

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REBECA WELINSKI DE OLIVEIRA D'ANGELO

AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE AMORA-  
PRETA CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE, VISANDO SUA UTILIZAÇÃO  
EM COSMÉTICOS

CURITIBA

2019

REBECA WELINSKI DE OLIVEIRA D'ANGELO

AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE AMORA-  
PRETA CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE, VISANDO SUA UTILIZAÇÃO  
EM COSMÉTICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre, no Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Daniela Florencio Maluf

CURITIBA  
2019

D'Angelo, Rebeca Welinski de Oliveira

Avaliação química e atividade biológica de extratos de amora-preta cultivares Tupy, Guarany e Xavante, visando sua utilização em cosméticos [recurso eletrônico] / Rebeca Welinski de Oliveira D'Angelo – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Professora Dra. Daniela Florencio Maluf

1. Amora-preta. 2. Ação antioxidante. 3. Compostos fenólicos. 4. Radicais livres. 5. Cromatografia líquida de alta pressão. 6. Nanotecnologia. 7. Sistemas vesiculares. I. Pontarolo, Roberto. II. Maluf, Daniela Florencio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.372



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **REBECA WELINSKI DE OLIVEIRA D ANGELO** intitulada: **AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE AMORA-PRETA CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE, VISANDO SUA UTILIZAÇÃO EM COSMÉTICOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Junho de 2019.



ROBERTO PONTAROLO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



FLAVIA LADA DEGAUT PONTES

Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)



RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

Avaliador Externo (PUC)

## AGRADECIMENTOS

Eu me lembro dos dias em que orei por coisas que tenho hoje. E aproveito aqui para demonstrar um pouco da imensa gratidão que sinto por ter conquistado tantas bênçãos. O meu primeiro agradecimento vai para Aquele que me proporcionou tudo isso. Obrigada Deus, pois sempre me dá mais do que realmente mereço.

Para aqueles que são minha base: Mãe, muito obrigada por todo amor incondicional e por acreditar que sou mais do que eu realmente penso que sou. Pai, obrigada por todo amor, pelas risadas e pelo seu apoio, fundamental para que eu seguisse em frente. Jéssica e Rodrigo obrigada por todo carinho, pelo incentivo e por terem me proporcionado a maior felicidade da vida: ser tia.

Para o meu grande amor Jean, minha fortaleza, obrigada por suportar meus defeitos, tolerar meus humores, me ajudar a crescer e me motivar a ser uma pessoa melhor. Nunca acertei tanto como quanto eu disse 'sim'.

Aos amigos que a vida me trouxe: Bárbara, Mariana e Nathan, obrigada pela amizade sincera, a vocês eu devo as melhores aventuras da minha vida.

Aos amigos que o mestrado me trouxe: Fer, Mari A., Mel, Victor, Allan, Alcindo, Mari F., Bia, Breno, Raquel, obrigada por sempre me darem palavras de coragem, por não me deixarem desanimar e por me fazerem ver que desistir não é a solução. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

Aos meu orientadores, agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pela sabedoria e determinação com que me orientaram durante a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES, ao programa de Ciências Farmacêuticas da UFPR e ao CEB, que me proporcionaram toda a estrutura para que eu alcançasse meus objetivos.

E para finalizar, agradeço a cafeína, por me manter acordada, ao álcool por me manter alegre e a minha psiquiatra por me manter lúcida.

## RESUMO

A fruta amora-preta, do gênero *Rubus sp*, pertencente à família Rosacea, é rica em compostos fenólicos e, portanto, uma fonte de antioxidantes naturais. Esta propriedade, tornam a amora-preta uma possível alternativa como substituto de antioxidantes sintéticos utilizados em produtos cosméticos. Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar os principais compostos e avaliar o potencial antioxidante de extratos de frutas de amoreira-preta cultivares Tupy, Guarani e Xavante; selecionar destes extratos o que tem maior atividade antioxidante e produzir nanocápsulas (niossomas), possível vetor, para transportar ingredientes anti-radicais livres para fins cosméticos. As frutas foram coletadas no Centro de Estações Experimentais da Universidade Federal do Paraná, fazenda do Canguiri, situado no município de Quatro Barras, PR. Os extratos foram obtidos com etanol acidificado (0,01% HCl), acetona/água 70/30 e etanol/água 70/30 e avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais - através do reagente Folin Ciocalteu, atividade antioxidante pelo método do DPPH, quanto ao perfil cromatográfico em CLAE-DAD e quanto a toxicidade através do método de Redução do sal tetrazólio (MTT). A identificação dos compostos fenólicos presentes foi realizada por CLUE-QTOF-EM, tanto no modo de ionização positivo quanto negativo. Os compostos foram identificados com base em padrões de referência ou foram deduzidos a partir do perfil de fragmentação e comparação com dados da literatura pela exatidão de massas (<5 ppm). Nenhum extrato mostrou citotoxicidade, mesmo na maior concentração testada (300 µg/mL). O extrato da cultivar Xavante, obtido com acetona, foi o que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos (139,4 µg EAG/mL) e foi possível identificar o maior número de compostos (45 compostos). Este foi também o extrato com o maior potencial antioxidante (EC<sub>50</sub> 33,76 µg/mL) e foi o escolhido para a produção de nanocápsulas. Os niossomas produzidos, contendo o extrato, mostraram-se esféricos, com tamanho médio de 578 nm, dispersos e a eficiência de encapsulação foi de aproximadamente 30%. Assim, a cultivar Xavante, com alta atividade antioxidante e por ser um produto natural, pode ser uma opção viável para um possível produto cosmético com atividade antienvhecimento em forma de nanoestruturas.

**Palavras-chave:** *Rubus sp*. Amora-preta. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Radicais livres. Cromatografia líquida de alta eficiência. Nanotecnologia. Sistemas Vesiculares.

## ABSTRACT

The blackberry fruit of the genus *Rubus sp.*, belongs to the *Rosacea* family, is rich in phenolic compounds and therefore a source of natural antioxidants. This property makes blackberry a possible alternative as a substitute for synthetic antioxidants used in cosmetic products. Thus, this work aims to characterize the main compounds, to evaluate the antioxidant potential of extracts of blackberry fruit cultivars Tupy, Guarani and Xavante and to produce nanocapsules (niosomes) to transport anti-free radical ingredients for cosmetic purposes. The fruits were collected at the Experimental Center Stations of the Federal University of Paraná, Canguiri farm, located in the municipality of Quatro Barras, PR. The extracts were obtained with acidified ethanol (0.01% HCl), acetone/water 70/30 and ethanol/water 70/30. It was evaluated in all the extracts obtained the content of total phenolic compounds - through Folin Ciocalteu reagent, antioxidant activity by the DPPH method, the chromatographic profile by HPLC-DAD and the toxicity through the tetrazolium salt reduction (MTT) method. The identification of the phenolic compounds present was performed by UPLC-QTOF-MS, in positive and negative ionization mode. The compounds were identified based on reference standards and by the fragmentation profile in comparison to the literature data by mass accuracy (<5 ppm). No extract showed cytotoxicity, even at the highest concentration tested (300 µg/mL). The extract of the cultivar Xavante obtained with acetone presented the highest amount of phenolic compounds (139.4 µg EAG/mL) and it was possible to identify the largest number of compounds (45 compounds). This was also the extract with the highest antioxidant potential (EC50 33.76 µG/mL) and was chosen for the production of nanocapsules. The produced niosomes containing the extract were spherical with an average size of 578 nm, and the dispersed and the encapsulation efficiency was approximately 30%. Thus, cultivar Xavante, with high antioxidant activity and being a natural product may be a viable option for a possible cosmetic product with antiaging activity in the form of nanostructures.

Key-words: *Rubus sp.* Blackberry. Antioxidant activity. Phenolic compounds. Free radicals. High performance liquid chromatography. Nanotechnology. Vesicular Systems.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – AMORA-PRETA.....	19
FIGURA 2 – UNIDADE ESTRUTURAL BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	24
FIGURA 3 – NUCLEO FUNDAMENTAL DAS FLAVONAS (R=H) E FLAVONÓIS (R=OH).....	25
FIGURA 4 – CÁTION FLAVÍLIO, NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS ANTOCIANOS E SEUS PRINCIPAIS REPRESENTANTES .....	26
FIGURA 5 – ESTRUTURA FUNDAMENTAL DAS FLAVANONAS (1), DI- HIDROFLAVONÓIDES (2) E DI-HIDROCHALCONAS (3).....	27
FIGURA 6 – CURVA ANALITICA DO ÁCIDO GÁLICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	43
FIGURA 7 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
FIGURA 8 – CROMATOGRAMAS EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO E NEGATIVO DE EXTRATOS CETÔNICOS DE AMORA-PRETA CULTIVARES TUPY, XAVANTE E GUARANI.....	46
FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE AMORA- PRETA TUPY, GUARANI E XAVANTE EM NIH3T3 POR 24 HORAS.....	55
FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE AMORA-PRETA TUPY, GUARANI E XAVANTE EM NIH3T3 POR 48 HORAS. ....	56
FIGURA 11 – ESPECTROS DE IVTF DOS MATERIAIS DE PARTIDA UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE VESÍCULAS E DOS NIOSSOMAS OBTIDOS....	57
FIGURA 12 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓPTICA DOS NIOSSOMAS CONTROLE PRODUZIDOS. ....	58
FIGURA 13 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓPTICA DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA-PRETA PRODUZIDOS. ....	58
FIGURA 14 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA PRODUZIDOS. ....	59
FIGURA 15 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA PRODUZIDOS .....	59

FIGURA 16 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DOS NIOSSOMAS CONTROLE OBTIDOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS). .....	60
FIGURA 17 – POTENCIAL ZETA DOS NIOSSOMAS CONTROLE OBTIDOS POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA.....	60
FIGURA 18 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA OBTIDOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	61
FIGURA 19 – POTENCIAL ZETA DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA OBTIDOS POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA.....	62
FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS DA QUERCETINA NO EXTRATO CETÔNICO DA AMORA-PRETA CULTIVAR XAVANTE (A) E DOS NIOSSOMAS (B). .....	63

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSES DE FLAVONOIDES E ALGUNS REPRESENTANTES .....	24
QUADRO 2 – FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS APÓS DILUIÇÃO EM METANOL PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTES PELO MÉTODO DPPH .....	35
QUADRO 3 –GRADIENTE UTILIZADO PARA ANÁLISE EM CLUE-QTOF-EM.....	37

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE AMORA-PRETA.....	21
TABELA 2 – RENDIMENTO EM EXTRATO SECO DAS CULTIVARES TUPY GUARANI E XAVANTE COM DIFERENTES EXTRATORES.....	41
TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR PELO ENSAIO DO RADICAL DPPH.....	42
TABELA 4 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.....	50
TABELA 5 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Atividade Antioxidante
ANOVA	- Análise de variância
APCI	- Ionização química a pressão atmosférica
ATCC	- American Type Culture Collection
BTH	- Hidroxi-tolueno butilado
CLAE	- Cromatografia Líquida de alta eficiência
CME	- Centro de microscopia eletrônica
C-LABMU	- Complexo de laboratórios multiusuários
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DERAL	- Departamento de economia rural
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EAG	- Equivalente ao ácido gálico
EC <sub>50</sub>	- Concentração Eficiente em 50%
EM	- Espectrometria de massas
ESI	- Ionização por electrospray
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
EUA	- Estados Unidos da América
GPx	- Glutathione peroxidase
GSH	- Glutathione
HCl	- Ácido Clorídrico
IVTF	- Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	- Microscopia de Transmissão
MTT	- (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
<i>m/z</i>	- Razão massa/carga
NC	- Niossomas controle
NE	- Niossomas do extrato
PBS	- Tampão fosfato-salino
Ppm	- Partes por milhão
QTOF	- Quadrupolo tempo de voo
SFB	- Soro Fetal Bovino
SOD	- Superóxido Dismutase
UV	- Ultravioleta
UVA	- Ultravioleta do tipo A
UVB	- Ultravioleta do tipo B
UVC	- Ultravioleta do tipo C

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS .....	14
1.1.1	Objetivo Geral.....	14
1.1.2	Objetivos Específicos .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1	ESPÉCIES REATIVAS E ENVELHECIMENTO .....	15
2.2	USO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INDUSTRIA COSMÉTICA.....	17
2.3	AMORA-PRETA .....	18
2.3.1	Cultivares.....	20
2.3.2	Características da Fruta da Amoreira-Preta .....	21
2.3.3	Compostos fenólicos encontrados na amora-preta .....	22
2.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	28
2.5	CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS .....	30
2.6	MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS COSMÉTICOS .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO .....	34
3.1.1	Coleta dos frutos e processamento .....	34
3.1.2	Preparo dos extratos .....	34
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	35
3.2.1	Determinação da capacidade antioxidante .....	35
3.2.2	Determinação de compostos fenólicos totais .....	36
3.2.3	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-QTOF-EM).....	36
3.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS .....	37
3.3.1	Cultivo da linhagem de fibroblastos .....	37
3.3.2	Ensaio de citotoxicidade .....	38
3.4	PREPARO DOS NIOSSOMAS.....	38
3.4.1	Caracterização dos niossomas.....	39
3.4.2	Identificação e confirmação da presença de compostos fenólicos nos niossomas .....	40

3.4.3	Determinação da eficiência de encapsulação do extrato.....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
4.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	41
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	41
4.2.1	Determinação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais .....	41
4.3	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO TEMPO DE VOO (CLUE-QTOF-EM).....	45
4.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURAS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS .....	55
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS NIOSSOMAS .....	56
4.5.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourie .....	56
4.5.2	Análise por microscopia óptica .....	57
4.5.3	Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta .....	59
4.5.4	Identificação e confirmação da presença de compostos fenólicos nos niossomos .....	62
4.5.5	Eficiência de Encapsulação .....	64
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO I – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CLUE- QTOF-EM EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO 2 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CLUE- QTOF-EM EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO. ....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Semelhante a todos os órgãos, a pele humana sofre alterações fisiológicas com a idade. Existem dois tipos distintos de envelhecimento da pele, intrínsecos e extrínsecos. O envelhecimento intrínseco (envelhecimento cronológico) está relacionado a características genéticas individuais, que ocorre como uma consequência natural das mudanças fisiológicas em função da idade. O envelhecimento extrínseco é aquele relacionado a exposição a fatores como poluição, microrganismos ou radiação UV, que podem induzir respostas biológicas com geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos a pele. Estas duas formas de envelhecimento são sinergicamente responsáveis por diferentes alterações cutâneas, principalmente na face. (KAMMEYER; LUITEN, 2015; LEPHART, 2016).

Existem evidências que o estresse oxidativo exerce efeito como peroxidação lipídica, danos ao DNA e comprometimento mitocondrial, e estes têm um papel importante no envelhecimento. A formação dessas espécies reativas na pele é considerada responsável pela desorganização de proteínas na matriz dérmica, particularmente, colágeno e elastina. (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017).

Nos últimos anos, vários estudos mostraram que o estresse oxidativo e a senescência em fibroblastos humanos podem ser neutralizados e retardados por compostos antioxidantes protetores como, por exemplo, vitaminas e polifenóis dietéticos, que são de fato capazes de evitar o dano oxidativo na pele e prevenir o envelhecimento. Porém, o papel da dieta na proteção da pele é altamente controverso devido à quantidade limitada de dados científicos disponíveis. Por estas razões, o tratamento tópico com estes compostos tem sido proposto como estratégia para fornecer proteção adicional contra o dano oxidativo e retardar o envelhecimento da pele. (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017; DRAELOS, 2013; GIAMPIERI et al., 2014).

Além disso, existe uma grande tendência no consumo de produtos à base de plantas pela percepção do consumidor de que são mais seguros. Com isso existe uma demanda por parte da indústria cosmética de novos ativos de origem natural. O desenvolvimento de produtos antienvhecimento é, portanto, um dos alvos dessas empresas. (KANLAYAVATTANAKUL; LOURITH; CHAIKUL, 2016; MAHOMOODALLY; RAMJUTTUN, 2016).

A amora-preta (*Rubus sp*) é uma das mais ricas fontes naturais de compostos bioativos, como vitamina A e C, e polifenóis (fenóis, flavonoides, ácidos fenólicos,

ligninas e taninos), que possuem capacidades antioxidantes notáveis tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta planta se tornou promissora para estar em uma formulação cosmética, uma vez que apresenta um fator de proteção solar, relacionada a presença de cromóforos, e atividade antioxidante mostradas na literatura e é considerada, entre as frutas, como possuidora de forte atividade antioxidante. (CEFALI et al., 2018; DIVYA et al., 2015).

Considerando o aumento pela busca de produtos cosméticos naturais antienvhecimento e antioxidante, e o potencial que a amora-preta apresenta, este trabalho visa caracterizar os principais compostos e avaliar o potencial antioxidante de extratos de frutas de amoreira-preta das cultivares Tupy, Guarani e Xavante, com vistas a sua utilização como um ativo cosmético tópico.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar e avaliar o potencial antioxidante dos extratos dos frutos de amoreira-preta cultivares Tupy, Guarani e Xavante, selecionar o extrato com maior potencial, produzir e caracterizar niossomas desse extrato para possível uso como ingrediente cosmético.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar e coletar frutos de amoreira-preta no melhor ponto de colheita.
- b) Preparar extratos dos frutos de amoreira-preta e avaliar a atividade antioxidante dos mesmos.
- c) Identificar compostos presentes nos extratos e determinar a quantidade de compostos fenólicos totais.
- d) Avaliar a citotoxicidade do extrato com maior teor de compostos fenólicos, e atividade antioxidante.
- e) Produzir e caracterizar niossomas contendo o extrato de amora-preta com maior potencial antioxidante.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESPÉCIES REATIVAS E ENVELHECIMENTO

A molécula de oxigênio é o principal fornecedor de espécies reativas e sua toxicidade decorre principalmente de seu estado excitado (oxigênio singleto) e de suas formas radicais semi-reduzidas, que podem causar processos oxidativos nocivos ou letais às células. Várias pesquisas tem confirmado a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em processos fisiológicos mas também, em condições patológicas, envelhecimento e senescência de células. (GILLE; SIGLER, 1995; ROMERO et al., 1998).

As EROs compreendem uma variedade de espécies químicas diferentes, incluindo ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Essas espécies podem ser geradas de fontes exógenas ou endógenas sendo consequência natural do metabolismo aeróbio. As principais fontes endógenas são as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e cloroplastos. As principais fontes exógenas são xenobióticos, metais pesados, luz ultravioleta (UV) e radiação ionizante. (NEMOTO et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2000).

Independentemente de como ou onde são gerados, um aumento nos níveis de oxidantes tem dois efeitos potencialmente importantes: danos a vários componentes celulares e ativação de vias de sinalização específicas. Ambos os efeitos podem influenciar numerosos processos celulares ligados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas à idade como doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias, câncer e diabetes. (NEMOTO et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2000).

Esse desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes é chamado de estresse oxidativo. Seu significado segundo a definição de Sies (1991), é “uma perturbação do equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor de pró-oxidantes, que pode causar potenciais danos”, ou seja, quando a formação de pró-oxidantes não é equilibrado pelo seu desaparecimento através dos sistemas protetores da célula, pode ocorrer estresse oxidativo de curto ou longo prazo que se reflete no aparecimento de danos celulares que podem alcançar o DNA, proteínas, sacarídeos e lipídeos. (GILLE; SIGLER, 1995).

Os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos de proteção para prevenir a formação de EROs ou desintoxicá-lo. Esses mecanismos envolvem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). Ainda existem grupo de antioxidantes não enzimáticos, como a glutaciona (GSH), o ácido úrico, os carotenoides, ubiquinol-10, cisteína e as vitaminas C e E. (GILLE; SIGLER, 1995).

A eficiência desses mecanismos de proteção tende a decrescer com a idade, ou seja, o declínio das defesas antioxidantes somado à geração de espécies reativas, devem ser considerados como contribuidores importantes para o processo de envelhecimento. (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

O envelhecimento é caracterizado pela degeneração lenta e irreversível do organismo, alterando seu funcionamento. Os sinais mais óbvios do envelhecimento são primeiramente manifestados na pele, já que ela é o órgão mais exposto ao ambiente externo e o mais vulnerável com a idade, com a perda de muitas funções de proteção natural. As EROs podem acelerar o envelhecimento cutâneo por danos ao DNA e por atuarem na desidrogenação, hidroxilação e na glicação proteica resultando na perda das funções biológicas de proteínas como o colágeno e proteoglicanos, causando o aumento da flacidez da pele e o aparecimento de rugas. (FINKEL; HOLBROOK, 2000; LILIAN et al., 2004).

Entre os danos ambientais, o fotoenvelhecimento é o maior produtor de espécies reativas na pele, que geram um severo estresse oxidativo nas células cutâneas. (KAMMEYER; LUITEN, 2015; LILIAN et al., 2004). UVB é o componente mais perigoso da luz solar. Devido à sua alta energia, o UVB é capaz de atravessar a epiderme e atingir a derme superior onde pode interagir com os cromóforos celulares. A exposição crônica da pele à radiação tem um papel importante no desenvolvimento de câncer, imunossupressão cutânea e envelhecimento prematuro. (CAVINATO et al., 2017; TRAUTINGER, 2001).

Esses eventos ativam inúmeras vias de sinalização que levam à diminuição da produção de colágeno, o aumento da síntese e atividade de metaloproteases de matriz (MMPs) responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo, acúmulo de células senescentes, e degradação de fibras elásticas. Macroscopicamente, esses eventos resultam no aparecimento de rugas, aumento da espessura da epiderme com consequente aumento da desidratação devido ao aumento do número de camadas

celulares; hiperpigmentação, flacidez e perda do tônus, que são as principais características da pele fotoenvelhecida. (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017).

Na prevenção do envelhecimento cutâneo precoce, além das medidas físicas e químicas na proteção contra a luz UV, como a fornecida pelos filtros solares, e as defesas antioxidantes naturais da pele o uso de substâncias antioxidantes exógenas também é um importante reforço nesta prevenção do envelhecimento cutâneo precoce. No caso da pele, a via clássica de administração de antioxidantes é a aplicação tópica de compostos como vitaminas e, principalmente, extratos vegetais que possuem alta concentração de compostos fenólicos. (DE SOUZA et al., 2014; HIDALGO; ALMAJANO, 2017; SIES, 2010).

## 2.2 USO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA

Entre as matérias-primas e ingredientes ativos utilizados em formulações cosméticas, tem aumentado a procura por extratos vegetais. Isso acontece pelo fato destes extratos apresentarem melhor perfil de atividade e menores efeitos colaterais, quando comparados as matérias-primas sintéticas. Produtos cosméticos com ingredientes naturais tem o apelo de produtos mais seguros e saudáveis. O mercado de produtos cosméticos com apelo antienvhecimento e fotoprotetor, com base em compostos naturais, vem crescendo continuamente, como cresce também a necessidade de pesquisa neste campo. (CAVINATO et al., 2017; SIES, 2010).

Um exemplo de composto fenólico utilizado como ativo antienvhecimento, temos o resveratrol. Este polifenol pode ser encontrado em uvas e em uma variedade de frutas vermelhas. Alguns estudos *in vitro* indicam que ele protege os fibroblastos humanos normais dos efeitos prejudiciais do peróxido de hidrogênio, sendo o seu efeito dose-dependente, possivelmente pela ligação de receptores específicos na epiderme. (BUONOCORE et al., 2012; DUMONT et al., 2010).

Outro exemplo de composto fenólico encontrado em extratos vegetais é a quercetina, quem também tem sido utilizada visando a redução do fotoenvhecimento, isto devido a sua atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória. A quercetina, como inibidor da peroxidação lipídica, pode também proteger a pele da desidratação, o que é importante tendo em vista que o grau de hidratação está relacionado com a elasticidade da pele que depende da biossíntese e configuração de lipídeos. Em um estudo *in vivo*, Joshan e Singh, testaram a atividade

protetora da quercetina contra o fotoenvelhecimento em camundongos albinos. A aplicação tópica de quercetina aumentou a umidade da pele e foi capaz de neutralizar os radicais livres e proteger antioxidantes celulares, como por exemplo, impedir a depleção da glutatona. A quercetina também reduziu o número e a profundidade de rugas do grupo exposto ao UV. (HATAHET et al., 2016; JOSHAN; SINGH, 2013).

Entre os pigmentos fenólicos responsáveis pela cor azul de muitas plantas, temos as antocianidinas, e como exemplo a delphinidina. Estudos tem demonstrado que antocianidinas possuem um efeito inibidor potente contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, contra danos na pele induzidos por raios UVB. Sobiepanek e colaboradores (2016), investigaram essas propriedades em queratinócitos quando estes foram expostos a UVB. Demonstrou-se que a delphinidina foi capaz de anular o efeito deletério da irradiação e restaurar a atividade metabólica dos queratinócitos o que indica que o tratamento com delphinidina possui efeitos regenerativos, devido a sua atividade antioxidante e capacidade de inibir a ativação de metaloproteinases. (SOBIEPANEK; BOBECKA-WESO; KOBIELA, 2016).

Por estas razões, nos últimos anos, o tratamento tópico com esses compostos tem sido proposto como uma ferramenta estratégica para fornecer proteção adicional contra o dano oxidativo e retardar o envelhecimento da pele. (CAVINATO et al., 2017).

Os compostos bioativos, sobretudo os compostos fenólicos, ocorrem naturalmente e estão presentes como parte dos pigmentos que dão as cores aos vegetais principalmente ao grupo das pequenas frutas, designado assim em função do seu reduzido tamanho. Entre as principais pequenas frutas podemos citar o morango, a framboesa, o phisális, o mirtilo e a amora-preta, sendo este último, objeto do presente estudo.

### 2.3 AMORA-PRETA

Pertencente à família Rosaceae, gênero *Rubus* e subgênero *Eubatus*, constituindo um grupo variado e complexo de plantas, a amoreira-preta é uma planta arbustiva, correspondendo a mais de trezentas espécies. Podendo apresentar porte ereto ou rasteiro, com ou sem espinhos, com frutos de cor negra e sabor ácido a doce-ácido. São plantas que produzem em ramos de ano, que são eliminados após a colheita. Enquanto alguns ramos estão produzindo, outras hastes emergem e crescem, renovando o material para a próxima produção. O fruto verdadeiro é uma

mini-drupa ou drupete, onde se encontra uma pequena semente cuja sua junção forma o fruto agregado. (ANTUNES, 2002; POLING, 1997).

FIGURA 1 – AMORA-PRETA



FONTE: LANZETTA, Paulo

O cultivo comercial de amora-preta (*Rubus* sp) teve início com a cultivar Evergreen na Europa, no século XVII. Porém, desde o século IV a.C., os gregos já a utilizavam devido a suas características medicinais e ao seu sabor. Outras cultivares foram lançadas a partir do século XIX, nos Estados Unidos, provenientes de cultivares européias e, em 1867, já havia 18 cultivares registradas e selecionadas de plantas nativas. (ANTUNES, 2002; ANTUNES et al., 2014; RASEIRA; FRANZON, 2012).

No Brasil, seu cultivo destaca-se nas regiões do Sul do país, devido às ótimas condições climáticas para este tipo de fruta, se expandiu para São Paulo e o Sul de Minas Gerais. Nenhuma espécie nativa brasileira foi domesticada, sendo as cultivares utilizadas aqui resultados de introduções, hibridações e seleções de cultivares americanas, oriundas da Universidade de Arkansas, em 1972, pelo programa de melhoramento genético da EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas – RS). Este programa visa desenvolver frutas com melhor produtividade; qualidade, em termos de tamanho, cor, brilho, firmeza e sabor; época de maturação, permitindo o escalonamento da produção; hastes sem espinhos, facilitando a colheita e a poda; entre outros. (ANTUNES; RASSEIRA, 2004).

Por ser um pomar que possui baixo custo de implantação e manutenção, o cultivo da amora é uma boa opção para a agricultura familiar. A reduzida necessidade de utilização de agrotóxicos, podendo o cultivo ser orgânico, e o retorno rápido de produção, dá aos pequenos agricultores uma opção de renda, destinando o seu

produto ao mercado in natura e a indústria. A produtividade pode alcançar até 10.000 kg/ha/ano sob condições adequadas. (ANTUNES, 2002). A seguir serão descritas algumas características das cultivares Tupy, Guarani e Xavante, utilizadas neste estudo.

### 2.3.1 Cultivares

As primeiras cultivares brasileiras lançadas pelo programa de melhoramento genético no Brasil, pela EMBRAPA Clima Temperado, foram a Ébano, em 1981; Negrita, em 1983; Tupy e Guarani, em 1988; Caingangue, em 1992; Xavante, em 2004 e, por último, a cultivar Xingu, em 2015. (ANTUNES et al., 2014; EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2015).

A cultivar Tupy, resultado do cruzamento entre as cultivares ‘Uruguai’ x ‘Comanche’ realizado pela EMBRAPA clima Temperado em 1982, possui como características o porte ereto, hastes com espinhos e colheita na terceira dezena de novembro. São frutos de tamanho grande (7 a 9 g), coloração preta e uniforme, sabor equilibrado em acidez e açúcar, consistência firme e, por sua baixa acidez, é uma fruta recomendada para o mercado de consumo *in natura*, que tem preferência por esse tipo de fruta. Atualmente, é a cultivar mais plantada no Brasil e no mundo. (ANTUNES, L. et al., 2014; PEREIRA, I.; PICOLOTTO L.; CORRÊA, A.; RASEIRA, M.; ANTUNES, L., 2014; VOLK, G. et al., 2013).

Selecionada de um cruzamento proveniente de sementes introduzidas da Universidade de Arkansas, EUA, entre as variedades (‘Lawton’) x (‘Darrow’ x ‘Brazos’) x (‘Shaffer Tree’ x ‘Brazos’), a cultivar Guarani, assim como a Tupy, é uma planta que possui espinhos em suas hastes, porte ereto e coloração preta. Sua colheita se dá durante o mês de dezembro e seus frutos possuem tamanho médio (5 a 6 g). Possui um sabor ácido e a recomendação é para o consumo *in natura* e para a indústria. (ANTUNES et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; VIZZOTTO et al., 2012).

Por último, a cultivar Xavante é resultante de sementes coletadas em Clarksville, AR e de lançamento conjunto entre a EMBRAPA Clima Temperado e a Universidade de Arkansas. Possui hastes vigorosas, eretas e sem espinhos. A colheita inicia-se em meados de novembro e suas frutas possuem uma forma alongada, sabor doce-ácido e peso médio em torno de 6 g. (BOTELHO et al., 2009; HUSSAIN et al., 2016; PEREIRA et al., 2014).

### 2.3.2 Características da Fruta da Amoreira-Preta

A amora-preta *in natura*, contém cerca de 10% de carboidratos e grande quantidade de vitaminas (A, B e C), lipídeos e minerais (cálcio, sódio, ferro e fósforo), sendo de baixo valor calórico (52 calorias em 100 g de fruta). (POLING, 1997). O teor de água varia entre 83 a 91%, sendo que os açúcares constituem a maior parte dos compostos solúveis. O perfil nutricional da amora-preta pode ser visto na Tabela 1.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE AMORA-PRETA

Nutrientes em 100 g de amora-preta	
Valor Energético	50-55 kcal
Água	85-90 g
Proteínas	1,3 – 1,5 g
Lipídeos	0,49 g
Carboidratos	6 - 13 g
Fibras	3,5 -5,5 g
Cinzas	0,19 – 0,47 g
Açúcares totais	4,88 g
Cálcio	29 – 32 mg
Ferro	0,62 mg
Magnésio	10 mg
Fósforo	22 mg
Potássio	162 mg
Sódio	1 mg
Zinco	0,53 mg
Vitamina C	21 mg
Vitamina A	214 UI
Vitamina K	19 µg
Vitaminas B6	0,03 mg
Tiamina	0,02 mg
Riboflavina	0,026 mg
Niacina	0,646 mg

FONTE: U.S. Department of agriculture nutrient database (2019)

O potencial antioxidante da amora-preta difere entre as cultivares e se correlacionam positivamente com o conteúdo total de compostos fenólicos. (JIAO; WANG, 2000; SARIBURUN et al., 2010; SIRIWOHARN et al., 2004).

Ainda, fatores genéticos e ambientais, como maturidade, exposição à luz UV e método de colheita, desempenham um papel importante na composição da fruta. (JIAO; WANG, 2000; WANG; LIN, 2000). Existem três diferentes estágios de maturação: “mosqueado”, quando apresentam 50% da superfície preta; “preto-brilhante”, quando apresentam 100% da superfície preta e brilho; “preto-opaco”, devido ao avançado estágio de maturação. Sabe-se que os níveis de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante das amoras são influenciados pela maturidade, por isso é importante que a colheita dos frutos seja feita levando-se em consideração que as frutas possuam o mesmo estágio de maturação. (ANTUNES et al., 2014; SIRIWOHARN et al., 2004).

### 2.3.3 Compostos fenólicos encontrados na amora-preta

A amora-preta é uma rica fonte de compostos funcionais oriundos do metabolismo secundário da planta, principalmente compostos de natureza fenólica, denominados polifenóis, como flavonoides, taninos e ácidos fenólicos. Devido a esses constituintes químicos, esta fruta pode apresentar propriedades funcionais fisiológicas. (ANTUNES, 2002; DEL RIO et al., 2013; HASSIMOTTO; PINTO; LAJOLO, 2008; POLING, 1997).

O consumo de amora-preta já mostrou aumentar a capacidade antioxidante do plasma e da urina. (HASSIMOTTO; PINTO; LAJOLO, 2008). Também apresentou efeito anticarcinogênico *in vitro* em diversas linhagens de células como, por exemplo, inibir a proliferação celular da linhagem A549 de câncer de pulmão. (FENG et al., 2016; SEERAM et al., 2006). Sua ingestão diária contínua pode atenuar processos cerebrais degenerativos. (FIGUEIRA et al., 2017; TAVARES et al., 2012).

Antocianinas presentes em extratos de amora-preta, como a cianidina-3-glicosídeo, já mostraram inibir a ativação e expressão de diversas enzimas e fatores envolvidos no processo de formação de câncer de pele pela ação de raios UVB e UVC, além de suprimir significativamente a mutagênese induzida por esses raios. (DING et al., 2006; MAGALHÃES; MACIEL; ORSOLIN, 2017; TATE et al., 2006). Além disso, apresentou efeitos anti-inflamatórios como a capacidade de inibir a enzima hialuronidase, podendo ser comparada a drogas como a aspirina e o ibuprofeno. (MARQUINA et al., 2002; SEERAM et al., 2001).

Em outros estudos, a amora-preta foi comparada a outras frutas da mesma família botânica, como a cereja, a framboesa, o morango e o mirtilo, e mostrou ter maior atividade antioxidante, maior conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais e carotenoides. (DE SOUZA et al., 2014).

Os compostos fenólicos são encontrados em todas as plantas e são substâncias que possuem um ou mais núcleos aromáticos, contendo pelo menos um substituinte hidroxilado e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros), sendo encontrados na forma livre (agliconas) ou ligados a açúcares (glicosídeos), proteínas, isoprenóides, entre outros. (SIMÕES et al., 2017).

Os polifenóis são conhecidos por possuírem capacidade antioxidante atribuída principalmente ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos pelo desemparelhamento de elétrons, gerando o radical correspondente estabilizado por ressonância. Essa capacidade é influenciada pelo número e posição das hidroxilas, assim como pelas posições da glicosilação. (RATZ-LYKO et al., 2015). Outra característica dos polifenóis é a capacidade em complexar íons metálicos como ferro, cobre, zinco e manganês. Essa habilidade é benéfica por limitar a atividade de enzimas envolvidas na remodelagem do tecido conectivo e inibir o processo inflamatório. (AN et al., 2005; ARCT; PYTKOWSKA, 2008; THRING; HILI; NAUGHTON, 2009).

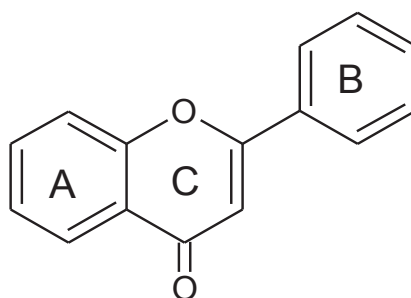
Esses compostos são originados do metabolismo secundário das plantas e envolvem duas rotas metabólicas: a via do ácido chiquímico, que é a responsável pela formação da maioria destes compostos, e a via do acetato-malonato. Algumas estruturas são exclusivas da via do ácido chiquímico, como as encontradas nos ácidos fenólicos e nos fenilpropanóides. Porém, outras classes de fenólicos como os flavonoides, são provenientes de biossíntese mista, na qual parte da estrutura vem da via do ácido chiquímico e outra parte vem da via do acetato-malonato. Sendo assim, pode-se classificar estes compostos como sendo flavonoides e não flavonoides. (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

#### 2.3.3.1 Flavonoides

Os flavonoides são compostos que compreendem, em geral, pigmentos que, além de proteger a planta dos raios ultravioletas, conferem atração de agentes polinizadores e dispersores. São compostos bastante distribuídos entre os vegetais e

pode-se encontrar em diversas formas estruturais. A grande maioria possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas, anel A e B, por uma cadeia de três carbonos entre elas que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 2). Variações do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides que estão comumente oxigenados e grande parte conjugada a açúcares, formando compostos hidrossolúveis. (ANGELO; JORGE, 2007; SIMÕES et al., 2017).

FIGURA 2 – UNIDADE ESTRUTURAL BÁSICA DOS FLAVONOIDES



FONTE: O autor, 2019

As classes ou subfamílias mais importantes são as antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e, com menor frequência, as auronas, chalconas, xantonas, antraquinonas, fenóis simples e naftaquinonas. (SIMÕES et al., 2017). No quadro a seguir alguns exemplos de classes de flavonoides mais frequentes e alguns de seus representantes:

QUADRO 1 – CLASSES DE FLAVONOIDES E ALGUNS REPRESENTANTES

<b>Classes</b>	<b>Representantes</b>
Flavonas	Luteolina, Apigenina, Tricina,
Flavonóis	Quercetina, Miricetina, Rutina, Kaempferol
Antocianos	Cianidina, Delfinidina, Malvidina
Di-hidroflavonoides	Naringenina, Hesperidina, Taxifolina
Isoflavonoides	Genistéina, Genistina, Vestitona,

FONTE: O autor, 2019

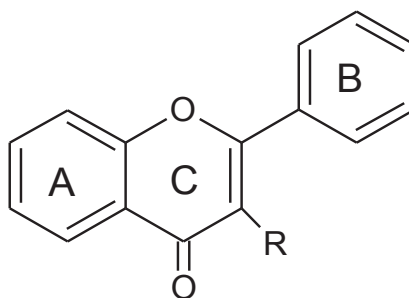
Os flavonoides são capazes de reduzir radicais livres como o superóxido e os radicais peroxil, alcoxil e hidroxil, por meio da doação de elétrons a estes radicais. A atividade antioxidante de um flavonoide depende da sua estrutura e de seus

substituintes nos anéis B e C, sendo que os maiores determinantes são a presença de um grupo catecol no anel B, que aumenta a propriedade doadora de elétrons e a presença de uma ligação dupla nas posições 2 e 3 do anel C, conjugada com o grupo 4-oxo, responsável pelo deslocamento de elétrons do anel B. Além disso, os flavonoides podem estabilizar os radicais livres envolvidos nos processos oxidativos, complexando-se com eles. Estes e outros fatores explicam as diferenças entre a atividade antioxidante das diferentes classes de flavonoides. (PIETTA, 2000).

### 2.3.3.2 Flavonas e Flavonóis

Os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila, por isso essas duas classes são, em geral, classificadas juntas (Figura 3). As flavonas e flavonóis são encontrados normalmente oxigenados e a maioria que é encontrada em plantas, está conjugada com um ou mais açúcares. As flavonas mais abundantes encontradas em plantas são a apigenina e a luteolina, livre ou conjugadas. Os flavonóis mais encontrados em vegetais são galangina, canferol, quercetina e miricetina. (SIMÕES et al., 2017).

FIGURA 3 – NUCLEO FUNDAMENTAL DAS FLAVONAS (R=H) E FLAVONÓIS (R=OH)



FONTE: O autor, (2019)

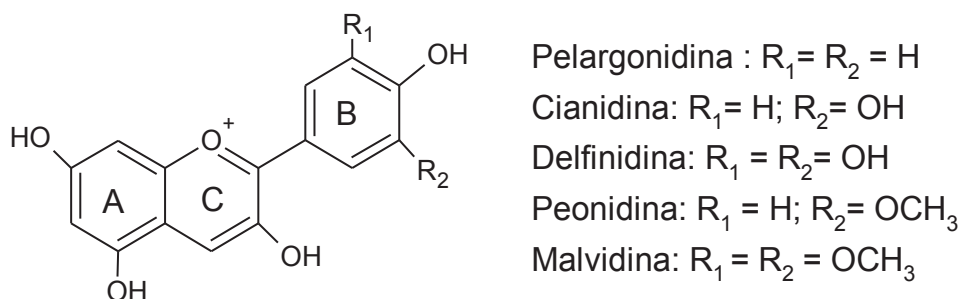
### 2.3.3.3 Antocianos

Antocianos é um importante grupo de pigmentos, presentes nas plantas, que são solúveis em água. São responsáveis pelas cores laranja, rosa, escarlate, vermelha, violeta e azul em pétalas de flores, frutas e folhas. Possuem importantes funções como atraentes de insetos e pássaros, além de possuir uma ação inibidora do crescimento de larvas de alguns insetos e de proteção dos tecidos da planta de diversos processos oxidativos. Muito usados como aditivos eficazes e seguros na

indústria alimentícia, também possuem importância farmacológica devido a suas atividades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas. (SEERAM; NAIR, 2002; SIMÕES et al., 2017).

Os antocianos ocorrem na natureza conjugados à açúcares que estabilizam a molécula e podem ser aciladas com ácidos orgânicos ou alifáticos como o ácido cafeico, ferúlico, p-hidrozibenzóico, coumarico, oxálico, entre outros (Figura 4). São capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres. A quantidade de antocianinas na amora-preta varia de acordo com o estágio de maturação das frutas e também de cultivar para cultivar. Dentre as antocianinas encontradas em amora-preta, destacam-se a cianidina-3-o-glucosídeo, cianidina-3-o-arabinosídeo, cianidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo, perlagonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. A cianidina-3-o-glicosídeo, em termos quantitativos, representa cerca de 80% do total de antocianinas. (CHAVES et al., 2018; JACQUES; ZAMBIASI, 2011; SEERAM et al., 2006; SERRAINO et al., 2003).

FIGURA 4 – CÁTION FLAVÍLIO, NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS ANTOCIANOS E SEUS PRINCIPAIS REPRESENTANTES



FONTE: O autor, (2019)

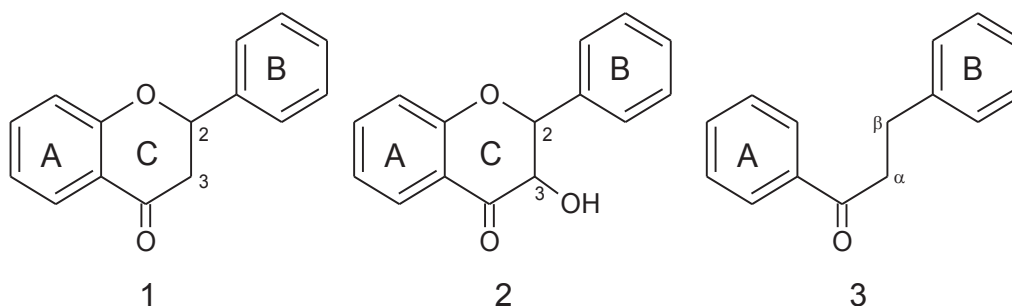
As hidroxilas presentes nas posições 3, 5 e 7 podem estar ligadas a açúcares, sendo os mais comuns: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose, que ocorrem como mono, di e/ou trissacarídeos. Esses açúcares conferem maior solubilidade e estabilidade às moléculas.

As antocianinas, assim como outros fenólicos, podem atuar como antioxidantes doando hidrogênio a radicais altamente reativos, evitando assim a formação de radicais adicionais. (Iversen, 1999). Seu potencial antioxidante depende do número e arranjo dos grupos hidroxila e da extensão da conjugação estrutural, bem como da presença de substituintes doadores de elétrons e de retirada de elétrons na estrutura do anel. (Miller & Rice-Evans, 2000).

### 2.3.3.4 Di-hidroflavonoides

Os representantes desta classe são as flavanonas, os di-hidroflavonóis e as di-hidrochalconas. Ao contrário das outras classes de flavonoides, eles possuem uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 (ou  $\alpha$  e  $\beta$  para as di-hidrochalconas) em seu núcleo fundamental, diferentemente das outras classes de flavonoides (Figura 5). Como consequência, esses flavonoides possuem centros de assimetria em suas moléculas. As flavanonas são intermediários em rotas biosintéticas da maioria dos flavonoides e possuem dois centros de assimetria possíveis sendo que, as de origem natural são frequentemente levorrotatórias. Os di-hidroflavonóis também possuem dois centros de assimetria, porém as di-hidrochalconas não possuem centro de assimetria, suas variações consistem em substituintes como açúcares, hidroxilas, etc. (SIMÕES et al., 2017).

FIGURA 5 – ESTRUTURA FUNDAMENTAL DAS FLAVANONAS (1), DI-HIDROFLAVONÓIDES (2) E DI-HIDROCHALCONAS (3).



FONTE: O autor, (2019)

### 2.3.3.5 Compostos Fenólicos não-flavonoides

Alguns compostos fenólicos não são classificados como flavonoides e não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais. São aqueles presentes na forma de polímeros, na qual estão incluídos os taninos e as ligninas. Os taninos classificam-se como taninos hidrolisáveis e taninos condensados e possuem elevado peso molecular. (SIMÕES et al., 2017).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e ácido elágico ligados a açúcares, sendo os elagitaninos encontrados com maior frequência. Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol e constituem a principal fração fenólica responsável pelas características de

adstringência dos vegetais. As subclasses mais comuns destes taninos são as procianidinas, prodelfinidinas e propelargonidinas. (ANGELO; JORGE, 2007).

Outros compostos fenólicos que não são flavonoides são os ácidos fenólicos, que são biosintetizados a partir da via do chiquimato e possuem em sua estrutura química o anel aromático e o grupo hidroxilo, comuns aos compostos fenólicos, e um grupamento carboxila. Como exemplo desta classe temos o ácido p-cumarico, ácido cafeico e o ácido ferúlico, que possuem interesse terapêutico. (LORDÊLO et al., 2010; SIMÕES et al., 2017). Os compostos não flavonoides já encontrados em amora-preta são o ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido cafeico, cumárico, ferúlico, e ácido elágico. (SELLAPPAN; AKOH; KREWER, 2002).

## 2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Vários processos de extração são utilizados para o isolamento de compostos ativos presentes em plantas. Os métodos de extração sólido-líquido mais utilizados incluem maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua a quente (Soxhlet), extração assistida por micro-ondas, ultrassom, extração com líquido pressurizado e turbólise. Normalmente são realizados empregando-se solventes orgânicos, tais como metanol, etanol, acetona e água em diferentes combinações e proporções. A escolha do solvente influencia no nível de compostos extraídos já que a solubilidade dos polifenóis varia conforme a polaridade do solvente utilizado. (ANGELO; JORGE, 2007; DAI et al., 2009).

Algumas metodologias consideram importante a utilização da maceração, onde a amostra fica em contato com o solvente extrator por um período de tempo (dias ou horas). É um processo não seletivo que resulta num equilíbrio de concentração entre o solvente e a matéria-prima, sendo influenciado por fatores que dependem da matéria-prima (sua natureza, tamanho, umidade e quantidade) e do solvente (polaridade e quantidade) (Farmacopeia Brasileira, 1995). As desvantagens da utilização desse método estão relacionadas a lentidão, a impossibilidade de extrair completamente os compostos bioativos quando estes são poucos solúveis, ao elevado índice de intumescimento e possíveis contaminações microbianas quando utilizado com água. (ÖZCAN; ÖZCAN, 2004).

A cavitação ultrassônica permite maior eficiência de extração devido à forte ruptura da parede celular causada pelas forças de cisalhamento, facilitando assim a

penetração dos solventes nas células vegetais. Com isso, a técnica permite menor consumo de reagentes, tempo de extração reduzido e ainda, uma menor temperatura com alta taxa de extração de compostos ativos. (CHEMAT; KHAN, 2011; VILKHU et al., 2008).

Em estudos anteriores com amora-preta, não foi observado diferença estatística na utilização de maceração entre amostras que variaram o período tempo (zero a 24 horas), tanto para análise do teor de compostos fenólicos totais, quanto para a atividade antioxidante. Isso mostra que não existe a necessidade de um período de maceração, o que torna o método mais rápido. (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011).

Muitos trabalhos têm utilizado extratores alcoólicos acidificados para favorecer a extração, já que a acidez favorece a penetração do solvente em tecidos de frutas e vegetais, além de aumentar a estabilidade dos extratos obtidos por dificultar o aparecimento de microrganismos que podem alterar a composição. O uso deve ser cauteloso, pois o excesso de acidez pode favorecer a hidrólise, gerando resultados superestimados de antocianinas totais presentes no extrato. O uso de acetona também é muito empregado em diversos trabalhos por ser um solvente de fácil secagem em temperaturas amenas. (DAI et al., 2009; SHI et al., 2007; TSAO; DENG, 2004).

Vizzotto e Pereira (2011), avaliaram a utilização de vários solventes para extração de compostos fenólicos de amora-preta. A acetona se mostrou ser o solvente com melhor desempenho, seguido de metanol e etanol que não mostraram diferença entre si. A utilização de água junto com estes solventes orgânicos contribuiu para criar um ambiente mais polar, favorecendo a extração de polifenóis. Porém o uso de água pura ou de solventes apolares como o hexano, não mostraram serem eficientes.

Vizzotto também testou a acidificação dos solventes água, metanol e etanol de 0,005% a 0,15% de HCl. Para a água e o metanol não houve nenhuma diferença estatística no teor de compostos fenólicos e de atividade antioxidante. Já para o etanol houve um aumento significativo quando se utilizou o etanol a 0,01% de HCl, ou seja, teve sua capacidade extratora melhorada.

Foi relatado que temperaturas elevadas melhoram a eficiência da extração, devido à maior solubilidade e taxa de difusão de compostos no solvente. No entanto, altas temperaturas aceleram a degradação de compostos fenólicos no processo de extração. Algumas tecnologias de extração, como extração líquida pressurizada foram

desenvolvidas para permitir a extração rápida de antocianinas e outros fenólicos em temperaturas elevadas (> 50 °C) e foram bem-sucedidos em retardar a degradação destes compostos durante o processamento. Verificou-se também, que a extração com solventes assistida por ultrassom foi mais eficiente em extrair antocianinas do que a extração convencional de solventes, devido à forte ruptura do tecido da fruta sob cavitação acústica ultrassônica. (DAI et al., 2009).

## 2.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS

Extratos brutos vegetais são misturas complexas que contêm centenas ou milhares de metabólitos diferentes. A natureza química destes constituintes difere consideravelmente dentro de um dado extrato. Nos últimos anos, métodos cromatográficos e espectrométricos têm sido usados no estudo da composição química de uma grande variedade de compostos de fontes naturais. Embora existam diferentes tipos de detectores, nenhum permite a detecção de todos os metabólitos secundários encontrados em um extrato vegetal em uma única análise, visto que cada método tem sua própria especificidade. Como todo composto natural possui um determinado peso molecular, a detecção de todos estes compostos usando espectrometria de massa (EM) pode ser idealmente considerada como uma técnica de detecção universal. Com o avanço das tecnologias, a instrumentação analítica possibilitou o acoplamento de métodos de separação e detecção. (FREITAS et al., 2016; WOLFENDER; RODRIGUEZ; HOSTETTMANN, 1998).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM), por exemplo, é uma técnica utilizada tanto na separação quanto na quantificação de compostos fenólicos. É mais eficiente e possui maior sensibilidade e seletividade do que as técnicas convencionais, como CLAE-UV/DAD (Cromatografia líquida acoplada a detector ultravioleta/arranjo de diodos). (MULLEN et al., 2010).

A CLAE-EM permitiu a detecção de constituintes pequenos que não eram possíveis por métodos clássicos e é usado com sucesso para caracterizar vários componentes de plantas sem o exaustivo trabalho de isolamento dos componentes do extrato bruto. Para minimizar problemas encontrados no acoplamento de CLAE com espectrometria de massas, foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais,

muitas vezes, envolvem a ionização do analito. O surgimento de fontes de ionização tornou a técnica aplicável a uma ampla diversidade de matrizes sendo os íons mais fáceis de manipular do que as substâncias em fase neutra. (FREITAS et al., 2016; MULLEN et al., 2010).

Entre as fontes de ionização existentes podemos citar a ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI). ESI é uma fonte de ionização que gera gotículas carregadas a partir das quais íons são ejetados por um processo de evaporação do solvente. Um campo elétrico é gerado em um pulverizador pela aplicação de alta tensão. Já a fonte APCI, o eluente passa por um nebulizador pneumático onde as gotas são dessolvatadas e o *spray* formado passa por uma região aquecida e é pulverizado, formando espécies neutras que passam através de uma descarga corona onde existe um campo de ionização. Essa técnica é adequada para compostos não polares e, assim como o ESI, pode ser operado em modo negativo e positivo. (FREITAS et al., 2016; MULLEN et al., 2010; VÉKEY, 2001).

O uso de CLAE-EM acoplado a um analisador quadrupolo tempo-de-voe (Q-TOF) tem o intuito de unir a alta resolução com a alta precisão e versatilidade para quantificação, além de fornecer uma análise de fragmentação com medição de massa exata para a caracterização estrutural e identificação dos compostos. (FREITAS et al., 2016; MULLEN et al., 2010).

Somado a isso, os valores de massa medidos com exatidão são usados para produzir fórmulas empíricas que, com uma exatidão de massa inferior a 5 ppm, reduzem significativamente o número de possíveis estruturas para possíveis compostos. Consequentemente, a CLAE-EM provou ser uma poderosa técnica para caracterizar uma ampla variedade de compostos em amostras complexas. (FREITAS et al., 2016; MULLEN et al., 2010).

## 2.6 MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS COSMÉTICOS

A adequada permeação cutânea de compostos ativos para a obtenção de uma resposta é um grande desafio no desenvolvimento de novos cosméticos. O estrato córneo possui uma estrutura lipídica altamente ordenada e age como principal barreira protetora, tanto para evitar a perda excessiva de água quanto para proteger contra agentes externos danosos. Por isso, inúmeros compostos ativos quando veiculados em formas cosméticas convencionais possuem grande dificuldade de

permear até as mais profundas camadas da pele, o que justifica o emprego de estratégias que aumentem sua permeação cutânea. (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007). Além disso, esses compostos podem ter sua atividade comprometida em razão da sua instabilidade físico-química.

Para superar todas estas limitações, o advento de novos ingredientes ativos e as expectativas dos consumidores têm impulsionado o uso de formulações de veículos mais complexas. Neste contexto, a nanotecnologia pode ser utilizada para estabilização desses compostos, conferindo melhor funcionalidade e disponibilidade de substâncias ativas uma vez que pode aumentar a atividade e melhorar a liberação dos ativos. (HOUGEIR; KIRCIK, 2012).

Os sistemas nanoestruturados são caracterizados por possuírem alta superfície de contato e um grande número de partículas por unidade de peso. Dentre os mais utilizados em cosméticos temos as nanocápsulas, as nanoesferas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as nanoemulsões, as microemulsões, os lipossomas e os niossomas. (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MIHRANYAN; FERRAZ; STRØMME, 2012).

Os sistemas vesiculares, dentre os quais se destacam os lipossomas e os niossomas, são muito utilizados para estabilizar e liberar ativos profundamente no tecido. Os lipossomas, muito conhecidos e frequentemente usados em cosméticos. Formados por uma bicamada lipídica em torno de uma solução aquosa, possibilitando a entrega de ambos os ativos hidrofílicos e lipofílicos ao seu alvo através do estrato córneo. Isso leva a uma melhor absorção, menores exigências de concentração e melhor estabilidade dos ativos. (HOUGEIR; KIRCIK, 2012; MIHRANYAN; FERRAZ; STRØMME, 2012; WU; GUY, 2009).

Outro exemplo de sistemas vesiculares são os niossomas, que são formados por uma bicamada de surfactantes não iônicos em torno de uma solução aquosa. Eles têm um custo menor do que os lipossomas, o que os torna uma opção atraente para aplicações que exigem grandes quantidades, como cosméticos. Eles podem fundir-se com os lipídeos do estrato córneo, e são capazes de melhorar a estabilidade e a disponibilidade dos ingredientes ativos bem como aumentar a sua penetração na pele. (HOUGEIR; KIRCIK, 2012; MIHRANYAN; FERRAZ; STRØMME, 2012; WU; GUY, 2009).

Os niossomas são preparados pelos mesmos métodos utilizados para a obtenção de lipossomas e, um dos métodos mais utilizados é a hidratação de filme

lipídico. Este processo é muito simples, e envolve a dissolução de materiais formadores de membrana em um solvente orgânico em um balão de fundo redondo. Depois de remover o solvente orgânico por evaporação, forma-se um filme seco no fundo do frasco. O princípio ativo é dissolvido em uma solução aquosa e adicionado para hidratar o filme seco, sendo então colocado em banho-maria em uma temperatura de 40°C. Geralmente é seguido por homogeneização, sonicação ou extrusão para reduzir o tamanho da vesícula. Os niossomas também podem carregar compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e formar estruturas unilamelares ou multilamelares com as vantagens adicionais de ter uma estabilidade melhorada, alta pureza e baixo custo. (GE et al., 2019; WU; GUY, 2009).

Normalmente, os niossomas são avaliados de acordo com sua morfologia superficial, distribuição de tamanho, potencial zeta e estabilidade durante o processo de formulação e armazenamento. Estas características são muito importantes para os niossomas, pois esses fatores não afetam apenas a taxa de encapsulação e a estabilidade dos niossomas, mas também estão relacionados ao seu desempenho *in vivo*. (GE et al., 2019).

Foi relatado que este tipo de vesícula diminui efeitos colaterais, dá sustentação à liberação e aumenta a penetração das substâncias através da pele. Vários mecanismos têm sido utilizados para explicar a capacidade dos niossomas de modular a transferência de ativos através da pele: adsorção e fusão dos niossomas na superfície da pele e redução das propriedades de barreira do estrato córneo. (MANOSROI et al., 2003).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO

##### 3.1.1 Coleta dos frutos e processamento

Os frutos das cultivares 'Tupy', 'Guarani' e 'Xavante' foram coletados do pomar do Centro de Estações Experimentais da Universidade Federal do Paraná, fazenda Canguiri, situado no município de Quatro Barras, PR, latitude 25°25'S, longitude 49°08' O e altitude de 930 metros.

Os frutos foram colhidos pela manhã, com o mesmo estágio de maturação (coloração preto-brilhante) e sem sinais de defeitos ou podridões, armazenados diretamente em bandejas de plástico transparente, identificadas quanto o cultivar e colocadas imediatamente em bolsa térmica, evitando-se a exposição ao sol e temperaturas elevadas. Posteriormente, os frutos foram levados ao laboratório, pesados (cerca de 100 g de frutas) e armazenados em sacos plásticos e colocados em freezer a - 40°C, até serem processadas.

As amostras das frutas foram homogeneizadas em multiprocessador doméstico e liofilizadas (liofilizador Virtis Advantage Plus, SP Scientific, Warminster, Inglaterra, a -80 °C, 100 mTorr, por 48 h). As amostras liofilizadas foram acondicionadas em frascos protegidos da luz e umidade e armazenadas em freezer a - 40°C.

##### 3.1.2 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos das frutas, foram utilizados como solvente extrator o etanol acidificado (etanol com 0,01% em HCl), etanol/água (70/30) e acetona/água (70/30). Para a extração utilizou-se 1 g do liofilizado de amora-preta com 20 mL de solvente extrator, e sonicação por 30 minutos em banho de ultrassom (Kondortech, modelo CD-4860) a uma frequência de 40 kHz, a temperatura de 40 °C.

Os extratos foram evaporados a secura em concentrador de amostras Centrivap (Labconco, Kansas City, EUA). Após a secagem, os frascos foram pesados e os rendimentos da extração calculados. Em seguida, colocados em embalagens protegidas da luz e umidade, vedados com película flexível (Parafilm®) e armazenados em freezer a - 40°C até o momento das análises.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

### 3.2.1 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada através do sequestro do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), de acordo com Brand-Williams (1995), com algumas modificações. Este método baseia-se na redução do radical, que ao receber um elétron passa da cor púrpura para amarela, alterando a intensidade da absorção. (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Para a análise, os extratos secos foram dissolvidos em seus respectivos solventes de extração e diluídos em metanol para uma concentração final de 1 mg/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada a fim de se obter diferentes faixas de concentração, conforme descrito no quadro 2. As soluções padrão dos controles positivos também foram preparadas em metanol nas concentrações de 302 a 7560 µg/mL para quercetina e 66 a 11017 µg/mL para BHT (Hidroxitolueno butilado).

QUADRO 2 – FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS APÓS DILUIÇÃO EM METANOL PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTES PELO MÉTODO DPPH

EXTRATO	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (µg/mL)
Tupy Acetona/água (70/30)	160 - 13,1
Tupy Etanol HCl 0,01%	320 - 53,7
Tupy Etanol/água (70/30)	196 - 32,9
Guarani Acetona/água (70/30)	80 - 19,4
Guarani Etanol HCl 0,01%	196 - 32,9
Guarani Etanol/água (70/30)	280 - 67,2
Xavante Acetona/água (70/30)	56 - 6,5
Xavante Etanol HCl 0,01%	280 - 47,0
Xavante Etanol/ água(70/30)	137,2 - 32,9

FONTE: O autor, (2019).

As soluções dos diferentes extratos foram aliquotadas em microplacas de 96 poços. Em cada poço foi colocado 200 µL de extrato diluído e 50 µl de solução de DPPH• (0,5 mmol). A mesma proporção foi usada para o branco (metanol e extrato sem DPPH•), para o controle (metanol e DPPH•) e para os controles positivos (BHT e quercetina). As amostras foram incubadas a 25 °C por 25 minutos, e protegidas da luz até a realização da leitura da absorbância.

A leitura da absorvância foi realizada em leitor de microplacas (UV-Vis Varian – Cary 50 Conc), em 518 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada pela fórmula abaixo, e os resultados expressos por concentração média eficiente (EC<sub>50</sub>):

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{absorvância amostra} - \text{absorvância branco})}{(\text{absorvância controle})} \times 100$$

Os valores de EC<sub>50</sub> foram comparados pelo teste *One way*-Anova seguido do teste post-hoc de Tukey.

### 3.2.2 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinar a quantidade de compostos fenólicos totais foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Siglenton e Rossi (1965), com algumas modificações. Neste método, o reagente de Folin-Ciocalteu reage com os compostos fenólicos presentes e é reduzido produzindo um complexo azul, que pode ser medido por espectrofotometria.

Em tubo Falcon foi adicionado uma alíquota de 160 µL dos extratos (2 mg/mL), 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 1540 µL de água. Por último, foi adicionado 200 µL de carbonato de sódio 10% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e agitado por 30 segundos em vórtex. Após 30 minutos de repouso em temperatura 25 °C, determinou-se a absorvância em um espectrômetro ultravioleta-visível (Agilent Technologies 8453 Santa Clara, EUA), em comprimento de onda de 725 nm. Os resultados foram expressos como g de compostos fenólicos totais equivalentes em ácido gálico (EAG) por mL de extrato. Os valores foram comparados pelo teste *One way*-Anova seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

### 3.2.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-QTOF-EM)

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA), acoplado ao espectrômetro de

massas com analisador quadrupolo-tempo de voo, Xevo G2-S, Waters (Milford, EUA) com fonte de ionização *electrospray*. O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás do cone e de dessolvatação foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). O gás de colisão utilizado foi argônio com pureza >99,998% da White Martins Praxair Inc. (Curitiba, Brasil). Foi utilizada uma coluna Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm x 1,7 µm), volume de injeção de 3 µL, fluxo 0,4 mL/min, temperatura de forno de coluna de 35 °C, em ambos os modos de ionização (positivo e negativo) e tempo total de corrida de 16 minutos. A fase móvel utilizada foi: (A) água/ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v) em modo de diluição gradiente (Quadro 3). Os compostos foram identificados a partir da sua *m/z*, comparados com perfis de padrões de referências e/ou deduzidos pela exatidão de massa (<5 ppm), pelo perfil de fragmentação e por comparação com dados da literatura.

QUADRO 3 –GRADIENTE UTILIZADO PARA ANÁLISE EM CLUE-QTOF-EM

<b>Tempo (min)</b>	<b>Acetonitrila/Ácido Fórmico 0,1%</b>	<b>Ácido Fórmico</b>
0	1%	99%
1	99%	1%
12	0%	100%
12,5	0%	100%
13,5	99%	1%
16	99%	1%

FONTE: O autor, (2019)

### 3.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS

#### 3.3.1 Cultivo da linhagem de fibroblastos

Foram realizados testes *in vitro*, utilizando linhagem de fibroblastos NIH-3T3 obtido do *American Type Culture Collection* (ATCC). As células foram semeadas numa densidade inicial de 2500 células/cm<sup>2</sup> em garrafas de cultura T25, contendo 7

mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico (100 UI de penicilina, 100 µg de estreptomicina) obtido da Sigma (St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C, com troca de meio a cada dois dias. Após atingir confluência, elas foram transferidas para placas de 96 poços com concentração em torno de 1x10<sup>5</sup> células/poço para realização dos testes.

### 3.3.2 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-il-tetrazólico (MTT, Sigma). Este método é um teste colorimétrico que avalia a viabilidade celular de maneira indireta, através da atividade de enzimas mitocondriais redutases que reduzem o MTT formando cristais insolúveis formazan de coloração violeta. Dessa maneira, a viabilidade celular pode ser identificada e quantificada pela formação e concentração dos cristais de formazan, que indicam a atividade mitocondrial ou presença de células vivas. Ou seja, a produção de formazan indica o estado funcional da cadeia respiratória. (RISS et al., 2016).

Ao realizar o teste, as células da linhagem de fibroblastos NIH-3T3 possuíam 85% de confluência e foram alíquotadas em microplacas de 96 poços. Em cada poço, diferentes concentrações dos extratos cetônicos das três cultivares foram adicionadas (35,3; 50,4; 72; 102,9; 147; 210 e 300 µg/mL), em quatro replicatas. O tempo de incubação foi de 24 e 48 horas à temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, os poços foram lavados com uma solução estéril de salina tamponada com fosfato (PBS), em seguida adicionado 100 µL de solução de MTT (0,05 mg/mL) em cada poço e a placa incubada por 3 horas de maneira a completar o tempo de incubação inicial (24 e 48 horas). Depois disso, foi adicionado o dimetilsulfóxido (DMSO), a placa foi homogeneizada e realizada a leitura em 540 nm em espectrômetro ultravioleta-visível Agilent Technologies 8453 (Santa Clara, EUA).

### 3.4 PREPARO DOS NIOSSOMAS

Niossomas foram preparados pelo método clássico de hidratação de filme lipídico. Foram solubilizados em 10 mL de clorofórmio, o Span<sup>®</sup> 80 e o colesterol (2:1

M/M) e esta solução foi depositada em um balão de fundo redondo na forma de um filme fino, utilizando um evaporador rotativo (RV 10 Control, IKA®, Staufen, Alemanha) a pressão reduzida (~910 mBar), 40 °C e 120 rpm por 60 minutos. Sobre o filme formado no balão, foi adicionado 60 mL de extrato cetônico da cultivar Xavante na concentração de 2 mg/mL, e em seguida evaporado nas mesmas condições até o volume final de 15 mL. Como controle foram produzidos niossomas, utilizando água ultrapura em lugar do extrato. (ABAE; MADADLOU, 2016; GONÇALVES et al., 2018; KAMBLE; TALREJA; PATHAK, 2012).

### 3.4.1 Caracterização dos niossomas

#### 3.4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

As matérias-primas (Span® 80 e colesterol) tiveram sua identidade confirmada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) em um equipamento Alpha-P (BRUKER®), no modo de transmitância, utilizando a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) nas seguintes condições: acumulação de 24 scans, resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e faixa espectral de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>. Esta análise também foi feita com os niossomas para confirmar a presença das matérias primas na sua composição e a total remoção do clorofórmio no processo de evaporação.

#### 3.4.1.2 Análise por Microscopia Óptica

As imagens dos niossomas foram obtidas colocando-se uma alíquota previamente homogeneizada da amostra de niossomas entre lâmina e lamínula e visualizadas por microscopia óptica com câmera fotográfica acoplada.

#### 3.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para esta análise morfológica, as amostras foram diluídas na proporção 1:100 (v/v) e fixadas em *stubs* sobre fita de cobre e submetidas à metalização à vácuo com ouro A análise foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (VEGA3, TESCAN®) a 15 kV no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (SCD 030, BALZERS®).

#### 3.4.1.4 Microscopia de Transmissão

A morfologia dos niossomas foi também avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná. Para esta análise, as amostras foram diluídas na proporção 1:200 (v/v) e 5  $\mu$ L dessa diluição foram aplicados sobre uma grade de cobre e secos em estufa a 40°C durante 24 horas e em seguida analisadas por MET.

#### 3.4.1.5 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão dos niossomas foram determinados por Espalhamento de Luz Dinâmico e o potencial zeta foi determinado por Mobilidade Eletroforética (Zetasizer Nano ZS90, MALVERN®). Para o ensaio, as amostras foram diluídas na proporção 1:100 (v/v). Estes ensaios foram realizados no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

#### 3.4.2 Identificação e confirmação da presença de compostos fenólicos nos niossomas

Para a identificação e confirmação da presença dos compostos fenólicos nos niossomas, amostras foram centrifugadas (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 7000 rpm por 10 minutos, separado o sobrenadante e lavadas com água ultrapura, dissolvidas em etanol e, em seguida, analisadas por CLUE-QTOF-EM, nas mesmas condições do item 3.2.4.

#### 3.4.3 Determinação da eficiência de encapsulação do extrato

A eficiência de encapsulação do extrato foi determinada de maneira indireta pela quantificação de compostos fenólicos totais, através do reagente colorimétrico Folin-Ciocalteu. As amostras de niossomas foram centrifugadas (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 7000 rpm por 10 minutos e separado o sobrenadante. Os niossomas foram então lavados com água ultrapura e centrifugados novamente, sendo solubilizados em metanol. Os compostos fenólicos foram determinados tanto no sobrenadante quanto nos niossomas, conforme descrito no item 3.2.2.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Os rendimento das extrações das diferentes cultivares com os diferentes extratores utilizados podem ser vistos na Tabela 2. Os solventes extratores acetona/água (70/30) e etanol/água (70/30) foram os que apresentaram os maiores rendimentos para todas as cultivares. O solvente extrator etanol acidificado foi menos eficiente no processo de extração provavelmente por ser o menos polar. Os maiores rendimentos foram obtidos com a cultivar Tupy em relação as demais cultivares. Independente do solvente utilizado, essa cultivar proporcionou maior quantidade de substâncias extraídas em termos de massa de extrato seco.

TABELA 2 – RENDIMENTO EM EXTRATO SECO DAS CULTIVARES TUPY GUARANI E XAVANTE COM DIFERENTES EXTRATORES

CULTIVAR	SOLVENTE DE EXTRAÇÃO	RENDIMENTO %
Tupy	Acetona/água (70/30)	53,71
	Etanol 0,01% HCl	35,43
	Etanol/água (70/30)	65,36
Guarani	Acetona/água (70/30)	30,13
	Etanol 0,01% HCl	16,97
	Etanol/água (70/30)	31,02
Xavante	Acetona/água (70/30)	41,49
	Etanol 0,01% HCl	26,34
	Etanol/água (70/30)	40,46

FONTE: O autor, (2019)

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos, identificação, atividade antioxidante e citotoxicidade.

#### 4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais

O ensaio da capacidade antioxidante avalia o poder redutor de um composto antioxidante, que ao doar um elétron para o radical DPPH•, oxida-se. (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Os resultados para este ensaio foram

expressos pela quantidade de extrato necessária para um decréscimo de 50% ( $EC_{50}$ ) da concentração inicial do radical DPPH• (Tabela 3).

Para comparar as  $EC_{50}$  dos extratos foi aplicado o teste *One way*-ANOVA. Antes de aplicar os testes, foram avaliados os pressupostos da sua utilização, onde inicialmente foi aplicado o teste de distribuição normal de Gauss pelo teste Kolmogorov Smirnov-Shapiro Wilk e os dados mostraram-se normais ( $p=0,86$ ). No entanto, houve ausência de homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene ( $p=0,00$ ). Para obter a homocedasticidade, os dados foram logaritizados utilizando-se a base logaritmo decimal (base 10). Na sequência, foi aplicado o teste *One way*-ANOVA e foi verificada diferença significativa entre os solventes utilizados ( $p=0,00$ ). Foi aplicado o teste *post hoc* de Tukey e foi verificado que todos os extratos diferiram entre si ( $p<0,034$ ), com exceção dos extratos das cultivares Xavante com etanol/água (70/30) e Tupy com acetona/água (70/30) ( $p=0,326$ ) cuja diferença não foi estatisticamente significativa.

TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR PELO ENSAIO DO RADICAL DPPH

Extrato	Compostos fenólicos <sup>a</sup>	$EC_{50}$ <sup>b</sup>	$r^2$
Tupy acetona/água (70/30)	92,6 ± 2,7	109,66 ± 0,53	0,9982
Tupy etanol/HCl	16,6 ± 0,9	238,85 ± 1,78	0,9976
Tupy etanol/água (70/30)	57,2 ± 2,5	145,58 ± 3,68	0,9991
Xavante acetona/água (70/30)	139,4 ± 1,0	33,76 ± 0,043	0,9951
Xavante etanol/HCl	56,9 ± 2,8	212,57 ± 2,36	0,9984
Xavante etanol/água (70/30)	87,1 ± 3,8	105,24 ± 1,23	0,9970
Guarani acetona/água (70/30)	131,7 ± 4,9	54,93 ± 0,015	0,9995
Guarani etanol/HCl	73,0 ± 3,1	153,67 ± 1,24	0,9985
Guarani etanol/água (70/30)	71,2 ± 2,0	132,79 ± 0,24	0,9956

FONTE: O autor, (2019).

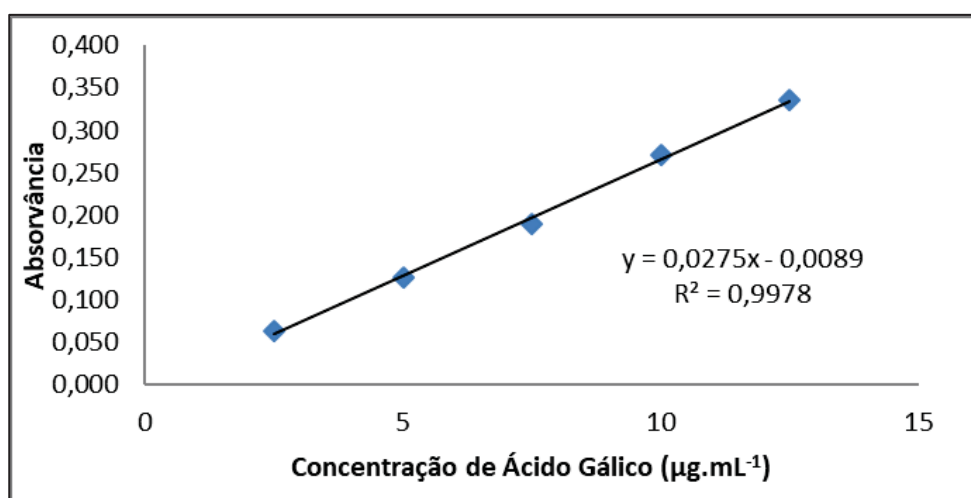
LEGENDA: Valores expressos como média ± desvio padrão de três repetições.<sup>a</sup> Compostos fenólicos totais expressos em microgramas equivalentes de ácido gálico por mL de extrato ( $\mu\text{g EAG/mL}$ ). <sup>b</sup> O valor  $EC_{50}$  é definido como a quantidade de extrato seco necessária em  $\mu\text{g/mL}$  para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50%. O  $r^2$  é referente a correlação linear das retas obtidas para o  $EC_{50}$ .

A quercetina ( $EC_{50}$  4,2  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparada aos extratos e BHT ( $EC_{50}$  7,7  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou uma maior atividade antioxidante. O BHT é um antioxidante sintético muito utilizado na indústria cosmética, porém, estudos evidenciaram que este antioxidante possui efeitos tóxicos, como alterações nas funções hepáticas. Os resultados da atividade antioxidante de extrato acetona/água (70/30) da cultivar

Xavante indicam que este extrato, tem potencial para ser uma alternativa ecologicamente correta para substituir o BHT.

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin Ciocalteu. Todos os flavonoides, antocianinas e não flavonoides podem ser estimados por este método. (ATALA et al., 2009). Para a quantificação foi realizada uma curva analítica com ácido gálico conforme apresentado na Figura 6.

FIGURA 6 – CURVA ANALITICA DO ÁCIDO GÁLICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS



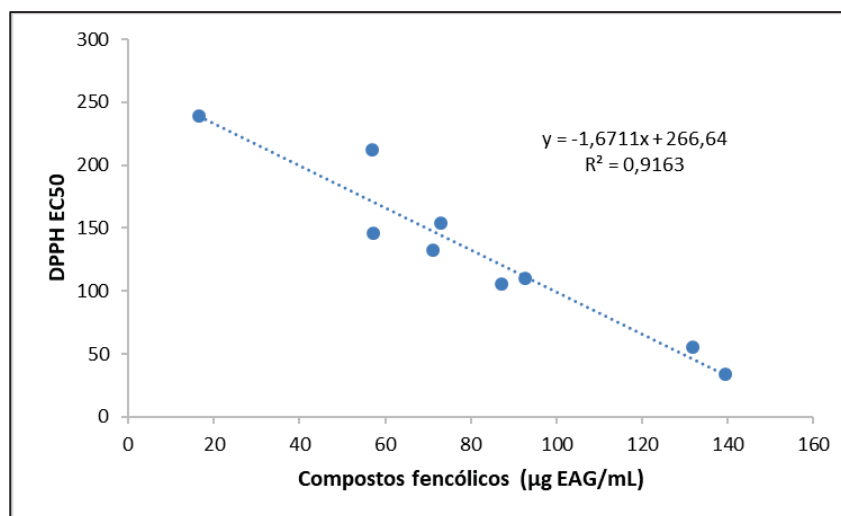
FONTE: O autor, (2019).

Entre as cultivares testadas, a cultivar Xavante em acetona/água (70/30), foi a que apresentou maior concentração de fenólicos totais (139,4 µg EAG/mL) e a maior atividade antioxidante (EC<sub>50</sub> 33,76 µg/mL), seguido da cultivar Guarani (131,7 µg EAG/mL; EC<sub>50</sub> 54,93 µg/mL), também em acetona (Tabela 3). O solvente extrator acetona foi o que apresentou a melhor capacidade extratora para as três cultivares, cujos extratos apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais e com a melhor atividade antioxidante. O segundo melhor solvente extrator foi o etanol água (70/30) e a menor capacidade extratora foi do etanol acidificado para as cultivares Xavante e Tupy. Isto mostra que o solvente extrator pode influenciar a composição qualitativa e quantitativa das substâncias presentes com capacidade antioxidante.

Diversos estudos com amora-preta tem mostrado uma correlação linear positiva entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, resultados

semelhantes aos encontrados neste trabalho (Figura 7). (BOEING et al., 2014; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; LIANDA et al., 2012; MA et al., 2011). A avaliação da correlação, entre as variáveis compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, foi feita através do teste de correlação de Pearson no qual ambas se mostraram altamente correlacionadas ( $p=0,000$  e  $r=-0,957$ ), quanto maior a quantidade de compostos fenólicos totais, menor o valor de  $EC_{50}$ . O valor de coeficiente de determinação foi de  $R^2= 0,914$  mostrando que 91% do potencial antioxidante é explicado pela concentração dos compostos fenólicos. Em seguida, foi feita a análise da qualidade do modelo pelo teste ANOVA e este mostrou-se estatisticamente significativo ( $p=0,000$ ). A atividade antioxidante depende da estrutura dos compostos fenólicos, particularmente do número e da posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. (SELLAPPAN; AKOH; KREWER, 2002; WANG; LIN, 2000).

FIGURA 7 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.



FONTE: O autor, (2019)

Constata-se ainda que, a atividade antioxidante possui uma forte relação com o solvente empregado. (FRANKEL, 1993; MADSEN e BERTELSEN, 1995). Isso pode explicar os resultados obtidos neste trabalho, onde a acetona/água (70/30) e o etanol/água (70/30) foram os solventes mais eficientes. Isto pode ser devido a melhor solvatação de compostos antioxidantes como resultado das interações entre os sítios polares das moléculas antioxidantes e do solvente. Em um estudo realizado por Boeing e colaboradores, onde avaliaram os melhores solventes para extração de

compostos fenólicos, foi observado que a mistura de solvente orgânico e água são mais eficientes na extração que os respectivos solventes orgânicos puros, com ou sem a presença de ácido.

Além disso, plantas que não possuem espinhos em suas hastes, teoricamente, sintetizam mais metabolitos secundários do que as plantas que possuem espinhos. Os programas de melhoramento buscam esse tipo de planta para facilitar o manejo do pomar e a colheita das frutas. (DU; FINN; QIAN, 2010). Neste estudo, podemos observar a comprovação dessa teoria já que a Xavante obteve o melhor desempenho nas análises e é uma cultivar sem espinho, diferente das outras duas cultivares analisadas. Pantelidis e colaboradores (2007), também encontraram atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais inferiores para cultivares com espinhos quando comparadas a cultivares sem espinhos. (PANTELIDIS et al., 2007)

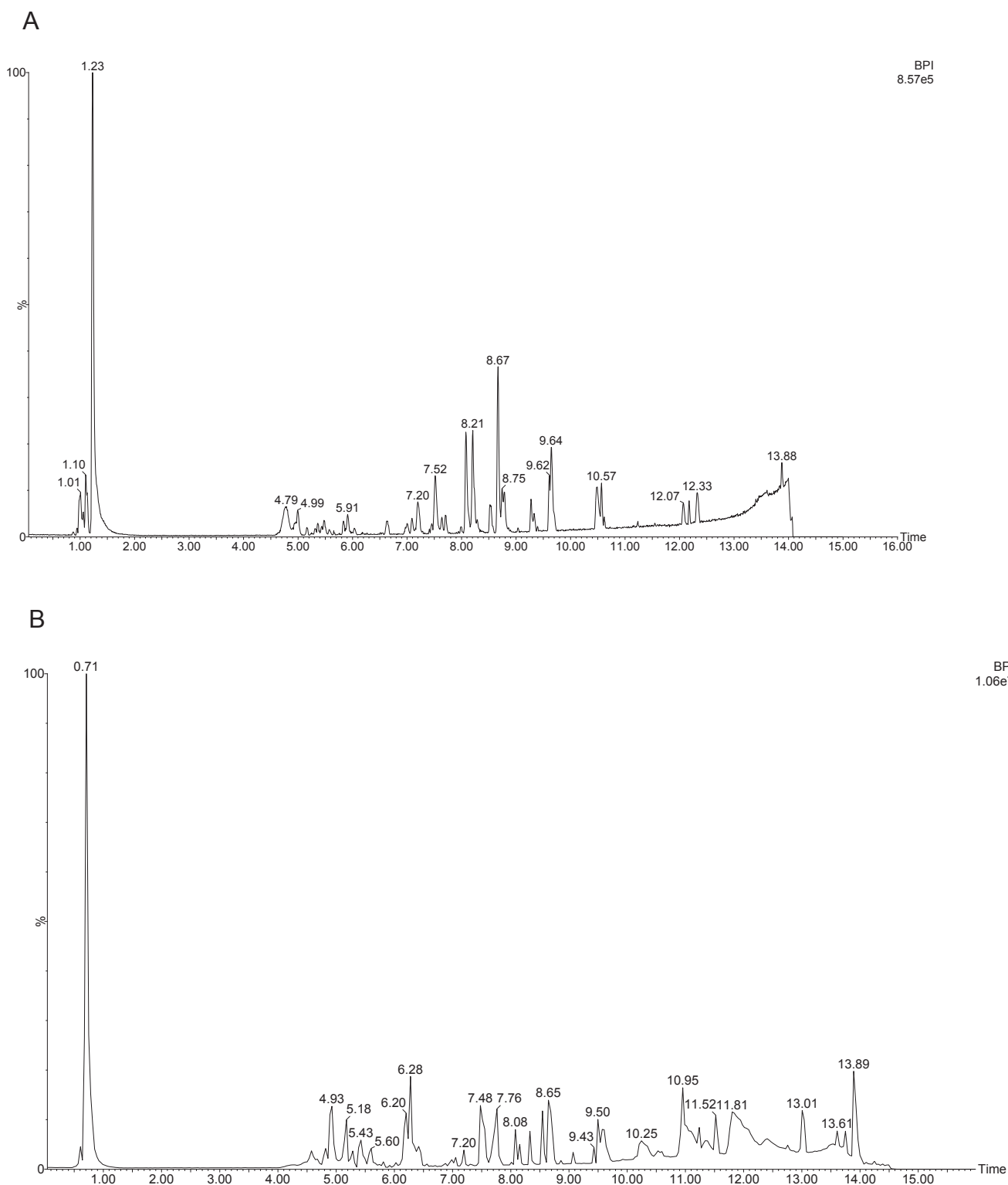
#### 4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO TEMPO DE VOO (CLUE-QTOF-EM)

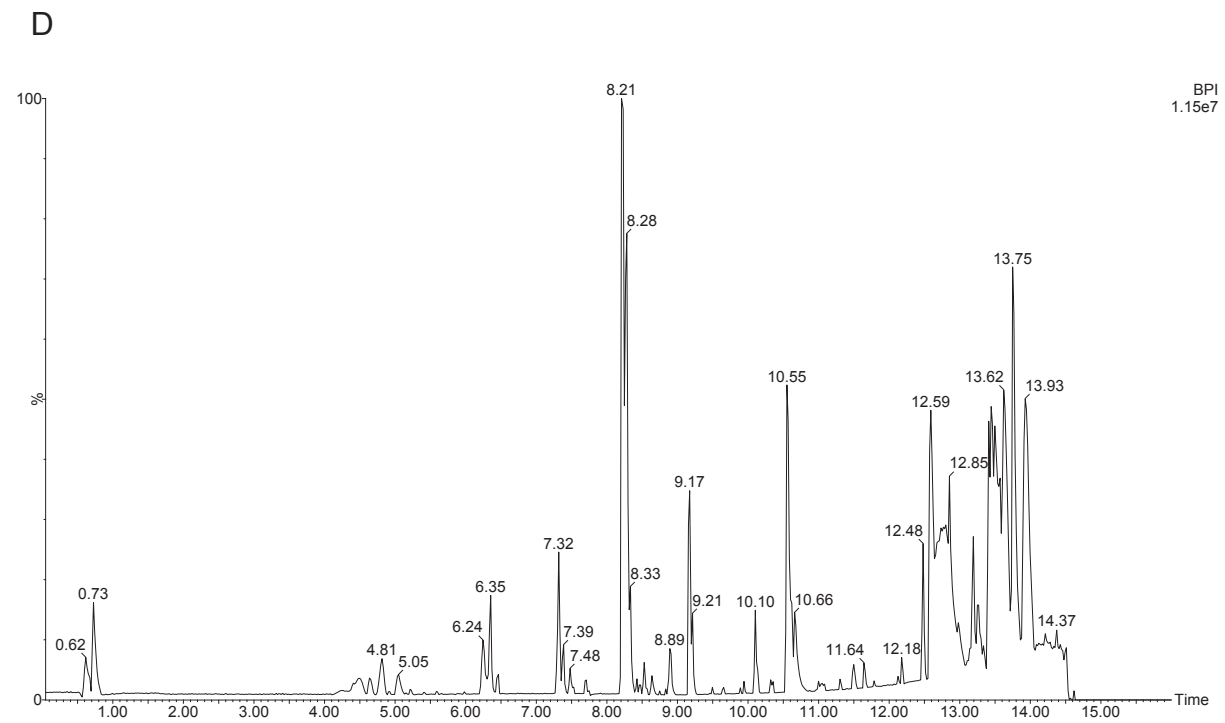
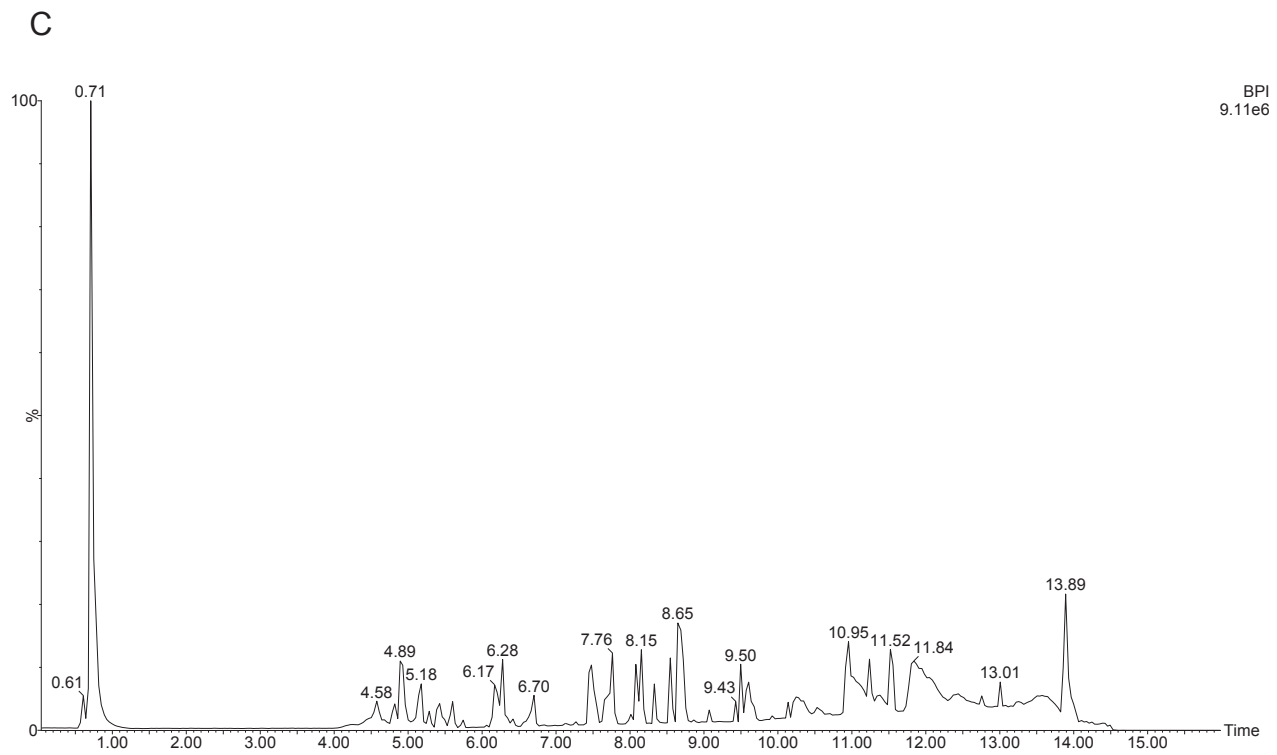
A análise por CLUE-QTOF-EM foi realizada visando uma possível identificação dos compostos presentes nos extratos o que poderia ajudar explicar as diferenças quanto ao potencial antioxidante nos diferentes extratos

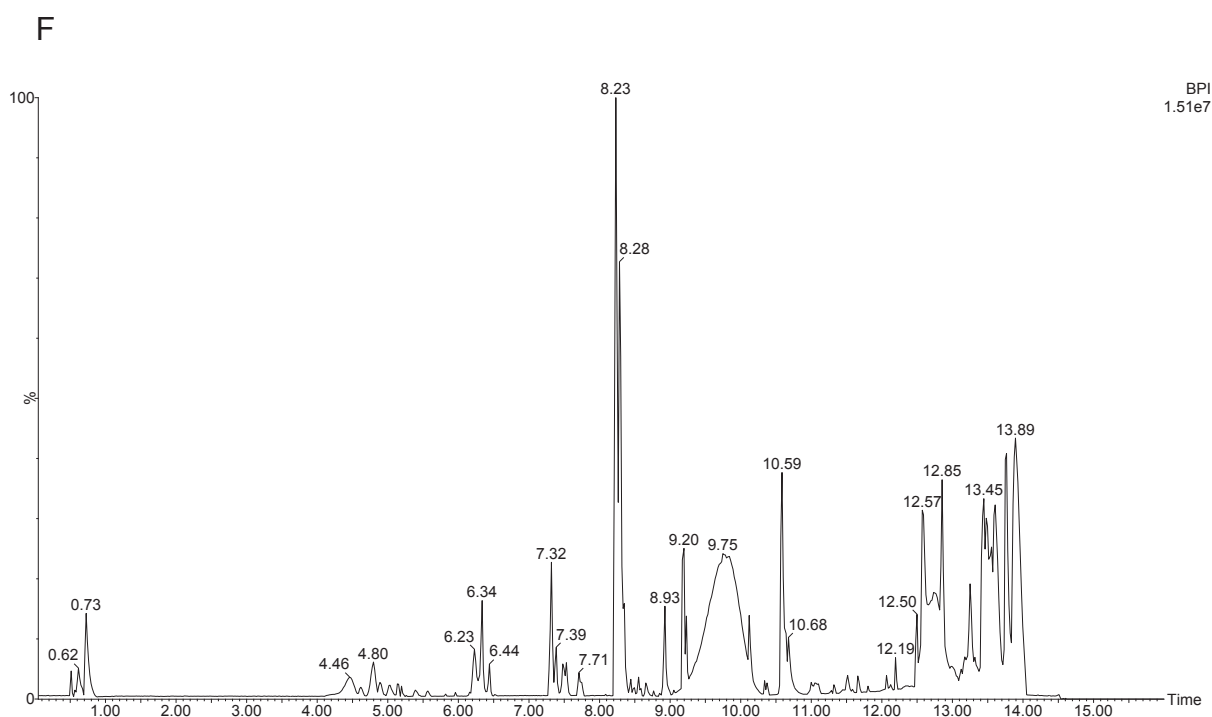
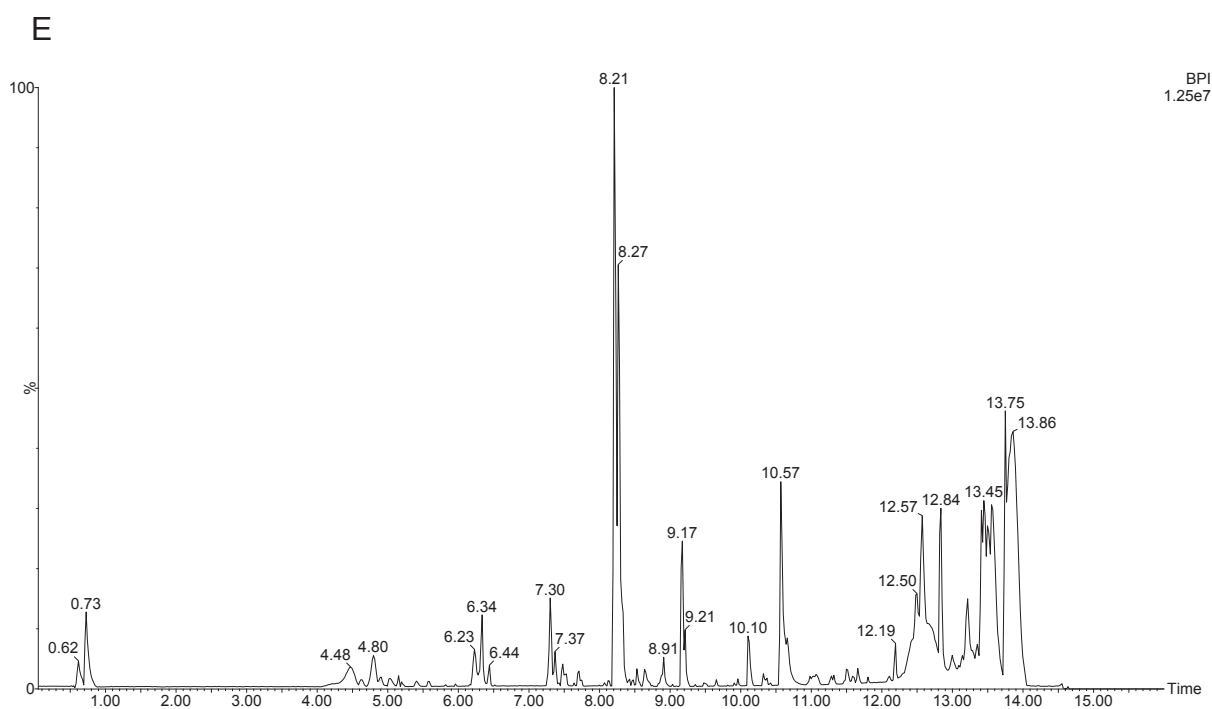
A Figura 8 apresenta os cromatogramas obtidos através da técnica de CLUE-QTOF-EM dos extratos das cultivares Tupy, Guarani e Xavante em acetona/água (70/30) no modo de ionização negativo e positivo.

Embora muitos picos tenham apresentado baixa resolução devido à coeluição de antocianinas (entre 4 e 6 minutos), a análise por espectrometria de massas CLUE-EM e CLUE-EM/EM possibilitou a identificação e a diferenciação entre estes.

FIGURA 8 – CROMATOGRAMAS EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO E NEGATIVO DE EXTRATOS CETÔNICOS DE AMORA-PRETA CULTIVARES TUPY, XAVANTE E GUARANI







FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: A – Cromatograma em modo de ionização negativo cultivar Tupy. B – Cromatograma em modo de ionização negativo cultivar Xavante. C – Cromatograma em modo de ionização negativo cultivar Guarani. D – Cromatograma em modo de ionização positivo extrato cultivar Tupy. E – Cromatograma em modo de ionização positivo extrato cultivar Xavante. F – Cromatograma em modo de ionização positivo extrato cultivar Guarani.

A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos compostos com substâncias padrões. Entretanto para os compostos que não havia disponibilidade de padrão, foi feita a comparação com dados da literatura e a tentativa de identificação através da exatidão de massas, considerando satisfatório valores de erro de massa inferiores a 5 ppm, com subsequente fragmentação dos íons positivos e negativos predominantes no modo EM/EM. Os dados espectrométricos dos compostos presentes nos extratos são mostrados nas tabelas 4 e 5 para os solventes extratores acetona/água (70/30) e etanol/HCl 0,01% e nos anexos 1 e 2 para o solvente extrator etanol/água (70/70).

Os compostos 33, 37, 38, e 39 (Tabela 5 e Anexo 2), foram caracterizados como derivados de cianidina, por apresentarem como fragmento no modo MS/MS a massa 287 correspondente a cianidina aglicona. Os compostos 34 e 35 apresentaram  $m/z$  de 535,1088 e 595,1663 que são característicos da cianidina malonil hexosídeo e a cianidina hexosil deoxihexosil, respectivamente. Ambos os compostos apresentaram como fragmentos a  $m/z$  287 (cianidina) e 449 (cianidina com hexose). A identificação destes compostos nestes extratos está em concordância com os dados obtidos por Dai e colaboradores (2009), que relataram que três cultivares de amora-preta possuíam os mesmos perfis cromatográficos para antocianinas, sendo que a cianidina-3-glicosídeo (cianidina hexosídeo) foi a mais prevalente. (DAI et al., 2009; GARZÓN; RIEDL; SCHWARTZ, 2009; TUMBAS ŠAPONJAC et al., 2014).

Esses achados também são semelhantes aos presentes em 18 variedades diferentes de amoreira dos Estados Unidos, México, Chile, França e Macedônia, conforme relatado por Fan-Chiang e Wolverdst (2005). Cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (cianidina hexosil deoxihexosil) foram estabelecidos como principais antocianinas naquelas variedades com cianidina 3-glicosídeo representando entre 43% e 95% da área total do pico e cianidina 3-rutinosídeo variando de traço até 53%.

TABELA 4 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.

(CONTINUA)

Nº	COMPOSTOS	MASSA TEÓRICA	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	TR	TUPY ETOH/HCL	GUARANI ETOH/HCI	XAVANTE ETOH/HCL	XAVANTE ACETONA	TUPY ACETONA	GUARANI ACETONA
1	Ácido cítrico	192,0270	191,0192	111,0123/85,0325/173,0319	0,7	191,0195	191,0194	191,0194	191,0196	191,0195	191,0193
2	Ácido clorogênico	354,095	353,0822	179,0387/235,9320/191,0406 146,9504	4,5	-	-	353,0833	353,0836	-	-
3	Ácido cumárico	164,0473	163,0395	145,0307/119,0469	4,6	163,0393	163,0392	163,0394	163,0387	-	163,0392
4	Ácido hidroxibenzoico	138,0317	137,0239	139,0358/121,0268	5,7	137,0240	137,0244	137,0242	137,0243	-	-
5	Ácido málico	134,0215	133,0137	71,0139	0,7	133,0139	133,0142	133,0134	133,0141	133,0138	133,0141
6	Ácido protocateuico	154,0266	153,0188	109,0293	5,4	-	-	-	153,0193	153,019	153,019
7	Ácido quinico	192,0634	191,0556	85,0295/111,0087/173,0078	0,7	191,0561	191,0555	191,0558	191,0561	191,0559	191,0556
8	Cafeoil hexosídeo	342,0951	341,0873	191,0553/163,0380/135,0433	4,6	341,0872	341,0882	341,0867	341,0863	341,0885	-
9	Casuarinina Elagitanino hexosídeo	936,0869	935,0791	467,035 [M-2H] 633,0681/300,9974	5,2	-	-	-	935,0759	935,078	935,08009
10	Catequina*	290,079	289,0712	109,0288/123,0446	4,3	289,0712	289,0712	289,0708	289,0709	289,0706	289,0714
11	Ácido dicafeoilquinico	516,1268	515,1190	353,0937/173,0491/135,0456	8,1	515,121	515,1213	515,1185	515,1212	515,1205	515,1213
12	Diidromiricetina	320,0532	319,0454	193,1400	5,0	319,0451	319,0447	319,0441	319,0443	319,0443	319,0441
13	Diidromiricetina ramnosídeo	466,1111	465,1033	125,0239/109,0291	4,7	465,103	465,1033	465,1031	465,1023	465,1028	465,1026
14	Ácido elágico*	302,0062	300,9984	145,0380/200,0233/117,0411	4,7	300,9974	300,9976	300,9973	300,9981	300,9983	300,9974
15	Epicatequina*	290,079	289,0712	123,0445/109,0290/97,0284	4,6	289,0709	289,0702	289,0707	289,0707	289,0706	289,0714
16	Ácido ferúlico	194,0579	193,0501	134,0369/149,0612	0,7	-	-	-	-	193,0495	-

TABELA 4 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO (CONCLUSÃO)

Nº	COMPOSTOS	MASSA TEÓRICA	[M-H] <sup>+</sup>	MS/MS	TR	TUPY ETOH/HCl	GUARANI ETOH/HCl	XAVANTE ETOH/HCl	XAVANTE ACETONA	TUPY ACETONA	GUARANI ACETONA
17	Kaempferol*	286,0477	285,0399	93,0399/117,0416/143,0568	6,6	285,0385	285,0391	285,0392	285,0396	285,0385	285,0385
18	Kaempferol hexosil deoxihexosil	594,1585	593,1506	447,0910/285,0387	5,5	593,1495	593,1503	593,1511	593,1495	593,1488	-
19	Kaempferol acetilhexosideo	490,1111	489,1033	285,0393	5,9	489,1023	489,1032	489,1046	489,1041	489,1019	489,1038
20	Kaempferol glucuronideo	448,1006	447,0928	285,0396	4,6	447,0928	447,0921	447,0926	447,0922	447,0922	447,0923
21	Lambertianina C	2804,2293	933,7311	633,075/300,1000	5,14	-	-	-	933,7310	-	-
22	Luteolina hexosideo	462,0798	461,0720	285,0388	5,6	461,0717	461,0712	461,0711	461,0714	461,0709	461,0712
23	Quercetina pentosideo	434,0849	433,0771	301,0332/151,0026	5,8	433,0751	433,0761	433,0779	433,0769	433,0758	433,0753
24	Quercetina glucuronideo	478,0747	477,0669	301,0347	5,4	477,0667	477,0668	477,0651	477,0674	477,0664	477,0664
25	Quercetina malonil glicosideo	550,0959	549,0880	300,0267/271,0240	5,5- 5,7	549,0867	549,0907	549,0866	549,0864	549,0864	549,0868
26	Quercetina hexose acetato	506,1060	505,0982	447,0926/301,0332/151,0031	5,7	505,0976	505,0973	505,097	505,0972	505,097	505,0973
27	Quercetina*	302,0426	301,0348	271,0250	5,6	301,0334	301,0338	301,0336	301,0340	301,0335	301,0344
28	Quercetina hexosideo	464,0955	463,0877	300,0382/271,0332/255,0389 151,0091/301,0437/179,0045	4,9	463,0873	463,0866	463,0872	463,0865	463,087	463,0873
29	Hexosyl-deoxyhexosyl quercetina	610,1533	609,1455	300,0454/301,0524/271,0410	4,7	609,1446	609,144	609,144	609,1449	609,1443	609,1449
30	Sanguina H-6	1870,1581	934,0712	934,0645/633,0714/300,9970	5,2	-	-	-	934,0707	934,0689	934,0674
31	Ácido Siringico	198,0528	197,0450	153,0552	5,4	-	-	-	197,0448	-	-

TABELA 5 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO.

Nº	COMPOSTOS	MASSA TEÓRICA	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	TR	TUPY ETOH/HCl	GUARANI ETOH/HCl	XAVANTE ETOH/HCl	XAVANTE ACETONA	TUPY ACETONA	GUARANI ACETONA
32	Ácido cafeico	180,0423	181,0501	135,0444/163,0375	0,8	181,0502	181,05	181,0504	181,0506	181,05	181,0499
33	Cianidina hexosídeo	449,1084	449,1084	287,0543	4,7	449,1086	449,1095	449,109	449,1076	449,1084	449,1088
34	Cianidina malonil hexosídeo	535,1088	535,1088	449,1082/287,0547	5,4	535,1075	535,1082	535,1083	535,1076	535,108	535,1063
35	Cianidina hexosil deoxihexosil	595,1663	595,1663	287,0555/449,1082	5	595,1652	595,1661	595,1645	595,1651	595,1635	595,1646
36	Cianidina	287,0556	287,0556	-	4,7	287,0555	287,0561	287,0559	287,0552	287,0554	287,0554
37	Cianidina dihexosídeo	611,1612	611,1612	287,0545	5,4	611,1599	611,1635	611,1616	611,1591	611,1602	611,1594
38	Cianidina dihexosídeo	611,1612	611,1612	287,0551	5,2	611,1597	611,1601	611,1599	611,1597	611,1597	611,1589
39	Cianidina hexosil deoxihexosil hexosídeo	757,2191	757,2191	287,0551	5,13	757,2181	757,218	-	-	757,2166	757,2194
40	Delfinidina	303,0499	303,0499	229,0493/153,0183	5,7	303,05	303,0513	303,0506	303,0502	303,0500	303,0502
41	Delfinidina pentosídeo hexosil deoxihexosil	611,1612	611,1612	303,0499	5,9	611,1597	611,1603	611,1595	611,1596	611,16	611,1589
42	Delfinidina Pentosídeo	435,0927	435,0927	303,0496	6,3	-	-	435,0945	435,0916	435,0936	-
43	Delfinidina Hexosídeo	465,1033	465,1033	303,0502	6,05	465,1025	465,1049	465,104	465,1022	465,1023	465,1026
44	Ácido elágico Pentosídeo	434,0485	435,0563	303,0117	5,15	435,0563	435,0561	435,0565	435,0558	435,0571	435,0553
45	Hidroxicumarina	162,0316	163,0394	133,0287/135,0439/105,0341	7,6	163,0393	163,0393	163,0394	163,0396	-	-
46	Pelargonidina dihexosídeo	433,1135	433,1135	271,0610	4,8	-	-	433,1118	-	-	-
47	Procianidina B2	578,1424	579,1502	287,0559/127,0386/163,0390/409,0935	3,9	579,1488	579,1484	579,1481	579,1476	579,1481	579,1485
48	Pirogalol	126,0317	127,0395	85,0296/97,0298	0,6	127,04	127,0388	127,0398	127,0399	127,0399	127,0397

Amoras-pretas possuem quantidades apreciáveis de flavonóis encontrados exclusivamente na parte da drupete e ocorrem principalmente na forma glicosilada. Três derivados de kaempferol (compostos 18, 19 e 20) foram identificados com hexosil deoxihexosil, acetilhexosideo e glucuronídeo com  $m/z$  593,1506; 489, 1033; e 447, 928, respectivamente. Ambos os compostos apresentam como fragmento em comum o  $m/z$  285,0396 que corresponde ao kaempferol. Além disso, o composto 18 apresenta, além da perda de 308 (da porção ramnoglicosídica), o fragmento 447,0910 que corresponde a kaempferol hexosídeo. A ocorrência de kaempferol não é consistente para todos os genótipos de amoreira, provavelmente devido a diferenças genéticas, mas para as três cultivares aqui testadas ele esteve presente. (GASPEROTTI et al., 2010; SIRIWOHARN et al., 2004).

Com relação a composição de taninos, foram encontrados taninos predominantemente hidrolisáveis (elagitaninos), e taninos condensados (procianidinas). Três elagitaninos foram identificados nos extratos de amora: casuarinina elagitanino hexosídeo (composto 9), lambertianina C (composto 21) e sanguina H-6 (composto 30). A massa molecular da lambertianina C é de 2805,9 Da e de Sanguina H-6 é de 1870,1581. Ambas as massas são superiores ao intervalo de massas analisadas pelo QTOF. No entanto, o íon duplamente desprotonado foi observado para ambos os compostos,  $m/z$  1401,3730 e  $m/z$  934,0712. Ainda, a distribuição isotópica (0,5  $m/z$  entre os picos) indicou que a massa real era duas vezes o valor  $m/z$  observado. Esses compostos foram observados em outros estudos sobre amora (HAGER et al., 2008). O padrão de fragmentação observado para esses três compostos,  $m/z$  633 e 300, é consistente com os achados da literatura, e correspondem a galoiil-HHDP-hexose e ao ácido elágico. (HAGER et al., 2008; MERTZ et al., 2007).

Os compostos 10 e 15 foram identificados como epicatequina e catequina, respectivamente, pela comparação com o tempo de retenção dos padrões. Estudos da literatura tem mostrado que a amora contém esses isômeros. (MAATTA; KAMAL-ELDIN; TORRONEN, 2003; MERTZ et al., 2007b; YONG; KWOKI; YANG, 1993). O composto 13 foi identificado como diidromiricetina ramnosídeo, estando de acordo com dados da literatura que já relataram a sua presença no extrato de amora. (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012).

Os compostos 41, 42 e 43 com  $m/z$  de 611,1612; 435,0928 e 465,1033 foram identificados como derivados da delfinidina por apresentarem como fragmento no

modo MS/MS o  $m/z$  303 (delfinidina aglicona), e pelas perdas características de rutinosídeo (308), pentosídeo (132) e hexose (162). (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). A delfinidina já foi relatada por exercer um efeito inibidor potente sobre danos cutâneos dependentes de UVB, em comparação com outros compostos de antocianidina. (AFAQ et al., 2007).

Nos extratos da amora, quercetina-pentosídeo (íon com  $m/z$  de 433,0771), quercetina-hexosídeo ( $m/z$  463,0877), quercetina-glucuronídeo ( $m/z$  477,0669), deoxihexose quercetina ( $m/z$  609,1455), quercetina-glucose-acetato ( $m/z$  505,0982) e quercetina malonil-glucosídeo, foram identificados através do seu fragmento 301, pela exatidão de massas e também pela comparação com dados na literatura. (HAGER et al., 2008; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012; SEERAM et al., 2006).

Uma flavona foi detectada nos extratos de amora: luteolina-hexosídeo ( $m/z$  461,0720), apresentando como fragmento a luteolina sem o açúcar ( $m/z$  285). Esse fragmento foi diferenciado do kaempferol por comparação com os dados de espectrometria de massa e pelos fragmentos característicos ( $m/z$  175, 151 e 133), além disso os dados do kaempferol foram comparados com a cromatografia de um padrão de referência deste composto. (LI et al., 2016).

Os ácidos fenólicos na amora são principalmente ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Esses ácidos aparecem tanto na sua forma livre quanto em sua forma conjugada de ésteres e glicosídeos (como o composto 44). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem o ácido hidrobenczóico (composto 4), o ácido protocatecuico (composto 6) e ácido elágico (composto 14), sendo este confirmado por padrão de referência. O ácido protocatecuico foi caracterizado devido a presença do fragmento  $m/z$  109,0307  $[M-CO_2-H]^-$ .

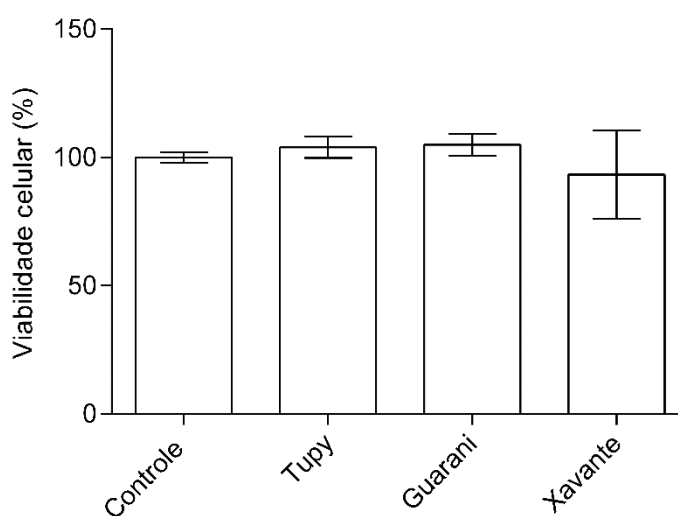
O ácido cafeico (composto 32), cumárico (composto 3) e ferúlico (composto 16) são ácidos hidroxicinâmicos encontrados nas amoras também nas formas livre, éster e glicosídica. Esses ácidos desempenham papéis importantes na resistência de plantas a patógenos e herbívoros. Além disso eles demonstram ter efeitos benéficos sobre a saúde humana apresentando propriedades antioxidantes, antimutagênicas, antiproliferativas e antimicrobianas. Esses compostos também afetam as propriedades organolépticas dos alimentos e a estabilidade oxidativa de produtos alimentícios. (Aziz, Farag, Mousa e Abo-Zaid, 1998).

#### 4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURAS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS

O teste de MTT, segundo Bhatia (2008), é um método rápido para avaliar muitos compostos bioativos com potencialidade no uso clínico. A escolha de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 justifica-se por este ser o principal componente celular dos tecidos e é a linhagem celular normalmente usada para estudos de citotoxicidade. (BHATIA; YETTER, 2008).

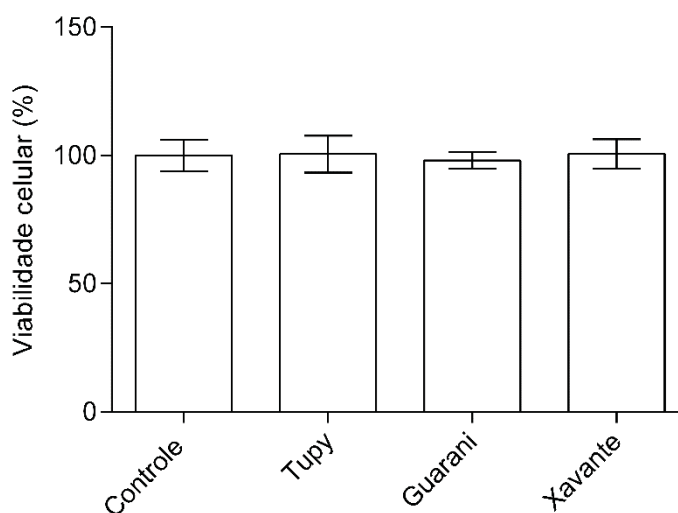
Considerando que os extratos preparados com acetona/água (70/30) obtiveram os melhores resultados para as análises anteriores, a viabilidade celular dos fibroblastos foi avaliada com as três cultivares apenas para este solvente extrator. Os resultados deste teste são mostrados nas Figuras 9 e 10. Pode-se observar que os extratos não induziram a morte de fibroblastos 3T3 e que não afetou a sua proliferação, até mesmo na maior concentração utilizada (300 µg/ml). Isso mostra que os extratos das três cultivares nas concentrações testadas não são tóxicas para as células testadas. O que é um bom prognóstico considerando o uso pretendido para estes extratos

FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE AMORA-PRETA TUPY, GUARANI E XAVANTE EM NIH3T3 POR 24 HORAS.



FONTE: O autor (2019)

FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE AMORA-PRETA TUPY, GUARANI E XAVANTE EM NIH3T3 POR 48 HORAS.



FONTE: O autor (2019)

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NIOSSOMAS

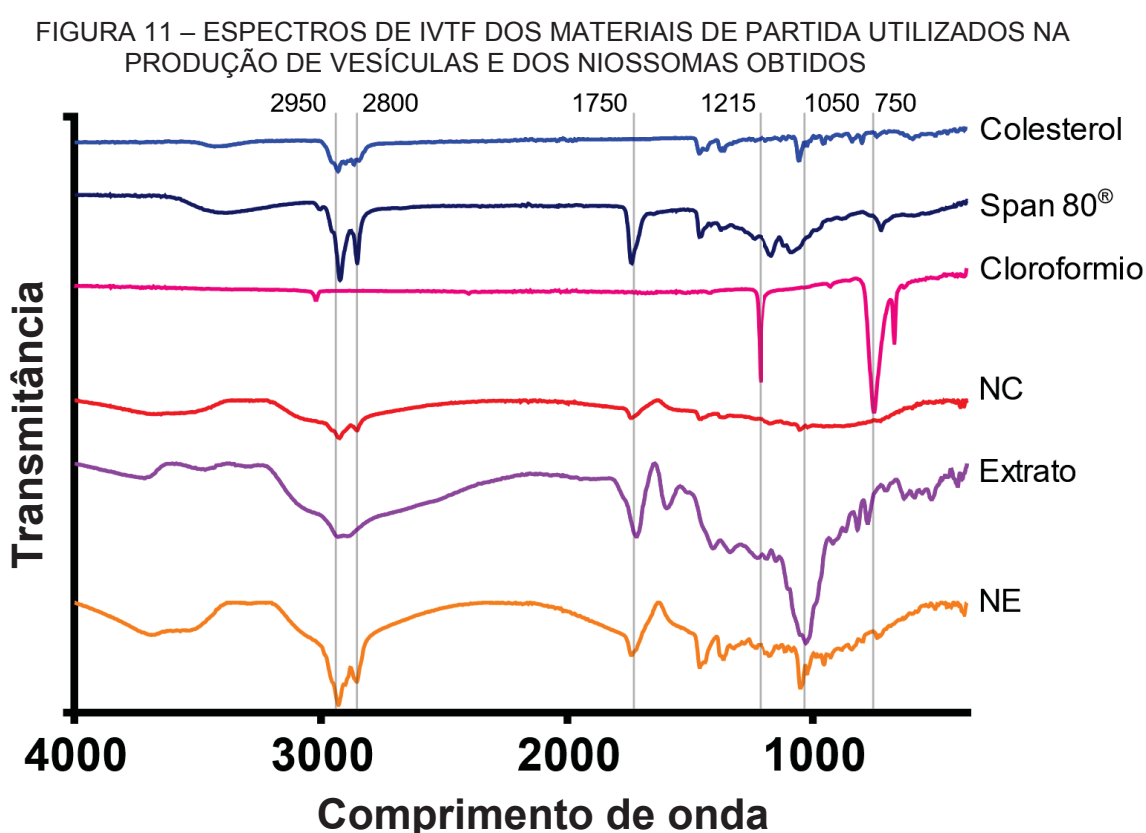
Considerando que o extrato da cultivar Xavante preparado com acetona/água (70/30) apresentou os melhores resultados para as análises anteriores, este foi o escolhido para a encapsulação

##### 4.5.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

As matérias-primas utilizadas no preparo dos niossomas foram identificadas por IVTF. Os espectros obtidos para o colesterol, clorofórmio, Span 80®, extrato seco cetônico da cultivar Xavante e também para niossomas controle (sem extrato) e niossomas com extrato são mostrados na Figura 11.

O espectro do colesterol apresentou dois picos característicos em 2830 e 2935  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem às vibrações dos hidrocarbonetos cíclicos e às vibrações de estiramento dos grupos CH. O clorofórmio apresentou bandas na região de 3000  $\text{cm}^{-1}$  e 1215  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento e deformações das ligações C-H e as bandas na região de 750  $\text{cm}^{-1}$  às ligações C-H e C-Cl<sub>3</sub>. Para o Span 80®, as bandas de absorção em 2950 e 2.800  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento C-H do grupo metileno e bandas intensas próximas a região de 1700  $\text{cm}^{-1}$  que se referem à vibração do grupo carbonila.

Absorções características que estão presentes no extrato cetônico (de amora-preta cultivar Xavante) são também observadas nos niossomas contendo o extrato, e não são observadas nos niossomas controle. Isto é uma evidência de que o extrato foi encapsulado. As bandas características observadas no espectro do clorofórmio ( $3000\text{ cm}^{-1}$  e  $1215\text{ cm}^{-1}$ ), não foram observadas no espectro dos niossomas, isto é uma evidência de que este solvente pode ter sido removido totalmente, ou está em quantidades não detectáveis.



LEGENDA: (NE) Niossomas de extrato de amora-preta; (NC) Niossomas Controle.

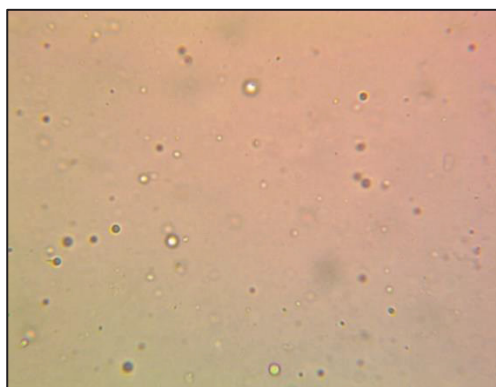
FONTE: O autor, (2019)

#### 4.5.2 Análise por microscopia óptica

Os niossomas foram analisados por microscopia e os resultados são apresentados nas Figuras 12 a 15. Pelas imagens obtidas por microscopia óptica pode se observar que os niossomas controle (Figura 12) mostraram-se esféricos e bem dispersos enquanto os niossomas contendo o extrato (Figura 13) encontram-se

aglomerados. A aglomeração pode ter ocorrido devido a presença de cargas na estrutura devido a incorporação do extrato. No entanto, quando se observa as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 14) e por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 15) os niossomas contendo extrato de amora não se mostraram aglomerados.

FIGURA 12 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓPTICA DOS NIOSSOMAS CONTROLE PRODUZIDOS.



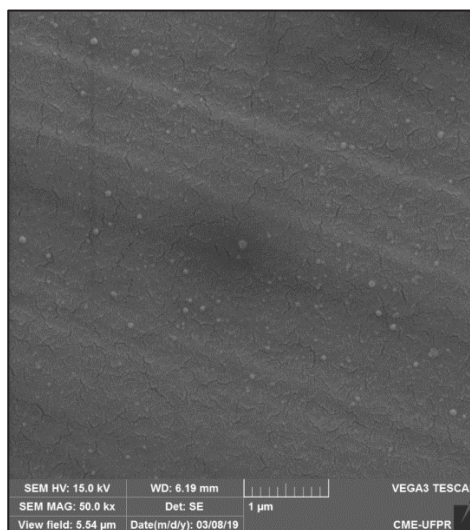
FONTE: O autor, (2019).

FIGURA 13 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓPTICA DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA-PRETA PRODUZIDOS.



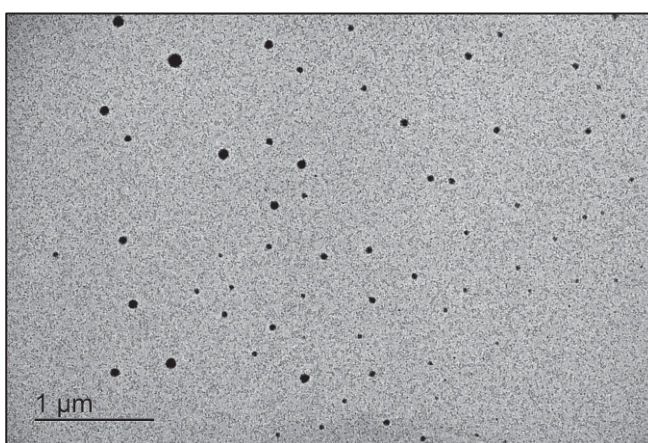
FONTE: O autor, (2019).

FIGURA 14 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA PRODUZIDOS.



FONTE: O autor, (2019)

FIGURA 15 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA PRODUZIDOS



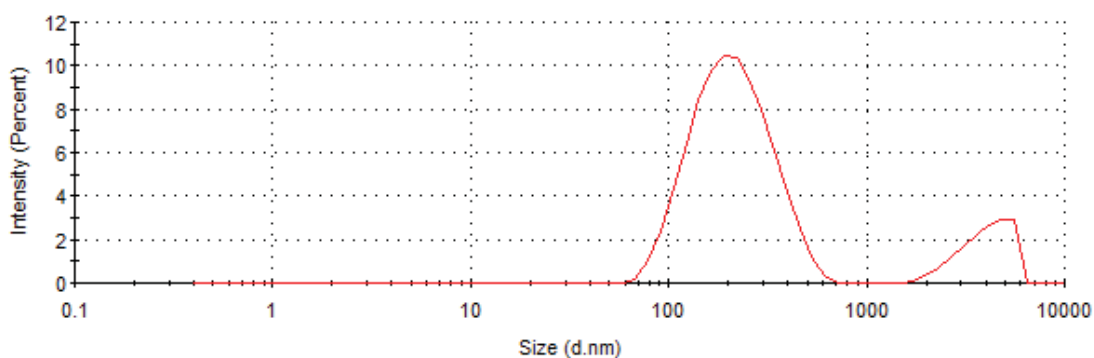
FONTE: O autor, (2019)

#### 4.5.3 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta

Os niossomas controle (Figura 16) apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 220 nm, com índice de polidispersão igual a 0,453. Portanto, o sistema mostrou-se polidisperso quanto ao tamanho, niossomas com diâmetros diferentes. Uma parte, a predominante, apresentou diâmetro médio de 224 nm, enquanto outra parte, em menor quantidade, apresentou diâmetro médio de 4074 nm.

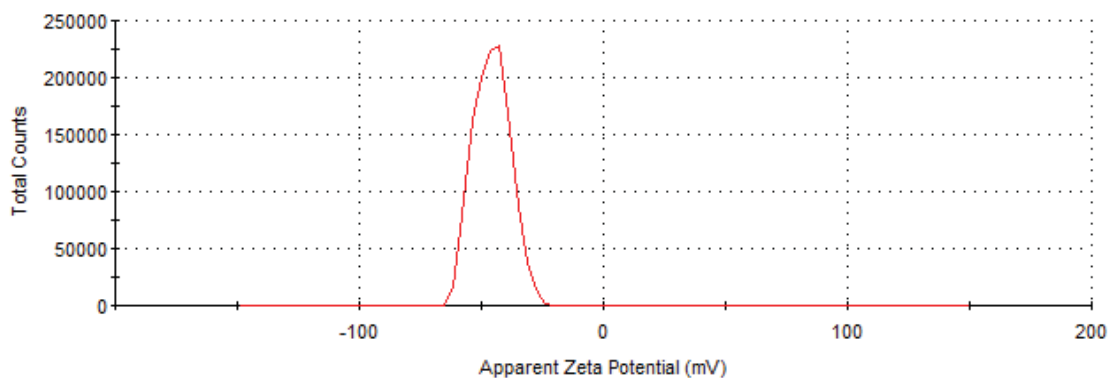
O potencial zeta é uma medida do potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento. Quanto maior o valor obtido, em módulo, maior é a estabilidade da formulação, sendo consideradas estáveis dispersões com valores de potencial zeta superiores a  $|\pm 30 \text{ mV}|$ . O valor de potencial zeta obtido para a dispersão de niossomas controle foi igual a  $-45,7 \text{ mV}$  (Figura 17). Com esse valor, a agregação das vesículas é impedida. (COVIELLO et al., 2015). O valor negativo indica carga negativa na superfície dos niossomas e provavelmente é referente à carga negativa do colesterol. (Kopermsubet al., 2011; Manosroi, Khanrin, Lohcharoenkal, Wener e Götz, 2010; Pham et al., 2012).

FIGURA 16 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DOS NIOSSOMAS CONTROLE OBTIDOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).



FONTE: O autor (2019)

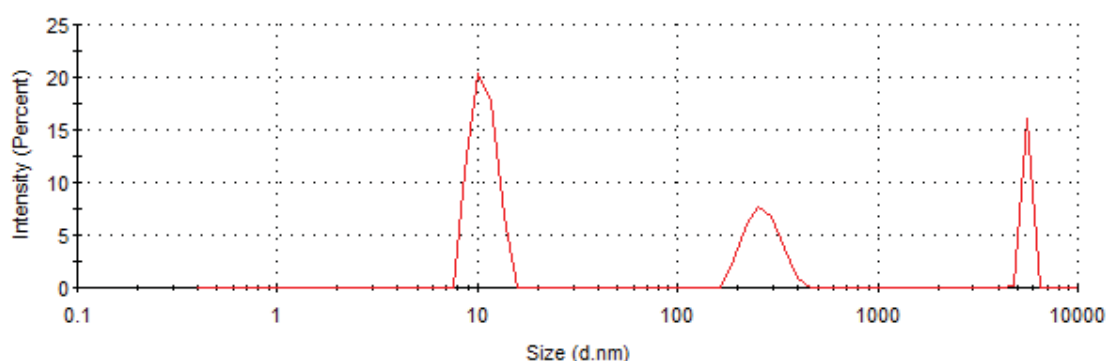
FIGURA 17 – POTENCIAL ZETA DOS NIOSSOMAS CONTROLE OBTIDOS POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA.



FONTE: O autor (2019)

Os niossomas de extrato de amora (Figura 18) apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 578 nm, com índice de polidispersão igual a 0,999. Este valor de índice de polidispersão representa uma dispersão polidispersa. Podem ser vistas três populações distintas com diâmetros médio de 10; 267 e 5553 nm. O valor de 5553 nm pode ser atribuído à agregação dos niossomas, observada na microscopia óptica (Figura 13). Como o extrato de amora-preta possui compostos variados entre eles açúcares, segundo Roy e colaboradores, a presença dessas moléculas na bicamada lipídica faz com que os grupos polares sejam separados e, como resultado, a área lateral é aumentada ou seja, os niossomas aumentam seu diâmetro médio, por isso a diferença de tamanho em relação aos niossomas controle.

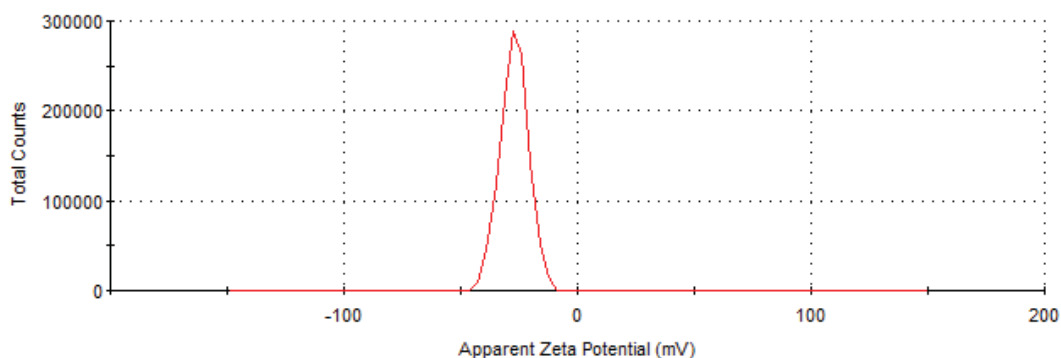
FIGURA 18 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA OBTIDOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).



FONTE: O autor (2019)

O valor de potencial zeta encontrado para a dispersão de niossomas contendo extrato cetônico foi igual a -27,1 mV (Figura 19). Apesar da agregação observada na microscopia óptica (Figura 13), o valor de potencial zeta obtido encontra-se próximo do valor que representa estabilidade, fornecendo repulsão eletrostática suficiente para evitar a agregação das vesículas.

FIGURA 19 – POTENCIAL ZETA DOS NIOSSOMAS DE EXTRATO DE AMORA OBTIDOS POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA.

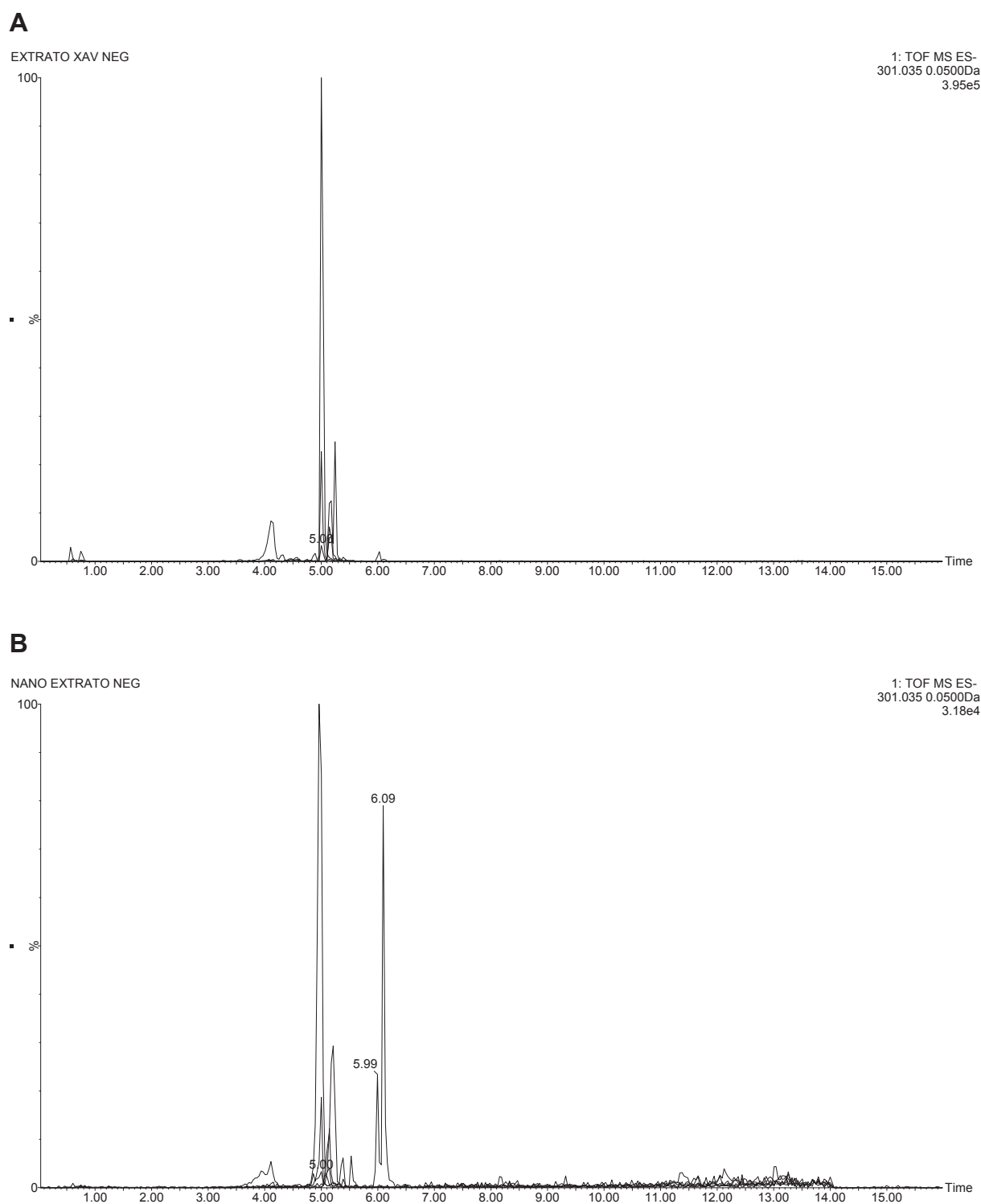


FONTE: O autor (2019)

#### 4.5.4 Identificação e confirmação da presença de compostos fenólicos nos niossomas

O extrato cetônico da amora-preta cultivar Xavantes e os niossomas contendo o extrato foram analisados por CLUE-QTOF-EM. Para a comprovação da incorporação do extrato nos niossomas monitorou-se a presença do flavonoide quercetina no espectro dos niossomas contendo extrato incorporado, tendo em vista que este flavonoide tinha sido previamente identificado no extrato que foi utilizado para a incorporação. Como pode ser observado na Figura 20, na análise dos niossomas foram identificados compostos fenólicos majoritários como por exemplo, a  $m/z$  301,035 referente a quercetina.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS DA QUERCETINA NO EXTRATO CETÔNICO DA AMORA-PRETA CULTIVAR XAVANTE (A) E DOS NIOSSOMAS (B).



FONTE: O autor, 2019

#### 4.5.5 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação dos niossomas representa a capacidade dessas vesículas em carregar ativos. Esta capacidade é dependente principalmente do tipo de surfactante utilizado, do método de obtenção e da presença de outros agentes usados na formulação, como o colesterol neste caso. Relata-se que a taxa de eficiência de encapsulamento para o método de hidratação de filme lipídico é normalmente encontrada na faixa de 10% ~ 40%. (DAN, 2017).

O cálculo da eficiência da encapsulação foi realizado através da quantificação de compostos fenólicos totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu. Foram determinados os fenóis totais na porção do extrato antes do processo de encapsulação nos niossomas e o teor de fenóis totais no sobrenadante, cuja diferença indica o quanto de extrato foi encapsulado. No sobrenadante encontrou-se 76,4% de compostos fenólicos totais. Considerando que o teor de fenol total no extrato é de 100%, pode-se concluir que a eficiência de encapsulação foi de 23,6%.

Quando quantificado o teor de fenóis totais incorporado, direto nos niossomas, o teor encontrado foi de 24,9%, valor este coerente com o encontrado pela quantificação indireta. Esses valores estão dentro da faixa normalmente encontrada para eficiência de encapsulação em vesículas obtidas pela técnica de hidratação de filme lipídico.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos indicam que o extrato acetona/água (70/30), de amora-preta cultivar Xavante apresentou maior teor de compostos fenólicos totais e também maior atividade antioxidante que provavelmente esteja relacionada ao teor de compostos fenólicos. A análise do extrato desta cultivar por espectrometria de massas possibilitou também a identificação de 45 compostos.

Embora a cultivar Tupy tenha apresentado o maior rendimento nas extrações com os diferentes extratores, foi a cultivar Xavante a que apresentou maior composição qualitativa, compostos diferentes extraídos. Uma possível explicação para o maior rendimento em compostos fenólicos nos frutos da cultivar Xavantes é o fato desta cultivar não possuir espinho em suas hastes, e cultivares sem espinho em geral produzem um maior número de compostos oriundos do metabolismo secundário,

resultando em uma maior atividade antioxidante e maior quantidade de compostos fenólicos totais. O ensaio de citotoxicidade em fibroblastos 3T3 mostrou que extratos na concentração de até 300 µg/ml, não mostraram toxicidade, porém novos ensaios com concentrações maiores devem ser realizados.

Os extratos cetônicos da cultivar Xavantes foi também o que apresentou maior atividade antioxidante, porém o seu potencial antioxidante foi inferior ao do BHT isto pode ser explicado pelo fato deste ser uma substância pura. Considerando que a utilização de substâncias sintéticas como o BHT, já estão proibidos na Europa e Estados Unidos e no Brasil seu uso tem restrições, a substituição de antioxidantes sintéticos por produtos naturais, pode ser uma alternativa promissora na produção de produtos cosméticos, alimentícios entre outros visando melhor qualidade e produtos mais seguros para a saúde.

De acordo com os resultados de atividade antioxidante, composição de fenóis totais e de citotoxicidade a cultivar Xavante é a que apresenta o maior potencial para ser utilizado com um ativo cosmético. Este foi o fator que motivou a sua escolha de seu extrato para se realizar a encapsulação em niossomas. Considerando que ativos naturais são em geral instáveis, podendo sofrer reações que levam à diminuição ou perda das suas propriedades e até mesmo a sua degradação, a encapsulação por meio de sistemas vesiculares é uma alternativa atraente e relativamente barata que pode contornar esses problemas. Os niossomas que foram produzidos com o extrato cetônico da fruta amora-preta da cultivar xavante, mostrou um bom desempenho e boa eficiência de encapsulação, coerente com o esperado para este tipo de niossomas, que as vesículas formadas apresentaram estabilidade. Isto indica que este tipo de niossomas podem ser considerados um sistema promissor de administração de ativos com potencial para melhorar a absorção na pele. Deve se considerar também o potencial do efeito antioxidantes dos polifenóis, que tem ação antienvhecimento e protetor contra radiação UV.

Neste contexto, sugere-se, para trabalhos futuros, a realização de estudos de estabilidade, segurança e eficácia dos niossomas de extrato de amora-preta cultivar Xavante para incorporação em uma formulação cosmética.

## REFERÊNCIAS

- ABAE, A.; MADADLOU, A. Niosome-loaded cold-set whey protein hydrogels. **FOOD CHEMISTRY**, v. 196, p. 106–113, 2016.
- AFAQ, F. et al. Delphinidin , an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables , Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 222–232, 2007.
- AN, B.-J. et al. Inhibition of Enzyme Activities and the Antiwrinkle Effect of Polyphenol Isolated from the Persimmon Leaf ( *Diospyros kaki folium* ) on Human Skin. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 848–854, 2005.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTUNES, L. E. C. Amora-Preta: Nova Opção De Cultivo No Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 151–158, 2002.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 100–111, 2014.
- ANTUNES, L. E. C.; RASSEIRA, M. DO C. B. Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta. **Embrapa clima temperado Documento 122**, p. 1–51, 2004.
- ARCT, J.; PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 4, p. 347–357, 2008.
- ATALA, E. et al. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts : An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 331–335, 2009.
- BHATIA, S. K.; YETTER, A. B. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biol Toxicol**, v. 24, p. 315–319, 2008.
- BOEING, J. S. et al. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 48, 2014.
- BOTELHO, R. V. et al. Fenologia e produção da amoreira-preta sem espinhos cv. Xavante na região de Guarapuava-PR. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 3, p. 209–214, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, p. 25–30, 1995.
- BUONOCORE, D. et al. Resveratrol-procyanidin blend: Nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebo-controlled, double-blind study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 5, p. 159–165, 2012.

CASTRO, M. D. L. DE. Soxhlet extraction : Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

CAVINATO, M. et al. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, p. 499–516, 2017.

CAVINATO, M.; JANSEN-DÜRR, P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. **Experimental Gerontology**, v. 94, p. 78–82, 2017.

CEFALI, L. C. et al. In vitro antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, n. May, p. 539–544, 2018.

CHAVES, V. C. et al. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4331–4338, 2018.

CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Ultrasonics Sonochemistry Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

COVIELLO, T. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Gel-embedded niosomes: Preparation, characterization and release studies of a new system for topical drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 291–299, 2015.

DAI, J. et al. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 837–847, 2009.

DAN, N. Core-shell drug carriers: liposomes, polymersomes, and niosomes. In: **Nanostructures for Drug Delivery**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 63–105.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DING, M. et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17359–17368, 2006.

DIVYA, S. P. et al. Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF- $\kappa$ B signaling pathways in SKH-1 mice skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 1–8, 2015.

DRAELOS, Z. D. Aging skin : The role of diet : Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 6, p. 701–706, 2013.

DU, X.; FINN, C. E.; QIAN, M. C. Volatile composition and odour-activity value of thornless ' Black Diamond ' and ' Marion ' blackberries. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1127–1134, 2010.

DUMONT, Y. et al. Protective Action of Resveratrol in Human Skin : Possible Involvement of Specific Receptor Binding Sites. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2010.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivar de amoreira-preta: BRS Xingu**. Pelotas, 2015. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/135115/1/BRS-Xingu-21-x-21.pdf>>

FENG, C. et al. Antioxidant capacities and anthocyanin characteristics of the black-red wild berries obtained in Northeast China. **Food Chemistry**, v. 204, p. 150–158, 2016.

FIGUEIRA, I. et al. Blood–brain barrier transport and neuroprotective potential of blackberry-digested polyphenols: an in vitro study. **European Journal of Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–18, 2017.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.

FREITAS, D. et al. Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL- EM. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 204–230, 2016.

GARZÓN, G. A.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). **Journal of Food Science**, v. 74, n. 3, 2009.

GASPEROTTI, M. et al. Profiling and accurate quantification of *Rubus* ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct uplc-q-tof hdmms and hplc-dad analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4602–4616, 2010.

GE, X. et al. Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles ( Niosomes ) and Their Application in Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, 2019.

GIAMPIERI, F. et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7798–7816, 2014.

GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative Stress and Living Cells. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131–152, 1995.

GONÇALVES, A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant / Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

GONÇALVES, M. M. et al. Preparation of Ellagic Acid-Loaded Vesicles and Method Validation to Quantify Encapsulation Efficiency. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF**

**PHARMACY**, v. 37, n. 5, p. 3853, 2018.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles , Nanospheres and Nanocapsules , for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HAGER, T. J. et al. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 661–669, 2008.

HASSIMOTTO, N. M. A.; PINTO, M. D. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11727–11733, 2008.

HATAHET, T. et al. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 41–53, 2016.

HIDALGO, G.-I.; ALMAJANO, M. P. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. **ANTIOXIDANTS**, v. 6, n. 1, 2017.

HOUGEIR, F. G.; KIRCIK, L. A review of delivery systems in cosmetics. **Dermatologic Surgery**, v. 25, n. 1, p. 234–237, 2012.

HUSSAIN, I. et al. Phenology of “Tupy” and “Xavante” blackberries grown in a subtropical area. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 78–83, 2016.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp). **Ciências agrárias**, v. 32, n. 1, p. 245–260, 2011.

JIAO, H.; WANG, S. Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5672–5676, 2000.

JOSHAN, D.; SINGH, S. Investigational study of *Juglans regia* extract and quercetin against photoaging. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 3, n. 4, p. 193–200, 2013.

KAMBLE, B.; TALREJA, S.; PATHAK, D. Development and biological evaluation of *Gymnema sylvestre* extract-loaded nonionic surfactant-based niosomes. **Nanomedicine**, v. 8, 2012.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16–29, 2015.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N.; CHAIKUL, P. Jasmine rice panicle: A safe and efficient natural ingredient for skin aging treatments. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, n. July, p. 607–616, 2016.

KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The Blackberry Fruit : A Review on Its Composition and Chemistry , Metabolism and Bioavailability , and Health Benefits.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5716–5727, 2012.

LEPHART, E. D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 31, p. 36–54, 2016.

LI, Z. H. et al. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 805–810, 2016.

LIANDA, R. L. . et al. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 618–627, 2012.

LILIAN, L. et al. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, 2004.

LORDÉLO, M. S. C. et al. Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

MA, X. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 102–107, 2011.

MAATTA, K.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, A. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries with Diode Array and Electro spray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection: Ribes Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6736–6744, 2003.

MAGALHÃES, M. D.; MACIEL, Á. D.; ORSOLIN, P. C. Efeito anticarcinogênico dos flavonoides do tipo antocianina presentes em amora-preta (*Rubus* spp.), identificado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (wts) em *Drosophila melanogaster*. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 6, p. 5–14, 2017.

MAHOMOODALLY, M. F.; RAMJUTTUN, P. A quantitative ethnobotanical survey of phytocosmetics used in the tropical island of Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 45–59, 2016.

MANOSROI, A. et al. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 30, p. 129–138, 2003.

MARQUINA, M. A. et al. Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). **Fitoterapia**, v. 73, n. 7–8, p. 727–729, 2002.

MERTZ, C. et al. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electro spray ion trap mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8616–8624, 2007b.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875–910,

2012.

MULLEN, W. et al. Use of accurate mass full scan mass spectrometry for the analysis of anthocyanins in berries and berry-fed tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3910–3915, 2010.

NEMOTO, S. et al. Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 19, p. 7311–7318, 2000.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787–790, 2000.

ONG, E.; WOO, S.; YONG, Y. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v. 313, p. 57–64, 2000.

ÖZCAN, A.; ÖZCAN, A. S. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. **Talanta**, v. 64, p. 491–495, 2004.

PAGOT, E. et al. Cultivo da Amora-preta. **Circular Técnica Embrapa**, v. 75, 2007.

PANTELIDIS, G. E. et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777–783, 2007.

PEREIRA, I. S. et al. **Informações técnicas de cultivares de amoreira-preta**. Pelotas-RS. Embrapa Clima Temperado, , 2014.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit & Viticulture**, v. 4, n. 1–2, p. 33–69, 6 jan. 1997.

RASEIRA, M. DO C. B.; FRANZON, R. C. Melhoramento genético e cultivares de amora-preta e mirtilo. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 11–20, 2012.

RATZ-LYKO, A. et al. Influence of Polyphenols on the Physiological Processes in the Skin. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 509–517, 2015.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: **Assay Guidance Manua**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. p. 1–31.

ROMERO, F. J. et al. Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 5, p. 1229–1234, 1998.

SARIBURUN, E. et al. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. 328–335, 2010.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427–443, 2007.

SCHAKER, P. D. C.; ANTONIOLLI, L. R. Aspectos econômicos e tecnológicos em pós-colheita de amoras-pretas (*Rubus* spp). **Revista Brasileira Agrociência**, v. 15, n. 1–4, p. 11–15, 2009.

SEERAM, N. P. et al. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 362–369, 2001.

SEERAM, N. P. et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9329–9339, 2006.

SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Inhibition of Lipid Peroxidation and Structure – Activity-Related Studies of the Dietary Constituents Anthocyanins , Anthocyanidins , and Catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5308–5312, 2002.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2432–2438, 2002.

SERRAINO, I. et al. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life Sciences**, v. 73, p. 1097–1114, 2003.

SHI, J. et al. Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods — Engineering and Technology. **Food Reviews International**, v. 21, n. 1, p. 139–166, 2007.

SIES, H. Polyphenols and health: Update and perspectives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 2–5, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIRIWOHARN, T. et al. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8021–8030, 2004.

SOBIEPANEK, A.; BOBECKA-WESO, K.; KOBIELA, T. The effect of delphinidin on the mechanical properties of keratinocytes exposed to UVB radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 264–270, 2016.

TATE, P. et al. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100. **Nutrition Research**, v. 26, n. 2, p. 100–104, 2006.

TAVARES, L. et al. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1443–1452, 2012.

THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, 2009.

TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical Dermatology**, v. 26, p. 573–577, 2001.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85–99, 2004.

TUMBAS ŠAPONJAC, V. et al. Anthocyanin profiles and biological properties of caneberry (*Rubus* spp.) press residues. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2393–2400, 2014.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227–236, 2001.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, p. 161–169, 2008.

VIZZOTTO, M. et al. Teor De Compostos Fenólicos E Atividade Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 853–858, 2012.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209–1214, 2011.

VOLK, G. M. et al. The ASHS outstanding fruit cultivar award: A 25-year retrospective. **HortScience**, v. 48, n. 1, p. 4–12, 2013.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140–146, 2000.

WOLFENDER, J.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 299–316, 1998.

WU, X.; GUY, R. H. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 19, n. 6, p. 371–384, 2009.

YONG, Y.; KWOKI, N.; YANG, S. Short Communication Characterization of flavonoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 629, p. 389–393, 1993.

**ANEXO I – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CLUE-QTOF-EM EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.**

(CONTINUA)

Nº	COMPOSTOS	MASSA TEÓRICA	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	TR	TUPY ETOH/H <sub>2</sub> O	GUARANI ETOH/H <sub>2</sub> O	XAVANTE ETOH/H <sub>2</sub> O
1	Ácido cítrico	192,0270	191,0192	111,0123/85,0325/173,0319	0,7	191,0196	191,0192	191,0198
2	Ácido clorogênico	354,095	353,0822	179,0387/235,9320/191,0406 146,9504	4,5	-	-	353,0845
3	Ácido cumárico	164,0473	163,0395	145,0307/119,0469	4,6	-	163,0391	163,0401
4	Ácido hidroxibenzoico	138,0317	137,0239	139,0358/121,0268	5,7	-	137,0240	-
5	Ácido málico	134,0215	133,0137	71,0139	0,7	133,0140	133,0138	133,0141
6	Ácido protocateuico	154,0266	153,0188	109,0293	5,4	-	153,0189	153,0186
7	Ácido quínico	192,0634	191,0556	85,0295/111,0087/173,0078	0,7	191,0554	191,0551	191,0559
8	Cateoil hexosídeo	342,0951	341,0873	191,0553/163,0380/135,0433	4,6	-	-	341,0876
9	Casuarinina Elagitanino hexosídeo	936,0869	935,0791	467,035 [M-2H] 633,0681/300,9974	5,2 4	935,0790	-	935,0791
10	Catequina*	290,079	289,0712	109,0288/123,0446	4,3	289,0708	289,0711	289,0711
11	Ácido dicafeoilquínico	516,1268	515,1190	353,0937/173,0491/135,0456	8,1	515,1212	515,1199	515,1217
12	Didromiricetina	320,0532	319,0454	193,1400	5,0	-	319,0448	319,0464
13	Didromiricetina ramnosídeo	466,1111	465,1033	125,0239/109,0291	4,7	465,1032	465,1031	465,1023
14	Ácido elálgico*	302,0062	300,9984	145,0380/200,0233/117,0411	4,7	300,9976	300,9978	300,9981
15	Epicatequina*	290,079	289,0712	123,0445/109,0290/97,0284	4,6	289,0709	289,0708	289,0710
16	Ácido ferúlico	194,0579	193,0501	134,0369/149,0612	-	-	193,0503	-

**ANEXO I – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CLUE-QTOF-EM EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.**

(CONCLUSÃO)

Nº	COMPOSTOS	MASSA TEÓRICA	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	TR	TUPY ETOH/H <sub>2</sub> O	GUARANI ETOH/H <sub>2</sub> O	XAVANTE ETOH/H <sub>2</sub> O
17	Kaempferol*	286,0477	285,0399	93,0399/117,0416/143,0568	6,6	285,0395	285,0409	285,0389
18	Kaempferol hexosil deoxihexosil	594,1585	593,1506	447,0910/285,0387	5,5	593,1497	593,1501	593,1496
19	Kaempferol acetilhexosideo	490,1111	489,1033	285,0393	5,9	489,1027	489,1016	489,1028
20	Kaempferol glucuronídeo	448,1006	447,0928	285,0396	4,6	447,0925	447,0921	447,0923
21	Lambertianina C	2804,2293	933,7311	633,075/300,1000	5,14	-	-	-
22	Luteolina hexosideo	462,0798	461,0720	285,0388	5,6	461,0713	461,0714	461,0719
23	Quercetina pentosideo	434,0849	433,0771	301,0332/151,0026	5,8	433,0776	433,0773	433,0763
24	Quercetina glucuronídeo	478,0747	477,0669	301,0347	5,4	477,0661	477,0662	477,0661
25	Quercetina malonil glicosídeo	550,0959	549,0880	300,0267/271,0240	5,5-5,7	-	549,0886	549,0867
26	Quercetina hexose acetato	506,1060	505,0982	447,0926/301,0332/151,0031	5,7	-	505,0979	505,0970
27	Quercetina*	302,0426	301,0348	271,0250	5,6	301,0339	301,0341	301,0348
28	Quercetina hexosideo	464,0955	463,0877	300,0382/271,0332/255,0389 151,0091/301,0437/179,0045	4,9	463,0881	463,0874	463,0872
29	Hexosyl-deoxyhexosyl quercetina	610,1533	609,1455	300,0454/301,0524/271,0410	4,7	609,1451	609,1444	609,1454
30	Sanguina H-6	1870,1581	934,0712	934,0645/633,0714/300,9970	5,2	-	-	-
31	Ácido Siríngico	198,0528	197,0450	153,0552	5,4	-	197,0450	197,0447

**ANEXO 2 – PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMORA-PRETA NAS CULTIVARES TUPY, GUARANI E XAVANTE POR CLUE-QTOF-EM EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO.**

Nº	COMPOSTOS	MASSA TEÓRICA	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	TR	TUPY ETOH/H <sub>2</sub> O	GUARANI ETOH/H <sub>2</sub> O	XAVANTE ETOH/H <sub>2</sub> O
32	Ácido cafeico	180,0423	181,0501	135,0444/163,0375	0,8	-	181,0497	181,0500
33	Cianidina hexosídeo	449,1084	449,1084	287,0543	4,7	449,1086	449,1091	449,1079
34	Cianidina malonil hexosídeo	535,1088	535,1088	449,1082/287,0547	5,4	535,1075	535,1078	535,1071
35	Cianidina hexosil deoxihexosil	595,1663	595,1663	287,0555/449,1082	5	595,1657	595,1655	595,1648
36	Cianidina	287,0556	287,0556	-	4,7	287,0551	287,0555	287,0541
37	Cianidina dihexosídeo	611,1612	611,1612	287,0545	5,4	611,1605	611,1602	611,1600
38	Cianidina dihexosídeo	611,1612	611,1612	287,0551	5,2	611,15	611,1602	611,15
39	Cianidina hexosil deoxihexosil hexosídeo	757,2191	757,2191	287,0551	5,13	757,2169	757,2167	-
40	Delfinidina	303,0499	303,0499	229,0493/153,0183	5,7	303,0497	303,0497	303,0495
41	Delfinidina pentosídeo hexosil deoxihexosil	611,1612	611,1612	303,0499	5,9	611,1604	611,1598	611,1595
42	Delfinidina Pentosídeo	435,0927	435,0927	303,0496	6,3	-	-	435,0918
43	Delfinidina Hexosídeo	465,1033	465,1033	303,0502	6,05	465,1025	465,1024	465,1026
44	Ácido elágico Pentosídeo	434,0485	435,0563	303,0117	5,15	435,0560	435,0544	435,0555
45	Hidroxicumarina	162,0316	163,0394	133,0287/135,0439/105,0341	7,6	163,0393	163,0400	163,0399
46	Pelargonidina dihexosídeo	433,1135	433,1135	271,0610	0,8	-	181,0497	181,0500
47	Procianidina B2	578,1424	579,1502	287,0559/127,0386/163,0390/409,0935	4,7	449,1086	449,1091	449,1079
48	Pirogalol	126,0317	127,0395	85,0296/97,0298	5,4	535,1075	535,1078	535,1071

