H. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, 41(2), 208–217.
- Ha, J. H., Rang Kim, A., Lee, K. S., Xuan, S. H., Kang, H. C., Lee, D. H., ... Park, S. N. (2019). Anti-Aging activity of *lavandula angustifolia* extract fermented with *pediococcus pentosaceus* DK1 isolated from *diospyros kaki* fruit in UVB-irradiated human skin fibroblasts and analysis of principal components. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 21–29.
- Hanson, P. M., Yang, R.-Y., Tsou, S. C. S., Ledesma, D., Engle, L., & Lee, T.-C. (2006). Diversity in eggplant (*Solanum melongena*) for superoxide scavenging activity, total phenolics, and ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 594–600.
- Harborne, J. B. (1984). Methods of Plant Analysis. *Phytochemical Methods*, 1–36.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory on free radical radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11, 298–300.
- Heng, M. Y., Katayama, S., Mitani, T., Ong, E. S., & Nakamura, S. (2017). Solventless extraction methods for immature fruits: Evaluation of their antioxidant and cytoprotective activities. *Food Chemistry*, 221, 1388–1393.
- Honari, G., Andersen, R. M., & Maibach, H. (2017). Skin Structure and Function. In *Sensitive Skin Syndrome* (2nd ed.), 16–22.
- Hosseinimehr, S. J., Khorasani, G., Azadbakht, M., Zamani, P., Ghasemi, M., & Ahmadi, A. (2010). Effect of aloe cream versus silver sulfadiazine for healing burn wounds in rats. *Acta Dermatovenereologica Croatica*, 18(1), 2–7.
- Huang, H. C., & Chang, T. M. (2008). Ceramide 1 and ceramide 3 act synergistically on skin hydration and the transepidermal water loss of sodium lauryl sulfate-irritated skin. *International Journal of Dermatology*, 47(8), 812–819.
- Husein el Hadmed, H., & Castillo, R. F. (2016). Cosmeceuticals: peptides, proteins, and growth factors. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(4), 514–519.
- Hussain, S. H., Limthongkul, B., & Humphreys, T. R. (2013). The Biomechanical Properties of the Skin. *Dermatologic Surgery*, 39(2), 193–203.

- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Inoue, S. (2017). Skin Aging. In *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*.
- Isaac, V. L. B., Cefali, L. C., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N., & Corrêa, M. A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 29(1), 81–96.
- James, W., Berger, T., Elston, D., & Neuhaus, I. (2016). *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology* (12th ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Marti, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, 182, 282–291.
- Jo, C., Son, J. H., Shin, M. G., & Byun, M. W. (2003). Irradiation effects on color and functional properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. folium) leaf extract and licorice (*Glycyrrhiza Uralensis* Fischer) root extract during storage. *Radiation Physics and Chemistry*, 67(2), 143–148.
- Kabir, F., Tow, W. W., Hamauzu, Y., Katayama, S., Tanaka, S., & Nakamura, S. (2015). Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. *Food Chemistry*, 167, 358–362.
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2005). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., ... Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1–6.
- Kashif, M., Akhtar, N., & Mustafa, R. (2017). An overview of dermatological and cosmeceutical benefits of diospyros kaki and its phytoconstituents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(5), 650–662.
- Kawakami, K., Nishida, H., Tatewaki, N., Eguchi-kasai, K., & Anzai, K. (2013). Persimmon Leaf Flavonols Enhance the Anti-Cancer Effect of Heavy Ion Radiotherapy on Murine Xenograft Tumors. *Journal of Cancer Therapy*, 2013(September), 1150–1157.
- Kawakami, K., Shibukura, Y., Kanno, T., Furuki, T., Aketa, S., & Hirayama, M. (2011). Identification of 2"-Galloylated flavonol 3-o-glycosides accumulating in developing leaves of persimmon. *Phytochemical Analysis*, 22(5), 403–410.
- Kluge, R. A., & Tessmer, M. A. (2018). Caqui—*Diospyros kaki*. *Exotic Fruits*, (1983), 113–119.
- Kohen, R. (1999). Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 53(4), 181–192.
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213.
- Končić, M. Z., Barbarić, M., Perković, I., & Zorc, B. (2011). Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. *Molecules*, 16(8), 6232–6242.

- Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., Suemura, M., ... Tanaka, T. (2000). Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/NGa mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1 I), 159–166.
- Lee, J.-H., Lee, Y.-B., Seo, W.-D., Kang, S.-T., Lim, J.-W., & Cho, K.-M. (2012). Comparative Studies of Antioxidant Activities and Nutritional Constituents of Persimmon Juice (*Diospyros kaki* L. cv. Gapjubaekmok). *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(2), 141–151.
- Lee, J. S., Lee, M. K., Ha, T. Y., Bok, S. H., Park, H. M., Jeong, K. S., ... Choi, M.-S. (2006). Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(11), 1875–1883.
- Li, S., Zhang, Z., Cain, A., Wang, B., Long, M., & Taylor, J. (2005). Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 32–37.
- Li, Y., Wang, S., Xin, Y., Zheng, M., Xu, F., Xi, X., ... Han, C. (2018). Maca cosmetics: A review on constituents, therapeutics and advantages. *Journal of Oleo Science*, 67(7), 789–800.
- Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S–3485S.
- Lodén, M. (2012). Effect of moisturizers on epidermal barrier function. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 286–296.
- MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874–880.
- Mahmood, T., & Akhtar, N. (2013). Short term study of human skin irritation by single application closed patch test: Assessment of four multiple emulsion formulations loaded with botanical extracts. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 32(1), 35–40.
- Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2007). Molecular mechanisms of skin aging: State of the art. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1), 40–50.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., & Sharma, P. K. (2010). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, pp. 22–26.
- Martin, P., & Feng, Y. (2009). Inflammation: Wound healing in zebrafish. *Nature*, 459(7249), 921–923.
- Martínez-calvo, J., Badenes, M. L., & Llácer, G. (2012). *Descripción de nuevas variedades de caqui (Diospyros kaki Thunb.) del Banco de Germoplasma del IVIA*. 19.
- Matsui, M. S., Hsia, A., Miller, J. D., Hanneman, K., Scull, H., Cooper, K. D., & Baron, E. (2009). Non-sunscreen photoprotection: Antioxidants add value to a sunscreen. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14(1), 56–59.
- Matsuo, T., & Ito, S. (1978). The Chemical Structure of Kaki-Tannin from Immature Fruit of the Persimmon (*Diospyros Kaki* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(9), 1637–1643.
- Matsushita, Y., Jang, I. C., Imai, T., Fukushima, K., Lee, J. M., Park, H. R., & Lee, S. C. (2011). Antioxidant and cytotoxic activities of naphthalene derivatives from *Diospyros kaki*. *Journal of Wood Science*, 57(2), 161–165.
- Mendoza, N., & Silva, E. M. E. (2018). Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance. In *Phytochemicals - Source of Antioxidants*

and Role in Disease Prevention, 25–47.

- Miguel, M. G. (2007). Plantas Aromáticas E Medicinais Como Antioxidantes Naturais : *Potencialidades e Aplicações Das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático.*, 106–136.
- Min, B., McClung, A. M., & Chen, M.-H. (2011). Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans of Different Color. *Journal of Food Science*, 76(1), C117–C126.
- Miret, S., De Groene, E. M., & Klaffke, W. (2006). Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(2), 184–193.
- Moharamzadeh, K., Van Noort, R., Brook, I. M., & Scutt, A. M. (2007). Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental Materials*, 23(1), 40–44.
- Mohsin, S., Akhtar, N., Mahmood, T., Khan, H., & Mustafa, R. (2016). Formulation and stability of topical water in oil emulsion containing corn silk extract. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(6), 1115–1121.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K., & Sarkar, B. K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, 19(1), 64–73.
- Nardinic, J., Ferraro, G., Martino, V., Bandoni, A., & Nardinic, J. (2015). Fitocosmética. In *Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales* (1st ed.). Editorial Universitaria de Buenos Aires.
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247–256.
- Neuwald, D. A., Sestari, I., Saquet, A. A., & Sautter, C. K. (2009). Persimmon production and commercialization in Brazil: An Overview. *Acta Horticulturae*, 833, 51–56.
- O’Goshi, K. I., & Serup, J. (2005). Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the Corneometer®. *Skin Research and Technology*, 11(2), 107–109.
- Oulkheir, S., Ounine, K., Haloui, N., & Attarassi, B. (2015). Antimicrobial Effect of Citric , Acetic , Lactic Acids and Sodium Nitrite against Escherichia Coli in Tryptic Soy Broth. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(3), 12–20.
- Ozdemir, K. G., Yilmaz, H., & Yilmaz, S. (2009). In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90 B(1), 82–86.
- Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 253–258.
- Park, K. J., Tuboni, C. T., Oliveira, R. A., & Park, K. J. B. (2004). Estudo Da Secagem De Caqui Giombo Com Encolhimento E Sem Encolhimento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 6(1), 71–86.
- Pérez-Burillo, S., Oliveras, M. J., Quesada, J., Rufián-Henares, J. A., & Pastoriza, S. (2018). Relationship between composition and bioactivity of persimmon and kiwifruit. *Food Research International*, 105(September 2017), 461–472.

- Piana, M., Zadra, M., de Brum, T. F., Boligon, A. A., Gonçalves, A. F. K., da Cruz, R. C., ... Athayde, M. L. (2013). Analysis of Rutin in the Extract and Gel of *Viola tricolor*. *Journal of Chromatographic Science*, 51(5), 406–411.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01), 1–10.
- Poyton, R. O., Ball, K. A., & Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 332–340.
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072.
- Ramos-e-Silva, M., & Jacques, C. de M. C. (2012). Epidermal barrier function and systemic diseases. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 277–279.
- REGULAMENTO (CE) N.º 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. (2009). *Jornal Oficial Da União Europeia*, pp. 1–363. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1223-20180801&from=FR>
- Revision of the SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 9th revision. (2016). *Revision of the SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation, 9th Revision, 1564*(September 2015), 151.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*.
- Rodan, K., Fields, K., Majewski, G., & Falla, T. (2016). Skincare Bootcamp. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, 4(July), e1152.
- Rogério, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., Da Silva, E. V. G., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G., & Faccioli, L. H. (2007). Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, 56(10), 402–408.
- Rogiers, V. (2001). EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 14(2), 117–128.
- Roussel, L., Atrux-Tallau, N., & Piro, F. (2012). Glycerol as a skin barrier influencing humectant. In *Treatment of Dry Skin Syndrome: The Art and Science of Moisturizers*.
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., & Garbarino, J. A. (2005). Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* Sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 323–332.
- Sakanaka, S., & Ishihara, Y. (2008). Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chemistry*, 107(2), 739–744.
- Saklani, A., & Kutty, S. K. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, 13(3–4), 161–171.
- Sarkic, A., & Stappen, I. (2018). Essential oils and their single compounds in cosmetics-a critical review. *Cosmetics*, 5(1).
- Seeley, R., Stephens, T., & Tate, P. (2004). *Anatomy & Physiology* (6th ed.). Boston, MA: McGraw-Hill

Education.

- Serup, J., Jemec, B. E., & Grove, G. L. (2006). *Handbook of non-invasive methods and the skin*. CRC/Taylor & Francis.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259.
- Shon, M. S., Lee, Y., Song, J. H., Park, T., Lee, J. K., Kim, M., ... Kim, G. N. (2014). Anti-aging potential of extracts prepared from fruits and medicinal herbs cultivated in the Gyeongnam area of Korea. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(3), 178–186.
- Smith, S. M., Wunder, M. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2011). A simple protocol for using a LDH-Based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS ONE*, 6(11).
- Sousa, C. M. D. M., Silva, H. R. E., Vieira, G. M., Ayres, M. C. C., Da Costa, C. L. S., Araújo, D. S., ... Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), 351–355.
- Sun, L., Zhang, J., Fang, K., Ding, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2014). Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki*) leaves (FPL) attenuate H₂O₂-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells via the NF- κ B pathway. *Food and Function*, 5(3), 471–479.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., & Zhang, Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10), 2689–2696.
- Suzuki, T., Someya, S., Hu, F., & Tanokura, M. (2005). Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*). *Food Chemistry*, 93(1), 149–152.
- Takács, T., Czakó, L., Morschl, É., László, F., Tiszlavicz, L., Rakonczay, Z., & Lonovics, J. (2002). The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas*, 25(3), 277–282.
- Tim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 4, Fruits. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*, 2, 1–1022.
- Toklu, H., Antigua, A., Lewis, V., Reynolds, M., & Jones, J. (2019). Cosmetovigilance: A review of the current literature. *Journal of Family Medicine and Primary Care*.
- Toschi, T. G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G., & Biagi, P. L. (2000). The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3973–3978.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2001). Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3476–3479.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using

- microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5–6), 612–616.
- Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184, 355–362.
- Wang, L., Gaigalas, A. K., & Yan, M. (2011). Chapter 3 Quantitative Fluorescence Measurements. In *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 699).
- Wattel, A., Kamel, S., Mentaverri, R., Lorget, F., Prouillet, C., Petit, J. P., ... Brazier, M. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, 65(1), 35–42.
- Wiedersberg, S., Leopold, C. S., & Guy, R. H. (2009). Effects of various vehicles on skin hydration in vivo. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(3), 128–130.
- Wright, C. Y., Karsten, A. E., Wilkes, M., Singh, A., du Plessis, J., Albers, P. N., & Karsten, P. A. (2016). Diffuse Reflectance Spectroscopy Versus Mexameter® MX18 Measurements of Melanin and Erythema in an African Population. *Photochemistry and Photobiology*, 92(4), 632–636.
- Xie, C., Xie, Z., Xu, X., & Yang, D. (2015). Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 229–240.
- Xue, Y. L., Miyakawa, T., Hayashi, Y., Okamoto, K., Hu, F., Mitani, N., ... Tanokura, M. (2011). Isolation and tyrosinase inhibitory effects of polyphenols from the leaves of persimmon, *Diospyros kaki*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6011–6017.
- Yaqub, S., Farooq, U., Shafi, A., Akram, K., Murtaza, M. A., Kausar, T., & Siddique, F. (2016). Chemistry and Functionality of Bioactive Compounds Present in Persimmon. *Journal of Chemistry*, Vol. 2016.
- Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., ... Guivarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chemistry*.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.
- Zhong, J. J. (2011). Plant Secondary Metabolites. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 3).
- Zhou, Zhi, Li, N., Zhang, H. F., Wang, Q. Q., Yu, Q., Wang, F., ... Liu, D. C. (2019). Simultaneous quantitative analysis of 11 flavonoid derivatives with a single marker in persimmon leaf extraction and evaluation of their myocardium protection activity. *Journal of Natural Medicines*, 73(2), 404–418.
- Zhou, Zhide, Huang, Y., Liang, J., Ou, M., Chen, J., & Li, G. (2016). Extraction, purification and anti-radiation activity of persimmon tannin from *Diospyros kaki* L.f. *Journal of Environmental Radioactivity*, 162–163(October), 182–188.