

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO O  
EXTRATO DE *Prosopis juliflora* E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E ANTITIROSinASE**

**NATAL - RN  
2023**

**TÁSSYO LEANDRO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO O  
EXTRATO DE *Prosopis juliflora* E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E ANTITIROSinASE**

**Dissertação apresentada à Coordenação  
do Programa de Pós- graduação em  
Ciências Farmacêuticas, como requisito  
para obtenção do título de mestre em  
Ciências Farmacêuticas.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Márcio Ferrari**

**COORIENTADOR: Prof. Dr. Gabriel Azevedo de Brito Damasceno**

**NATAL - RN  
2023**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Silva, Tássyo Leandro da.

Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo o extrato de Prosopis juliflora e avaliação das atividades antioxidante e antitirosinase / Tássyo Leandro da Silva. - 2023.  
111f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2023.

Orientação: Márcio Ferrari.

Coorientação: Gabriel Azevedo de Brito Damasceno.

1. Algaroba - Dissertação. 2. Prosopis juliflora - Dissertação. 3. Antioxidante - Dissertação. 4. Cosméticos - Dissertação. 5. Melanogênese - Dissertação. I. Ferrari, Márcio. II. Damasceno, Gabriel Azevedo de Brito. III. Título.

RN/UF/BSCCS

CDU 615.011

TÁSSYO LEANDRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO O  
EXTRATO  
DE *Prosopis juliflora* E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE  
E ANTITIROSinASE**

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Márcio Ferrari  
Presidente – UFRN

---

Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral  
Examinador Externo – UFBA-IMS

---

Prof. Dra. Stella Maria Andrade Gomes Barreto  
Examinador Externo

Natal, 24 de Novembro de 2023

**NATAL - RN  
2023**

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Leônidas e Maria, e irmão, Talles, por sempre me apoiarem incondicionalmente em todas decisões e etapas que venho percorrendo na minha vida. Além disso, por nunca me deixarem sozinho e serem meus incentivadores para o crescimento pessoal, espiritual e profissional.*

*A minha segunda família, João Pereira (in memoria), Mauzinete, Adalzinete, Ana Beatriz, Adalzineide, Pedro Lucas, João Victor, Jobson, Gláucia, Jadson, Fernanda e Valmira, por estarem ao meu lado e nunca me deixarem sozinho. Eterna gratidão as minhas mães de criação, Mauzinete e Adalzinete, e irmã de criação, Ana Beatriz, por me amarem de uma forma imensurável e serem fontes de inspiração. Da mesma forma aos demais familiares, que de alguma forma torceram por essa tão sonhada conquista. A Dr. Júlio Gregório e família por todo apoio na minha estadia em Natal, que foi primordial para conclusão do meu mestrado.*

*Ao meu orientador, professor Márcio Ferrari, e ao meu coorientador, professor Gabriel Damasceno, por terem acolhido o meu sonho e transformado em realidade. Sei que essa trajetória não foi simples, contudo gerou grandes aprendizados e amizades.*

*Aos meus queridos amigos, que foram ótimos ouvintes das minhas reclamações, angústias, medos, receios, surtos, surtos novamente (só porque foram vários! Kkkkk...) e bastante felicidade ao longo do meu mestrado. Em especial aos meus amigos de infância, da graduação e do Hospital Estadual Telecila Freitas Fontes (HETFF). Foi desafiador conciliar meu trabalho e as inúmeras demandas do mestrado, porém diversos anjos (Diretores, gerentes, coordenadores, farmacêuticos, biomédicos e auxiliares) entraram na minha vida e fizeram esse fardo mais leve. Minha eterna gratidão!*

*Aos amigos do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cosméticos, por estarem sempre em prontidão para ajudar nos testes e experimentos, que nortearam e fizeram da minha dissertação esse belíssimo trabalho. Entrei no mestrado durante o período pandêmico da COVID 19, se não fosse pela total ajuda que recebi, os meus resultados não teriam sido gerados. Agradeço ao amigo André por ter me ajudado bastante na fase inicial dos testes antioxidante.*

*Aos demais laboratórios, professores responsáveis, ICs e pós-graduandos que*

*facilitaram a utilização dos equipamentos sem nenhuma barreira para geração dos resultados.*

*À técnica de laboratório, Nara, por sempre me ajudar e por se tornar uma grande amiga. Muito obrigado por tentar diminuir as minhas angústias e sempre me incentivar para chegar a tão sonhada conquista de Mestre em Ciências Farmacêuticas.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste Mestrado.*

*A CAPES pelo aporte financeiro no tocante a bolsa de estudos de mestrado durante 10 meses que colaborou na execução desse projeto.*

## RESUMO

A rica biodiversidade das espécies vegetais no Brasil impulsiona estudos com plantas para o desenvolvimento de produtos contendo compostos naturais. *Prosopis juliflora*, conhecida popularmente como algaroba, é uma planta trazida do Peru, disseminada no Bioma Caatinga onde tornou-se espécie invasora. Estudos relatam que a algaroba apresenta ações antimicrobiana, antioxidante, antimalária, antitumoral, dentre outras. Tais atividades estão relacionadas à presença de metabólitos secundários como os alcaloides, terpenóides, taninos e flavonoides, presentes em diferentes partes dessa planta. Alguns destes metabólitos podem ser utilizados pela indústria cosmética como bioativos para aplicação em diferentes atividades. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar as atividades antioxidante e antitirosinase do extrato dos frutos de *P. juliflora* e desenvolver formulações cosméticas contendo o extrato com o intuito de harmonização da coloração da pele. Para tanto, o extrato obtido por metodologias previamente padronizadas, foi avaliado quanto a concentração de compostos fenólicos ( $0,21 \pm 0,01$  mg EAG/g) e flavonoides totais ( $1,71 \pm 0,26$  µg EQ/mg). Além disso, o extrato foi caracterizado por meio de LC-MS-TOF. A segurança *in vitro* do extrato foi avaliada por meio de testes de citotoxicidade celular (3T3 e B16F10). O extrato de *P. juliflora* não apresentou efeitos citotóxicos frente essas linhagens. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada por diferentes metodologias atuando em diferentes fases da cascata oxidativa, iniciação e propagação. A ação antitirosinase do extrato foi avaliada por metodologia enzimática e o extrato apresentou atividade de inibição de  $62,48\% \pm 2,09$  na concentração de 30,00 mg/mL. Formulações com *Dissodium EDTA*, *Phenoxyethanol* (and) *Ethylhexyl Glycerin*, *Distilled Water*, *Sodium Acrylates Copolymer Lecithin*, *Polyacrylamide* (and) *C13-14 Isoparaffin* (and) *Laureth-7* e 3,00% do extrato de *P. juliflora* foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar e acelerada. As formulações apresentaram-se estáveis por um período de 60 dias. Esta pesquisa contribuiu cientificamente demonstrando a utilização de uma planta da Caatinga, como bioativo para aplicação multifuncionais em produtos cosméticos, com a atividade antioxidante e para harmonização da coloração da pele. Assim, contribuirá para agregar valor à cadeia produtiva de *P. juliflora*, visando valorizar aspectos de responsabilidades ambiental, social e da biodiversidade brasileira.

**Palavras-chaves:** Algaroba; *Prosopis juliflora*; Antioxidante; Cosméticos; Melanogênese.

## ABSTRACT

The rich biodiversity of plant species in Brazil enables studies for the development of products containing natural compounds. *Prosopis juliflora*, popularly known as mesquite, is a plant brought from Peru, widespread in the Brazilian Caatinga where it has become an invasive species. Studies report antimicrobial, antioxidant, antimalarial, and antitumor actions among others. Such activities are related to the presence of secondary metabolites such as alkaloids, terpenoids, tannins and flavonoids, present in different parts of this plant. Some of these metabolites can be used by the cosmetic industry as active ingredients for application in different activities. Therefore, this work aimed to evaluate the antioxidant and antityrosinase activity of *P. juliflora* fruit extract and develop cosmetic formulations containing this extract with the aim of harmonizing skin color. To this end, the extract obtained using previously standardized methodologies was evaluated for the concentration of phenolic compounds ( $0.21 \pm 0.01$  mg EAG/g) and total flavonoids ( $1.71 \pm 0.26$   $\mu$ g EQ/mg). Furthermore, the extract under study was characterized using LC-MS-TOF. The in vitro safety of the extract was evaluated using cellular cytotoxicity tests and the samples did not show cytotoxic effects. The in vitro antioxidant activity was evaluated using different methodologies and demonstrated the ability to block the oxidation cascade in the initiation and propagation phases. The antityrosinase action was evaluated using enzymatic methodology and the extract showed an inhibition activity of  $62.48 \pm 2.09$  at a concentration of 30.00 mg/mL. Formulations with Disodium EDTA, Phenoxyethanol (and) Ethylhexyl Glycerin, Distilled Water, Sodium Acrylates Copolymer Lecithin, Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 and 3.00% of the studied plant extract were subjected to preliminary and accelerated stability tests. The formulations were stable in accelerated stability tests after a period of 60 days. This research, in addition to contributing scientifically by demonstrating the use of a Caatinga plant in antioxidant cosmetic products and for homogenizing skin color, will also contribute to adding value to the *P. juliflora* production chain, giving value to aspects of Brazilian environmental, social and biodiversity responsibilities.

**Keywords:** Mesquite; *Prosopis juliflora*; Antioxidant; Cosmetics; Melanogenesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	<i>Prosopis juliflora</i> (SW) D.C na Caatinga do Rio Grande do Norte.	19
<b>Figura 2</b>	A pele e suas camadas principais.	23
<b>Figura 3</b>	Cascata de reações da melanogênese.	26
<b>Figura 4</b>	Extrato liofilizado de <i>Prosopis juliflora</i> .	51
<b>Figura 5</b>	Viabilidade celular em linhagens 3T3 e B16-F10 do extrato de <i>Prosopis juliflora</i> .	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Gradiente de eluição do método cromatográfico utilizado para caracterização do extrato.	41
<b>Tabela 2</b>	Matérias-primas selecionadas para a obtenção das emulsões, nomes comerciais e respectivas funções.	46
<b>Tabela 3</b>	Composição das emulsões com extrato de <i>Prosopis juliflora</i> .	48
<b>Tabela 4</b>	Compostos identificados por LC-MS-TOF no modo positivo.	54
<b>Tabela 5</b>	Compostos identificados por LC-MS-TOF no modo negativo.	55
<b>Tabela 6</b>	Atividade antioxidante de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) pelo extrato de <i>Prosopis juliflora</i> .	59
<b>Tabela 7</b>	Resultado da determinação de poder redutor do extrato liofilizado das sementes e vagens de <i>Prosopis juliflora</i>	61
<b>Tabela 8</b>	Atividade antioxidante de quelação de cobre e ferro pelo extrato de <i>Prosopis juliflora</i> .	62
<b>Tabela 9</b>	Atividade antioxidante de sequestro de radicais superóxidos (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) pela amostra de <i>Prosopis juliflora</i> .	63
<b>Tabela 10</b>	Atividade antitirozinase dos extratos filtrados e liofilizados de <i>Prosopis juliflora</i> .	65
<b>Tabela 11</b>	Avaliação macroscópica das formulações após 24h de obtenção e do teste de centrifugação.	67
<b>Tabela 12</b>	Resultados do estudo de estabilidade preliminar das emulsões contendo (F1 e F2) 3% de extrato de <i>Prosopis juliflora</i> quanto ao valor de pH e a viscosidade mínima aparente.	68
<b>Tabela 13</b>	Resultados do estudo de estabilidade acelerada das formulações com 3% de extrato de <i>Prosopis juliflora</i> submetidas em diferentes condições de temperatura.	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ABIHPEC	Associação brasileira da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
Anvisa	Agência de nacional de vigilância sanitária
A/O	Água em óleo
B16F10	Linhagem de células de melanomas
CAT	Capacidade antioxidante total
CATEC	Câmara técnica de cosméticos
Cu <sup>2+</sup>	Íon cobre
CV	Coeficiente de variação
DMEM	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	Estrato córneo
EC50	Concentração inibitória 50%
EDTA	<i>Disodium</i> EDTA
EEI	Espécies exóticas invasoras
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe <sup>3+</sup>	Íons de ferro
FE	Fator extrínseco
FeCl <sub>2</sub>	Cloreto de ferro (II)
FI	Fator intrínseco
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Radical peróxido de hidrogênio
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteínas de matriz
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-

	2H-tetrazólio)
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol--2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato
NO <sup>·</sup>	Óxido nítrico
NO <sup>-2</sup>	Dióxido de nitrogênio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Oxigênio singlete
O <sub>2</sub> <sup>*-</sup>	Ânion superóxido
O/A	Óleo em água
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxila OH <sup>·</sup>
PC	Proteína carbonila
PJ	<i>Prosopis juliflora</i>
PKA	Constante de ionização
SOD	Superóxido desmutase
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
XTT	(2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida)
9-HODE	Ácido 9-hidroxi-octadecadienóico
α-MSH	Hormônio alfa estimulante dos melanócitos

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	18
2.1	<i>Prosopis juliflora</i> COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS	18
2.2	PELE E MELANOGÊNESE	23
2.2.1	<b>Pele</b>	23
2.2.2	<b>Melanogênese</b>	26
2.3	ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	29
2.4	EMULSÕES	35
3	<b>OBJETIVOS</b>	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
4.1	COLETA DOS ESPÉCIMES VEGETAIS	39
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO	39
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	39
4.3.1	<b>Compostos fenólicos totais</b>	39
4.3.2	<b>Flavonoides totais</b>	40
4.3.3	<b>Caracterização química pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo <i>Time-of-flight</i> (LC-MS-TOF)</b>	40
4.4	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE <i>Prosopis juliflora</i>	41
4.4.1	<b>Avaliação da citotoxicidade celular <i>in vitro</i> dos extratos de <i>Prosopis juliflora</i></b>	41
4.4.2	<b>Cultura de células</b>	41
4.4.3	<b>Avaliação da viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide).</b>	42
4.5	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
4.5.1	<b>Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</b>	42
4.5.2	<b>Capacidade antioxidante total</b>	43

4.5.3	<b>Poder redutor</b>	43
4.5.4	<b>Quelação de íons de cobre (Cu<sup>2+</sup>)</b>	43
4.5.5	<b>Quelação de íons de ferro (Fe<sup>2+</sup>)</b>	44
4.5.6	<b>Sequestro de radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	44
4.6	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTITIRO SINASE DO EXTRATO DE <i>Prosopis juliflora</i>	45
4.7	OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES	46
4.7.1	<b>Estudo das matérias-primas</b>	46
4.7.2	<b>Preparo das emulsões</b>	46
4.7.3	<b>Análise macroscópica das formulações</b>	47
4.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	49
4.8.1	<b>Avaliação da estabilidade preliminar</b>	49
4.8.1.1	Teste de centrifugação	49
4.8.1.2	Estresse térmico	49
4.8.1.2.1	<i>Análise macroscópica</i>	49
4.8.1.2.2	<i>Determinação do valor do pH</i>	49
4.8.1.2.3	<i>Determinação da viscosidade mínima aparente</i>	49
4.8.2	<b>Avaliação da estabilidade acelerada</b>	50
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
5.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO	51
5.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	51
5.2.1	<b>Compostos fenólicos totais e flavonoides totais</b>	51
5.2.2	<b>Caracterização química pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo <i>Time-of-flight</i> (LC-MS-TOF)</b>	52
5.3	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE <i>Prosopis juliflora</i>	57
5.3.1	<b>Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i></b>	57
5.4	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	59
5.4.1	<b>Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</b>	59
5.4.2	<b>Capacidade antioxidante total (CAT)</b>	60

5.4.3	<b>Poder redutor</b>	61
5.4.4	<b>Quelação de íons de cobre (Cu<sup>2+</sup>) e ferro (Fe<sup>2+</sup>)</b>	62
5.4.5	<b>Sequestro de radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	63
5.5	<b>AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTITIROSinase DO EXTRATO DE <i>Prosopis juliflora</i></b>	65
5.5.1	<b>Teste da enzima tirosinase</b>	65
5.6	<b>OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES</b>	67
5.7.1	<b>Testes preliminares de estabilidade</b>	67
5.7.2	<b>Estabilidade acelerada de 60 dias</b>	70
6	<b>CONCLUSÕES</b>	73
	<b>REFERÊNCIAS</b>	74
	<b>APÊNDICE A</b> - Cromatogramas e respectivos espectros de massa das amostras de <i>Prosopis juliflora</i> do modo positivo, referentes ao tópico 5.2.2.	94
	<b>APÊNDICE B</b> - Cromatogramas e respectivos espectros de massa das amostras de <i>Prosopis juliflora</i> do modo negativo, referentes ao tópico 5.2.2.	103

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior mercado consumidor do mundo de produtos cosméticos e o segundo em lançamentos de produtos no mercado global (ABIHPEC, 2023). Seguindo este parâmetro, o mercado consumidor de cosméticos busca por inovações e esse trabalho apresenta importantes contribuições, pois se enquadra dentro das tendências mercadológicas e de pesquisas propostas no âmbito nacional e internacional.

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com o meio ambiente e exigentes em relação as empresas por compreenderem que as questões ambientais deixaram de ser apenas de responsabilidade política e institucional com os órgãos ambientais passando a ser um fator importante no consumo e uma vantagem competitiva mercadológica (LUO; ZHANG; ZHANG, 2021). Além disso, quarenta e um por cento (41%) dos consumidores brasileiros possuem interesse por produtos que contenham compostos de origem natural (ABIHPEC, 2023). Pensando nisso, diversas empresas estão utilizando estratégias de promoção de discussões, anúncios, propagandas, ações e campanhas publicitárias sobre seus produtos serem *eco-friendly*. Por outro lado, este movimento levou a produção de propagandas enganosas acerca da utilização de ingredientes vegetais ou ainda, a minimização dos impactos ambientais, sendo essa prática chamada de *greenwashing* (lavagem verde ou banho verde) (ANDERSEN; HOVRING, 2020; CHEN *et al.*, 2018).

*Prosopis juliflora* é uma espécie que foi introduzida no Brasil e teve uma rápida adaptação ao clima e ao ecossistema da Caatinga. Contudo, fatores como rapidez e facilidade em seu crescimento, propensão em provocar o processo de alelopatia em espécies da agricultura local e também em plantas exóticas, fizeram com que a algaroba se tornasse uma espécie invasora (DE SOUZA NASCIMENTO *et al.*, 2014; QAYYUM *et al.*, 2018). Além de apresentar difícil erradicação, acaba competindo por nutrientes e pela radiação solar uma vez que a copa da algaroba pode diminuir a incidência solar para outras espécies que estejam próximas. Isso pode prejudicar o desenvolvimento de espécies nativas. Nesse sentido, em decorrência ao prejuízo às demais espécies da Caatinga, o uso racional da espécie como matéria-prima para recursos sustentáveis, pode ser indicado como um interessante manejo dessa planta invasora (CASTILLO *et al.*, 2020; FRANCO *et al.*,

2010).

Considerando que os consumidores de produtos cosméticos desejam novidades e que os produtos naturais podem ser amplamente explorados nesse nicho, nesta pesquisa é evidenciado o uso de substâncias naturais focado na ação antioxidante e para harmonizar a coloração e aparência uniforme da pele. A utilização de formulações para minimizar regiões hipercrômicas da pele pode ser impulsionada por razões estéticas, especialmente em pessoas que apresentam condições dermatológicas associadas à hiperpigmentação, por exemplo, no melasma. Há ainda razões sociais, que afetam a autoestima e podem provocar alguns transtornos que dificultam o bem-estar do indivíduo no âmbito psicossocial (DOOLAN; GUPTA, 2021).

O uso de formulações emulsionadas para incorporação de produtos vegetais destinados aplicação na pele tem sido apresentado ao mercado com muita frequência. Isso se deve ao fato que as emulsões se apresentam sensorialmente agradáveis ao toque, são facilmente removidas da pele, têm baixo custo e podem ser desenvolvidas para veicular diferentes ativos (MASSON, 2005; PARK; KIM; KIM, 2021).

Uma vez que há relatos na literatura da presença de metabólitos de interesse cosmético na composição química de *P. juliflora* com potencial aplicação antioxidante e antitirozinase (ALMARAZ-ABARCA *et al.*, 2007; DAMASCENO *et al.*, 2020); que não há até o momento patentes utilizando a espécie em estudo em composições cosméticas com ação em regiões hipercrômicas da pele; que a algaroba é uma espécie presente na Caatinga e esse bioma não é muito explorado na área cosmética; que é crescente a busca por ativos naturais em substituição aos sintéticos; que alterações na harmonização da coloração da pele pode afetar a autoestima e trazer transtorno psicossocial, esta pesquisa objetivou desenvolver formulações cosméticas multifuncionais, com compostos antioxidante e antitirozinase como uma alternativa natural aos ingredientes sintéticos utilizados no mercado para harmonização da coloração da pele e, trazer ao mercado mais uma inovação sustentável. Além disso, está focado na incorporação de insumo natural a partir de uma espécie presente na Caatinga, divulgando as potencialidades desse bioma e, confluindo com o mercado, tendências e inovação.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Prosopis juliflora* COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

As implicações da sustentabilidade e práticas inovadoras para as empresas que buscam soluções para os problemas ambientais tornaram-se desafios do mundo empresarial moderno. As adequações da empresa à legislação ambiental, ao mesmo tempo em que buscam novos produtos e novos processos através da tecnologia, potencializaram a competitividade no mercado e seu dinamismo de atuação (DINI; LANERI, 2021). É neste cenário que atuam as estratégias de algumas indústrias de cosméticos no mercado, por se tratar de um meio dinâmico que exige inovação constante e investimento contínuo no desenvolvimento de novas formulações, capazes de atender os consumidores e desenvolvimento sustentável (GEORGIEV *et al.*, 2018; GOTTARDO *et al.*, 2021).

As plantas têm sido usadas há anos com diversas aplicações cosméticas e a rica biodiversidade de espécies no Brasil favorece o desenvolvimento de formulações com moléculas naturais. Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde, preferindo produtos com matérias-primas naturais em substituição aos sintéticos (KERDUDO *et al.*, 2016).

A composição química complexa das plantas favorece o seu uso para produção de fitocosméticos, pois uma espécie vegetal é capaz de sintetizar diversos biocompostos químicos com múltiplas funções biológicas e fisiológicas por meio do metabolismo vegetal, os quais são classificados em metabólitos primários e secundários (GEILFUS, 2019). Os primários são compostos essenciais para crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais, como as proteínas, os ácidos graxos, os polissacarídeos e a clorofila. Já a presença dos metabólitos secundários nas espécies vegetais dependerá das variáveis ecológicas e, desse modo, essas classes de produtos químicos são as responsáveis por diversas atividades biológicas das espécies e que podem ser utilizados na indústrias farmacêutica e de cosméticos (ISAH, 2019; WINK, 2016).

A espécie *P. juliflora* (Figura 1), pertence à família *Fabaceae* (Leguminosae), subfamília *Mimosoideae* e gênero *Prosopis*, que incluiu 44 espécies (PASIECZNIK *et al.*, 2004). É uma planta oriunda do Peru que se distribuiu pela América do Sul, Central e Norte, Oceania, Ásia e África. No Brasil, é conhecida como algaroba ou algarobeira (DRUMOND; MORGADO, 2004) e é encontrada em regiões

semiáridas do Nordeste (PASIECZNIK *et al.*, 2001) e Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, QUEIROZ, 2023).

**Figura 1.** *Prosopis juliflora* (SW) D.C na Caatinga do Rio Grande do Norte.



**Fonte:** Damasceno *et al.*, 2020.

A algaroba é uma árvore xerófila que em ótimas condições para se desenvolver pode chegar à altura de 18 metros. Foi observada como espécie nativa ou introduzida em 129 países, principalmente nas regiões quentes, áridas e semiáridas do mundo (SHACKLETON *et al.*, 2014). No Brasil, foi introduzida no ano de 1942, na cidade de Serra Talhada em Pernambuco (BURKART, 1976).

As espécies exóticas invasoras (EEI) são todas as categorias de organismos vivos (plantas, mamíferos e insetos) que compreendem os tipos mais comuns em ambientes terrestres (TOBIN, 2018) e amplamente distribuídas em todos os tipos de ecossistemas mundiais. Essas espécies têm a capacidade de se estabelecer, invadir, competir com espécies nativas e assumir o controle do novo ambiente (PYŠEK *et al.*, 2020). Elas acabam afetando todos os tipos de ecossistemas do planeta e são a segunda maior ameaça global à biodiversidade após a destruição do habitat (TOBIN, 2018). As EEI geram impactos sobre as espécies nativas que competem diretamente por recursos, como alimentos e locais de reprodução, indiretamente, alterando o habitat e modificando a hidrologia, ciclagem de nutrientes e outros processos ecossistêmicos. Seus impactos são sobre a biodiversidade nativa

em ecossistemas como terras agrícolas e pastagens, parques nacionais, cursos de água, lagos, rios com enormes consequências econômicas e sociais (LAZZARO *et al.*, 2020; WILGEN *et al.*, 2020).

*Prosopis juliflora* é uma das principais plantas invasoras lenhosas do mundo (ROS *et al.*, 2014). A introdução da algaroba no Brasil teve o objetivo de constituir alternativas econômicas para a região Nordeste e acabou desencadeando grandes impactos sobre a biodiversidade, alterando a estrutura das comunidades e inibindo a regeneração das espécies nativas (ALVAREZ *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Estudos recentes, a exemplo de Howari e colaboradores (2022), realizados na região dos Emirados Árabes e Shiferaw e colaboradores (2021), na região Afar na Etiópia, mostraram que essa planta invasora pode gerar vários problemas em locais diferentes do seu habitat natural, pois sua capacidade de reprodução e regeneração a torna extremamente agressiva, particularmente se associada a alguns facilitadores, como os dispersores e, principalmete, a ação antrópica.

Além disso, a algaroba possui altas concentrações de substâncias químicas alelopáticas e fitotóxicas nas folhas, que provocam efeitos negativos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas nativas. Os principais aleloquímicos presentes em *P. juliflora* foram siringina, lariciresinol, L-triptofano, juliprosopina, juliprosina e juliprosopinal. Entre estes, os derivados de juliprosina apresentaram a alelopatia mais evidente (KAUR; GUPTA; ZHAWAR, 2014; MUTURI *et al.*, 2017).

Apesar dos aspectos negativos associados a espécie, a introdução de *P. juliflora* em vários países gerou diversos benefícios e serviços para as comunidades locais (SHACKLETON *et al.*, 2014). Das 44 espécies do gênero *Prosopis*, pelos menos 19 promoveram ótimos rendimentos econômicos nos locais onde foram introduzidas (CHOGE *et al.*, 2012; PASIECZNIK *et al.*, 2001).

Devido às suas características ecológicas, o cultivo da espécie beneficiou a comunidade e auxiliou na recuperação de áreas com solo degradado e até contaminado com poluentes, especialmente na Índia, além de prover madeira e forragem para os animais (NASCIMENTO, 2008). Dentro de sua área introduzida, esta espécie é usada para alimentação humana, ração animal, medicina popular, madeira e bioenergia (GAYATHRI; UPPULURI, 2022; WAKIE *et al.*, 2016). No Nordeste brasileiro é aproveitada pela população na extração da madeira para produção de estacas e para gerar energia, através da formação de lenha e carvão (FRANCO *et al.*, 2010); na alimentação de animais por meio dos seus frutos

(MUNIZ, 2009); na indústria alimentícia para produção de bolos, sorvetes e pães (BORGES, 2004); potencial de obtenção de biocombustíveis (RODRIGUES *et al.*, 2013) e potencial de uso área cosmética (DAMASCENO *et al.*, 2020). No entanto, a algaroba ao ser consumida em grandes quantidades provocam uma série de efeitos negativos na saúde animal, especificamente ao gado (TABOSA *et al.*, 2000).

A algaroba pode provocar uma condição neurológica e muscular no gado, devido à presença de alcalóides piperidínicos: juliprosopina e juliprosina, os principais constituintes da espécie (TABOSA *et al.*, 2000). Além disso, alterações dentárias que comprometem o bem-estar dos animais levando à morte. Isso está relacionado à adição de mais de 30% de vagens ou farelos dessa planta a ração desses animais, o que provoca uma intoxicação devido a alta concentração de alcaloides (AHMAD; ISMAIL, 1996; SHACKLETON *et al.*, 2015).

Estudos com a *P. juliflora* apresentam ações antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2013), antioxidante (DAMASCENO *et al.*, 2020), antimalária (BATISTA *et al.*, 2018), antitumoral (SATHIYA; MUTHUCHELIAN, 2011), inibidor da colinesterase e pontencial uso no Alzheimer (CHOUDHARY *et al.*, 2005), anti-helmíntico (ODHIAMBO *et al.*, 2014), antiemético (HASAN *et al.*, 2012), antibiofilme e cicatrizante (ARYA *et al.*, 2019) e inseticida (DHIVYA *et al.*, 2018). Essas atividades são associadas aos metabólitos, como os alcaloides, terpenóides, taninos e flavonoides, presentes nas diversas partes dessa planta (HENCIYA *et al.*, 2016; SHARIFI-RAD *et al.*, 2019). Apesar da literatura relatar diversas atividades farmacológicas e biológicas, é possível observar uma escassez de estudos com a espécie para desenvolvimentos de produtos na área cosmética.

Estudo anterior com a *P. juliflora* indicou a presença de metabólitos com propriedades antioxidante, destacando-se os polissacarídeos, como as  $\alpha$ -glucanas, e polifenóis (DAMASCENO *et al.*, 2020). Diversos compostos fenólicos foram relatados, como o canferol, epigallocatequina, daidzina, apigenina, isoharmentina, luteolina, miricetina e quercetina, os quais já possuem estudos na literatura que comprovam a ação antitirozinase desses metabólitos secundários, extraídos de outras espécies de plantas (HASHIM *et al.*, 2021; HSU *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2020). Contudo, não há estudos científicos sobre a utilização de extratos de *P. juliflora* para avaliação da atividade antimelanogênica.

Damasceno e colaboradores (2020) demonstraram a presença de polissacarídeos, dentre eles uma  $\alpha$ -glucana, e compostos fenólicos, tais como

derivados de luteolina, epigallocatequina, apigenina, quercetina, miricetina, daidzina, isoharmentina e canferol, em extratos obtidos dos frutos da algobora e atribuíram ao extrato de *P. juliflora* atividades hidratante e de prevenção dos sinais cutâneos do envelhecimento quando incorporados em formulações cosméticas.

Os compostos fenólicos possuem diversas funções de interesse da cosmetologia, dentre elas antioxidante e prevenção dos sinais de envelhecimento cutâneo (BARRETO *et al.*, 2020; DAMASCENO *et al.*, 2020) além da inibição da síntese de melanina (DZIAŁO *et al.*, 2016; ZUO *et al.*, 2019).

Os polifenóis são um dos principais grupos de metabólitos com potencial atividade antimelanogênica (CHANG, 2009). A luteolina e seus glicosídeos, luteolina 7-metil glucuronídeo e luteolina 7-(6"-acetilallosil-(1→2)-glicosídeo), foram isolados dos extratos de *Moringa oleifera* e a sua propriedade de inibição da tirosinase não competitiva foi avaliada pela cinética inibitória de tirosinase, tendo os autores observado que os compostos estudados inibiram a melanogênese celular (HASHIM *et al.*, 2021). Hsu e colaboradores (2020) relataram, que derivados de epigallocatequina apresentaram atividade anti-melanogênica. Já Jampa e colaboradores (2022) avaliaram as bioatividades múltiplas das folhas de *Manihot esculenta* e analisaram por meio de análise HPLC-DAD que os principais constituintes como rutina, apigenina e canferol possuíam esta mesma ação. Derivados de quercetina, quercetina-7-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo, atenuaram a atividade da tirosinase celular e a melanogênese em células de melanoma B16F10 estimuladas por  $\alpha$ -MSH mais IBMX (PARK *et al.*, 2018), bem como o extrato de *Puerariae Lobatae*, o qual apresentava puerarina, daidzina, genisteína, daidzeína, genistina e formononetina em sua composição, apresentou inibição mista da monofenolase e ativação mista da difenolase. Portanto, a puerarina pode ser usada tanto como um inibidor da tirosinase quanto como um ativador da tirosinase (QU *et al.*, 2020). Neste contexto, considerando que Damasceno e colaboradores (2020) demonstraram na *P. juliflora* a presença desses compostos supracitados na *P. juliflora* a presença de compostos com atividade antimelanogênica já relata, tem-se um possível indício de que o extrato da algobora possa ser utilizado com a finalidade de harmonização da coloração da pele. Destaca-se também que não há estudos científicos sobre a utilização de extratos de *P. juliflora* para avaliação da atividade antimelanogênica.

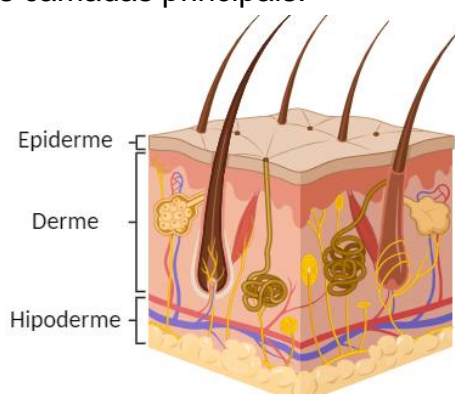
## 2.2 PELE E MELANOGÊNESE

### 2.2.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, representa aproximadamente 16% do peso corporal total e apresenta diversas funções como, constituir uma barreira entre o ambiente interno e o meio externo, protegendo o organismo contra substâncias potencialmente perigosas, lesões mecânicas e possíveis patógenos (BHATTACHARYA *et al.*, 2019; MINTIE; SINGH; AHMAD, 2020). Além de manter a homeostasia corporal através de funções de termorregulação, e controle da perda de água (PAUL; SHARMA, 2015), proporciona também a remoção de metabólitos residuais através do suor e produção de pigmentos que protegem contra a radiação solar (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011). Assim, a pele é um local importante para o metabolismo e processos secretores que produzem uma série de macromoléculas, incluindo glicanos, proteínas, lipídios, e hormônios. Por exemplo, a maior síntese de vitamina D periférica é produzida principalmente na pele (GAUR *et al.*, 2017).

Anatomicamente, a pele humana é constituída por três camadas principais: a camada externa, chamada de epiderme; a camada intermediária, derme, que é subjacente a epiderme; e a camada mais interna, intitulada de hipoderme, a qual é contituida de gordura subcutânea (Figura 2) (ARRON, 2016; MINTIE; SINGH; AHMAD, 2020). Ainda, apresenta diversos apêndices epidérmicos como cabelos, unhas, pelos, glândulas sudoríferas e sebáceas e receptores sensoriais, que formam o sistema tegumentar contínuo (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; LOSQUADRO, 2017; MCGRATH *et al.*, 2004).

**Figura 2.** A pele e suas camadas principais.



**Fonte:** Criado com BioRender.com (2023).

A epiderme é um epitélio estratificado queratinizado composto predominantemente por queratinócitos e a integridade e elasticidade da pele são mantidas devido a sua constituição ser de aproximadamente 20% de água (BENSON; WATKINSON, 2012). Apresenta decendência embrionárias da ectoderma e é formada pela junção de cinco porções - estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo, que se encontram em constante regeneração de forma natural ao longo da vida, embora tornando-se mais lenta com o envelhecimento (LOSQUADRO, 2017; MINTIE; SINGH; AHMAD, 2020).

O estrato córneo (EC) que é uma camada de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura apresenta função de defesa da pele, impedindo a entrada de microrganismos e algumas substâncias nocivas. Dessa forma, esse estrato auxilia na hidratação e retenção de água, auxiliando na manutenção fisiológica da hidratação cutânea (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021). Essa camada é composta por células chamadas de corneócitos, que são terminalmente diferenciadas, achatadas, e separadas por camadas de lipídios densamente compactadas (BOSKO, 2019; EGAWA, 2018).

O estrato lúcido é formado por uma camada de células planas e translúcidas, eosinófilas, as quais lisoenzimas digeriram os núcleos e organelas. Além disso, essa camada é constituída por filamentos de queratina, que se encontram orientados conjuntamente à superfície da pele. É impossível notar a presença dessa camada em áreas do corpo onde a pele é pouco espessa. Essas células achatadas são responsáveis por liberar as enzimas que as digerem, já que a maioria dessas células não possui núcleo, ou seja, estão mortas (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021).

O estrato granuloso consiste da junção de duas a cinco camadas de células, tem formato plano e é a transição para a camada inferior de células. A camada granular está ativamente envolvida na queratinização, onde as células produzem queratina e perdem seus núcleos, tornando-se mais densas e frágeis. Também apresenta grânulos de querato-hialina (TOBIN, 2017).

O estrato espinhoso apresenta células com diferentes morfologias, estrutura celular e propriedades. Assim, em uma arquitetura aglomerada essas células, que apresentam citoplasma amplo e eosinofílico, são interligadas por junções chamadas de desmossomos, que dão coesão celular dos epitélios, são resistentes a fortes trações e pressões (TOBIN, 2017). Em geral, isso ocorre por meio da formação de placas desmossômicas, em que os filamentos de queratina são ancorados (DELVA

*et al.*, 2009). Os queratinócitos após passarem pelo processo de alongamento e achatamento são os principais constituintes da camada granular, que é caracterizada pela presença de grânulos intracelulares de querato-hialina e corpos lamelares. A presença dos grânulos querato-hialinos impede a perda de água do organismo, pois forma uma barreira de proteção na pele (MINTIE; SINGH; AHMAD, 2020).

O estrato basal ou germinativo apresenta células-tronco epidérmicas, melanócitos e células de Merkel. As células-tronco dão origem aos queratinócitos. Devido à alta atividade mitótica e a enorme quantidade de células, a pressão exercida é maior nas laterais fazendo com que as células sejam colunares. Os melanócitos são células redondas, com longos prolongamentos, citoplasma claro e núcleos ovais. Eles produzem melanina. As células de Merkel são mecanorreceptores que formam conexões sinápticas com terminações nervosas sensoriais (LOSQUADRO, 2017).

A derme é a camada da pele que fornece suporte à epiderme. É constituída por uma camada espessa fibrosa, filamentosa, amorfa e com tecido elástico rico predominantemente em colágeno, fibras reticulares e elastina, que são responsáveis por dar estrutura, suporte e elasticidade para pele. Além do mais, essa camada é contituida por biocompostos que são produzidos por fibroblastos de diversas linhagens e ajudam a manter a hidratação e firmeza do tecido, como ácido hialurônico, colágeno e elastina (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021). Ao contrário da epiderme, os sistemas vascular e linfático permeiam a derme ao lado de apêndices como folículos capilares, terminações nervosas e glândulas secretoras (BROWN; KRISHNAMURTHY, 2018).

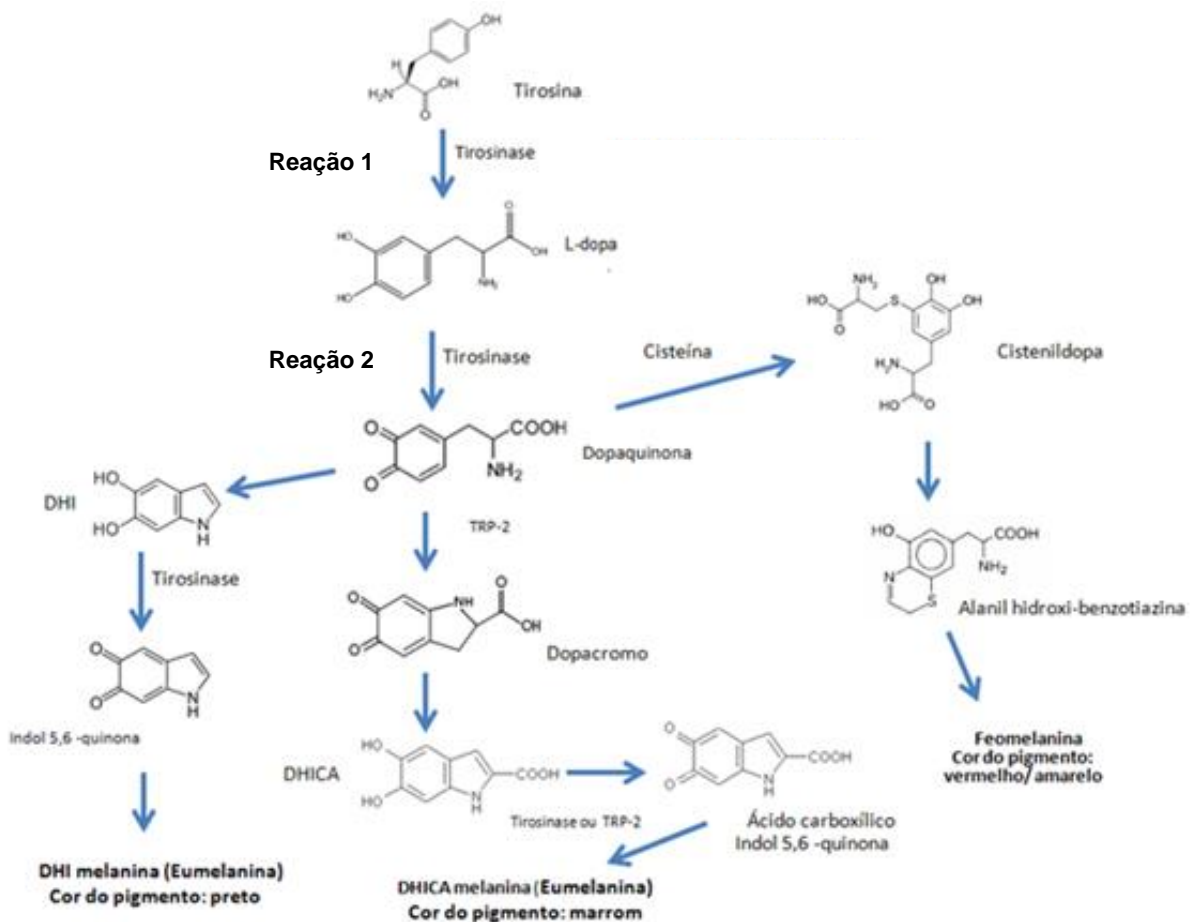
A epiderme apresenta quatro tipos de células, que são os queratinóticos, melanócitos, células de *Langerhans* e células de *Merkel* (LOSQUADRO, 2017). Os melanóticos são células dendríticas, desprovidas de desmossomas, derivadas da crista neural. São compostos por prolongamentos citoplasmáticos que envolvem cerca de 36 queratinócitos, nos quais a melanina recém sintetizada transita. Geralmente se situam entra a camada basal e o estrato espinhoso da epiderme. Assim, os melanóticos apresentam a função de produzir melanina, que é um pigmento que gera variação da coloração da pele pela quantidade, qualidade e distribuição desse pigmento (D'ISCHIA *et al.*, 2015; RZEPKA, 2016). Existem dois tipos de melanina na pele, a eumelanina (apresenta coloração marrom-preta) e a

feomelanina (dá a coloração amarelo-avermelhada). A proporção de eumelanina e feomelanina determina a cor da pele. Níveis mais altos de feomelanina estão associados a uma cor de pele mais clara e níveis mais altos de eumelanina promovem uma cor de pele mais escura (NORDLUND; BOISSY, 2001).

### 2.2.1 Melanogênese

A melanina é o pigmento responsável pela coloração da pele, tem função de proteção contra danos da radiação ultravioleta (UV) e é produzida no interior dos melanócitos pelo processo de melanogênese (MALASPINA *et al.*, 2020).

**Figura 3** - Cascata de reações da melanogênese.



**Fonte:** SPAGNOL, 2014, adaptado de PROTA, 1980; ALMEIDA, 2013.

Um esquema representativo da produção da melanina pode ser observado na Figura 3. A melanogênese é iniciada em organelas especializadas produzidas pelo retículo endoplasmático dos melanócitos, os melanossomas, nos quais ocorre a

primeira etapa de hidroxilação da L-tirosina a L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (Reação 1) e, após oxidação desta a L-Dopaquinona (Reação 2), que dará continuidade a cascata bioquímica. Essas duas primeiras reações para síntese endógena de melanina são catalisadas pela tirosinase, que é uma metaloenzima contendo cobre (KUSUMAWATI *et al.*, 2015; ORTIZ-RUIZ *et al.*, 2016). O número, tamanho e distribuição dos melanossomas nos melanócitos são fatores responsáveis pela diversidade fenotípica da coloração da pele de indivíduos humanos (ANGELOPOULOU, 2013; CICHOREK *et al.*, 2013).

Contudo, o aumento exacerbado da produção da melanina pode gerar certos prejuízos, como o surgimento de regiões pigmentadas na pele, podendo se tornar um problema estético, incluindo melasma, sardas, manchas da idade, cloasma e síndromes de hiperpigmentação (ALAM *et al.*, 2017; CHUNG *et al.*, 2018). Como o excesso de melanina na pele é um tema relevante discutido na indústria cosmética, há uma demanda pela busca de novos inibidores da melanogênese (LEE; CHA, 2019). Portanto, o desenvolvimento de agentes antimelanogênicos é importante para a prevenção de regiões hiperpigmentadas na pele (CHAN; KIM; CHEAH, 2011; LEE; CHA, 2019). Assim, diferentes estudos têm focado no bloqueio da melanogênese por meio de espécies vegetais e na prevenção da hiperpigmentação indesejada para benefícios cosméticos (CHO *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2018).

Diversos compostos são utilizados como agentes inibidores do processo de hiperpigmentação como o ácido kójico, hidroquinona, ácido ascórbico, ácido retinóico, entre outros (BAEK; KANG; PARK, 2020; JULIANO, 2022; SEO *et al.*, 2019). Existe uma demanda de mercado na busca de novos compostos, de preferência de origem natural, sustentáveis que tenham atividades inibidora de tirosinase ou da melanogênese.

Diferentes estudos apresentados na literatura, atribuem a ação antitirosinase e anti-melanogênese aos compostos polifenóis. Flavonoides são compostos fenólicos que apresentam propriedades antitirosinase, tornando-se atrativos como fitoingredientes em formulações cosméticas (RAUNIYAR *et al.*, 2014). Segundo Burger e colaboradores (2017) em estudo realizado com *Reseda luteola* L., foi observado que derivados de luteolina e apigenina apresentaram ação inibitória da tirosinase e se mostraram como potenciais ativos para harmonização da coloração da pele. Lall e colaboradores (2015) descreveram a composição química dos

extratos etanólicos das folhas, cascas e frutas de *Ceratonia siliqua*, que apresentaram ação inibidora da tirosinase associada à presença de polifenóis derivados da epicatequina (epicatequina-3-O-galato), quercetina e miricetina.

Zeitoun e colaboradores (2019) demonstraram por meio de testes *in vitro* que os extratos de folhas de *Combretum micranthum* (G. Don), de frutas de *Anacardium occidentale* (L.), de sementes de *Moringa oleifera* (Lam.) e de sementes de *Adansonia digitata* (L.) possuem atividade de harmonização da coloração da pele equivalente. As atividades antitirosinase de 84,58% e 31,02% foram descritas para *C. micranthum* e *A. occidentale*, respectivamente, demonstrando que esses extratos podem ser utilizados em produtos cosméticos como agentes alternativos para a harmonização da coloração da pele.

Han e colaboradores (2020) avaliaram o efeito antimelanogênico do extrato etanólico de *Sorghum bicolor* e verificaram atividade antioxidante *in vitro* e efeito antimelanogênico em células de melanoma B16F10, podendo ser utilizado pela indústria cosmética como ativo para homogeneização da coloração da pele. Os principais compostos identificados nesse extrato foram 1,3-O-dicafeoilglicerol, tricina e ácido 9-hidroxi-octadecadienóico (9-HODE). Huang e colaboradores (2020) demonstraram o mecanismo de ação do extrato aquoso da semente de *Phoenix dactylifera* L. na inibição da melanogênese em células B16F10 ao regular negativamente as vias de sinalização de PKA, sinalizando que essa espécie vegetal pode ser usada como um agente antimelanogênico e conseqüentemente um insumo para harmonização da coloração da pele.

Além disso, Damasceno *et al.* (2020) observaram a presença de algumas dessas moléculas com atividade já relatada na literatura, o que pode ser um indicativo que o extrato de *P. juliflora* possua atividade de inibição da melanogênese. Compostos fenólicos, em extratos etanólicos das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru), foram avaliados através de ensaios enzimáticos, tendo os autores observado que os compostos estudados indicaram uma inibição de 42% após uma hora, enquanto que o controle positivo - ácido kójico - inibiu completamente a enzima (SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013). Resultados semelhantes foram observados por Chaiyana e colaboradores (2020), em que todos os extratos de *Morus alba* L. contendo os polifenóis, apresentaram atividade antitirosinase significativamente potente.

Outros compostos, como os glicosídeos podem apresentar atividade inibidora

da tirosinase. Elshibani e colaboradores (2020), observaram a atividade antitirosinase da arbutina do extrato metanólico de *Arbutus pavarii* Pampan por meio de estudos *in vitro* podendo atuar no tratamento eficaz da hiperpigmentação da pele. Já, El Hawary e colaboradores (2020), avaliaram o extrato de folhas de *Macadamia integrifolia* e suas frações e relataram que dentre os compostos isolados, o ácido gálico, demonstrou forte atividade inibitória da enzima tirosinase com IC50 a 56 mg/mL.

Por fim, vale salientar que os termos “manchas” e “despigmentantes” na rotulagem dos produtos cosméticos, encartes e material publicitário tiveram suas proibições sugeridas pela Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC) da Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) desde 2009 pelo Parecer Técnico n.1 de 28/07/2009 (ANVISA, 2020). Essa proibição aconteceu em decorrência da existência de diferentes tipos de lesões na pele que provocam alterações na coloração desse órgão e que podem estar ou não associadas à afecções, como: extravasamento de hemácias; aumento da coloração da pele por infecções virais; mancha acrômica (branca) podendo estar relacionada com uma doença autoimune, como o vitiligo; dentre outras. Após os protestos mundiais antirracistas motivadas pelo assassinato do homem preto americano George Floyd, em 25 de maio de 2020, algumas empresas como a L’Oréal, posicionaram-se em remover os termos branco/clareador (*white/whitening*), claro/clareamento (*fair/fairness, light/lightening*) de todos os seus produtos e passaram usar o termo: “produto para homogeneização da coloração da pele” ou “produto para harmonização da coloração da pele” (O GLOBO ECONOMIA, 2020).

### 2.3 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O envelhecimento da pele é algo natural e inevitável, caracterizado pelos sinais clínicos como surgimento de rugas, manchas senis, queratoses actínicas, perda de elasticidade, flacidez e aparência de textura áspera, dentre outros. Por isso, há uma grande necessidade da promoção contínua de pesquisas sobre o envelhecimento cutâneo e seus possíveis protocolos de prevenção e tratamentos (ECKHART; TSCHACHLER; GRUBER, 2019; KOOHGOLI, *et al.*, 2017).

Por estar exposto ao meio externo, a pele acaba sofrendo com fatores intrínseco (FI) e extrínseco (FE) que promovem o envelhecimento cutâneo. O FI está relacionado com a cronologia, várias causas associadas à genética e à diminuição

do telômero. O FE é causado por agentes externos como exposição crônica à luz, poluição, radiação ionizante, produtos químicos ou toxinas. Notoriamente, a exposição prolongada à radiação solar ultravioleta (UV) é o principal fator de envelhecimento extrínseco da pele e é referido como fotoenvelhecimento (KOOHGOLI, *et al.*, 2017; PUROHIT *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2014).

Estudos tentam explicar a base molecular do envelhecimento da pele, incluindo a teoria da senescência celular, diminuição da capacidade de reparo do DNA celular e perda de telômeros, mutações pontuais do DNA mitocondrial extranuclear, estresse oxidativo, aumento da frequência de anormalidades cromossômicas, mutações monogênicas, aumento dos níveis de açúcar no organismo, inflamação crônica e dentre outras (CAVINATO; JANSEN-DURR, 2017; OLSEN *et al.*, 2017; PANICH *et al.*, 2016).

Importantes mudanças estruturais e funcionais ocorrem na matriz extracelular (MEC), onde colágenos fibrilares, fibras elásticas e proteoglicanos acabam reduzindo durante o processo de envelhecimento. Este processo é notório devido à perda de tecido cutâneo, o qual pode estar interligado a muitos fatores tais como a perda de MEC e células (RITTIÉ; FISHER, 2015).

Diversos componentes da pele sofrem com o fotoenvelhecimento, principalmente as fibras colágenas, fibras elásticas e glicosaminoglicanos. O colágeno é uma proteína sintetizada pelo corpo humano, é o componente extracelular em maior concentração e tem função de dar suporte para a derme. As fibras elásticas são importantes no processo de elasticidade e os glicosaminoglicanos são responsáveis pela hidratação e sinalização celular em fisiopatologias tais como coagulação, inflamação, infecção microbiana, câncer, crescimento e diferenciação celular (BIRCH; BARNES; PASSOS, 2017; KRUTMANN *et al.*, 2017).

A pele envelhecida apresenta rugas finas e a elasticidade torna-se reduzida. Contudo, na pele fotoenvelhecida esses sinais são mais acentuados por causa da radiação UVA e UVB, devido às alterações nos compartimentos dérmicos, como diminuição da síntese e aumento da remodelação ou degradação dos componentes da matriz dérmica. Isso propicia o desenvolvimento de rugas mais profundas, acentua a perda de elasticidade e pode levar à consequências severas como a carcinogênese (KE; WANG, 2021; SCHUCH *et al.*, 2017).

A radiação UVA penetra até as camadas mais profundas da pele como a derme, e a luz absorvida realiza reações de oxidação gerando espécies reativas

de oxigênio. Já a radiação UVB atinge a epiderme e é absorvida instantaneamente pelo DNA, ocasionando o rearranjo estrutural dos nucleotídeos, resultando em danos nas fitas de DNA. Assim, após o processo de alteração nas proteínas pertencentes ao material genético da pele ocorrerá envelhecimento prematuro desse órgão (CAVINATO; JANSEN-DURR, 2017; KE; WANG, 2021).

A radiação UVB é responsável também por induzir a produção de metaloproteínas de matriz (MMPs) que degradam os colágenos tipo I e tipo II. As principais MMPs que provocam essa clivagem dessas proteínas são MMP-1, MMP-3 e MMP-9. As metaloproteínas são produzidas na pele principalmente nos queratinócitos epidérmicos e nos fibroblastos dérmicos, embora possam também serem sintetizadas por células endoteliais e imunócitos (BIRCH; BARNES; PASSOS, 2017; GHOSH; CAPELL, 2016).

Quin, Balimunkwe e Quan (2017) ao analisarem todas as 23 MMPs de mamíferos conhecidas observaram que a redução do tamanho dos fibroblastos dérmicos, que é observada na pele humana envelhecida, contribui para a elevação de múltiplas MMPs relacionadas à idade. Ressaltando assim que essas enzimas podem estar envolvidas na degradação progressiva das fibrilas de colágeno dérmico.

Dentre as diversas teorias existentes para explicar o processo de envelhecimento cutâneo as duas mais estudadas e discutidas são: o estresse oxidativo e ação dos radicais livres.

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos com um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada externa e podem ser formados durante processo de interação entre o oxigênio com certas moléculas. A geração desses radicais pode estar ligada aos processos endógenos (processos biológicos naturais) ou por processos exógenos, através de estímulos externos (CHANDRASEKARAN; IDELCHIK; MELENDEZ, 2017).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas reativas que abrangem os radicais e não radicais derivados do  $O_2$  como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO^{\cdot 2}$ ) e oxigênio singlete ( $O_2^{\cdot}$ ); que em condições fisiológicas, são produzidas pequenas quantidades de EROs durante processos celulares, como respiração aeróbica, cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, dentro do retículo endoplasmático e peroxissomal, reação de Fenton e Haber-Weiss ou

processos inflamatórios, principalmente em hepatócitos e macrófagos (SALISBURY; BRONAS, 2015). Ademais, essas moléculas reativas chegam a contribuir para o envelhecimento natural por meio da indução da diferenciação celular e por provocar apoptose. O estresse prolongado, atividade física intensa, exposição excessiva à radiação UV, dieta inadequada e uso de estimulantes são condições que aumentam a produção de radicais livres (CHANDRASEKARAN; IDELCHIK; MELENDEZ, 2017; MIWA *et al.*, 2022).

As espécies reativas interagem, causam modificações oxidativas nas principais macromoléculas celulares (carboidratos, lipídios, proteínas e DNA) e podem desencadear fenômenos como glicação protéica, hidroxilação, desidrogenação e mutação (BARREIRO, 2016; FRIJHOFF, *et al.*, 2015).

Em circunstâncias normais, a produção de radicais livres no organismo humano é inevitável porque as mitocôndrias são necessárias para o processo de respiração celular produzindo energia na forma de ATP (Adenosina trifosfato) via fosforilação oxidativa, que acontece por meio da cadeia transportadora de elétrons (KRAWCZYK, 2019). As espécies reativas agem sobre as mitocôndrias e causam um efeito destrutivo. Na tentativa de minimizar os efeitos negativos gerados pelos EROs e o estresse oxidativo, o corpo humano produz composto antioxidantes, que combatem o excesso de radicais livres para prevenção ou diminuição das consequências desses (AKDEMIR *et al.*, 2016; ANRAKU *et al.*, 2018).

O superóxido ( $O_2^-$ ) é o primeiro radical a ser produzido por meio da redução do  $O_2$ . Apresenta pouca reatividade e baixa citotoxicidade (TOHMA *et al.*, 2016). Já o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) apresenta vida longa, é reativo e quando em contato com a luz se degrada facilmente. As enzimas responsáveis pela decomposição do  $H_2O_2$  são as peroxidases. Na presença de  $O_2$  e íons metálicos como  $Cu^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  o peróxido é convertido no  $OH^-$  pela via da Reação de Fenton e Haber-Weiss. Além disso, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro. Por fim, o radical hidroxila ( $OH^-$ ) é formado no processo de hidrólise do  $H_2O_2$  (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Assim, após ser formado o  $OH^-$  pode provocar quebras e modificações nas bases de DNA celulares, o que gera alterações na expressão gênica, mudanças protéicas, mutações e apoptose (BHATTACHARJEE, 2019; DIPLOCK *et al.*, 1998; HASANUZZAMAN *et al.*, 2020; SACHDEV *et al.*, 2021).

Diferentes compostos vegetais com propriedades antioxidantes capazes de

combater o estresse oxidativo (carotenóides, fenólicos, flavônicos, derivados antociânicos, ácidos graxos insaturados, vitaminas, enzimas e cofatores) têm estimulado o interesse em diversas áreas que vai desde a engenharia de alimentos até a indústria farmacêutica.

Ademais, os radicais livres desempenham um papel importante no sistema imunológico, pois possuem efeitos bactericidas, fungicidas, virais e são uma poderosa barreira de defesa do organismo contra a presença de microorganismos. Além disso, descobriu-se que estão envolvidos na fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de importantes substâncias biológicas. No entanto, seu excesso pode causar efeitos deletérios como peroxidação lipídica de membranas e oxidação de proteínas (DEMIRCI-HAMMER, S. *et al.* 2022; LIGUORI *et al.*, 2018)

Os organismos têm mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para prevenir a oxidação causada pelos EROs. O sistema enzimático funciona primeiro, evitando o acúmulo de ânions radicais superóxido e peróxidos de hidrogênio. Esse sistema endógeno oxidativo consiste em uma variedade de enzimas, especialmente Superóxido Dismutase - SOD, Catalase - CAT e Glutathione Peroxidase - GPx23 (LIGUORI *et al.*, 2018).

A superóxido desmutase (SOD) é a enzima responsável por evitar o processo de oxidação gerado pelos radicais livres, com principal mecanismo de ação atuando sobre o radical  $O_2^-$ , que converte o oxigênio prejudicial em peróxido de hidrogênio menos reativo, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (MA *et al.*, 2016; SHARIEV *et al.*, 2021).

Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, inclui-se algumas vitaminas (C, E e A), outros produtos naturais (carotenóides, flavonóides, outros polifenóis, furanos e tióis) e produtos sintéticos (por exemplo, ebselen, n-acetilcisteína e trolox) (PISOSCHI; POP, 2015).

Diferentes metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas para determinar a atividade antioxidante de plantas. Dentre elas, podemos citar os ensaios de DPPH e hidroxila, indicados para avaliar a atividade sequestradora de radicais dos compostos orgânicos; bem como os ensaios de quelação de íons de cobre e ferro, que são utilizados para avaliar o poder redutor dos compostos analisados. Dessa maneira, os resultados de ensaios químicos *in vitro* são úteis, de baixo custo e têm sido amplamente aplicados para descobrir potenciais fontes antioxidantes. No

entanto, para verificar a atividade antioxidante de um composto ou molécula, um único ensaio não é suficiente para verificar os diferentes mecanismos envolvidos na atividade desses (ALAM; BRISTI; RAFQUZZAMAN, 2013; ALVES *et al.*, 2010).

Dentre os testes disponíveis, o sequestro do radical DPPH é bastante utilizado por apresentar uma metodologia mais simplificada. O ensaio é fundamentado na reação colorimétrica, em que a medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância possui em sequestrar o radical DPPH (ALVES *et al.*, 2010). Quando uma substância doadora de prótons mistura-se à solução de DPPH, ocorre a mudança na coloração da mistura de violeta para amarelo. Esse método é considerado fácil, preciso e reprodutível entre os métodos antioxidantes (ALAM; BRISTI; RAFQUZZAMAN, 2013).

Já a avaliação do poder redutor fundamenta-se na aptidão que um composto tem de transferir elétrons, assim avaliando a capacidade antioxidante redutora da amostra. Esse teste mede a redução do complexo de íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ligando ao complexo ferroso azul intenso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por meio de antioxidantes em ambientes ácidos (CHEN *et al.*, 2015).

Outro teste utilizado é a capacidade antioxidante total que acontece em condições de aquecimento e pH ácido, em que através da redução do Molibdênio (VI) a Molibdênio (V), gera uma solução esverdeada (BERKER *et al.*, 2010).

A quelação de íons metálicos é determinada pela medição do efeito quelante de antioxidantes para íons metálicos, incluindo ferro e cobre. Espécies elementares, como  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , podem facilitar a produção de EROs dentro dos sistemas vivos. Isso ocorre quando esses íons entram em contato nas membranas celulares com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que é uma molécula bastante permeável aos tecidos, e geram os radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ). Embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação biomoleculares (GULCIN, 2012).

O método de sequestro de radicais superóxido é utilizado para avaliar o quanto uma amostra consegue capturar os ânions superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Esses íons são fracos, contudo produzem radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $\text{O}_2$ ), que acabam contribuindo para o estresse oxidativo. Esses radicais são bastante tóxicos e são utilizados pelo sistema imunológico para destruir invasores como os microorganismos (GULCIN, 2006).

Assim, um ativo multifuncional, que atue em diversas etapas da cascata oxidativa e na inibição da enzima tirosinase para harmonização da coloração da pele, se mostra como um insumo interessante para a área cosmética. Os cuidados para se evitar o envelhecimento cutâneo precoce e o processo de hiperpigmentação da pele envolvem o uso de produtos em uma rotina diária de *skincare*, que começa na limpeza e hidratação da pele bem como no uso de produtos específicos pró-idade, antimelanogênicos/antitirosinase e proteção solar.

## 2.4 EMULSÕES

As emulsões são definidas como uma mistura formada por dois líquidos imiscíveis que gera um sistema heterogêneo e geralmente, são constituídas por uma fase aquosa e outra oleosa, em que os compostos com menor polaridade caracterizam a fase oleosa e os mais polares a fase aquosa (PINHO; STORPIRTIS, 1998). Assim, os sistemas que apresentam a fase dispersa oleosa e a fase dispersante aquosa são chamadas de emulsões do tipo óleo em água (O/A), e as que têm a fase dispersa aquosa e a dispersante oleosa são conhecidas como emulsões água em óleo (A/O) (CHAO; SHUM, 2020; PINHO; STORPIRTIS, 1998).

As emulsões apresentam gotículas dispersas com um diâmetro médio geralmente na faixa de 0,1–100,0  $\mu\text{m}$  (MCCLEMENTS, 2007). São fundamentadas na distribuição de tamanho de gota e caracterizadas por uniformidade ou valor de coeficiente de variação (CV). Esses sistemas geralmente são do tipo monodispersas e isso ocorre quando seus valores de CV são menores que 25%. As emulsões monodispersas têm crescido bastante dentro das indústrias e nas pesquisas, pois apresentam partículas pequenas e praticamente com tamanhos semelhantes controlando assim a taxa de liberação dos ativos (COMUNIAN; JAFARI, 2019; GUNIS, 2018; LIU *et al.*, 2020).

Essas formulações são muito utilizadas como veículos em produtos cosméticos devido ao aspecto visual e sensorial que essa forma cosmética proporciona, como textura e sensação agradáveis ao toque. Essas características em produtos são fundamentais para uma boa aceitação e aprovação pelos consumidores (MASSON, 2005). Além disso, a inclusão do extrato de *P. Juliflora* nesse tipo de veículo pode representar uma inovação para o mercado no tocante ao desenvolvimento de produtos cosméticos. As emulsões cosméticas são formadas essencialmente por uma fase oleosa, uma fase aquosa e um sistema tensoativo

estabilizante. Além de compostos ativos, outras substâncias podem compor a formulação seja para conferir propriedades sensoriais ou ainda, estabilizantes da formulação (HAYASE, 2017).

As emulsões clássicas são sistemas termodinamicamente instáveis e possuem predisposição à separação de fases durante o armazenamento (CONTENTE; 2016; DIMITROVA *et al.*, 2014). O uso de estabilizantes, que podem ser agentes espessantes ou emulsificantes, no processo de desenvolvimento pode retardar essa separação. Assim, a presença de um sistema tensoativo adequado na formulação reduz a tensão interfacial entre as fases externa e interna, diminuindo assim a energia necessária para formar uma nova interface e promover mais facilmente a formação de gotículas e estabilização do sistema (ABBOTT, 2016). Como esses sistemas são altamente instáveis, agentes emulsionantes devem estar presentes para formar filmes interfaciais, proporcionar maior estabilidade física e manter as fases interna e externa. Algumas moléculas podem atuar como emulsificantes, sendo os tensoativos considerados os mais indicados para manter a estabilidade das emulsões.

Além disso, as emulsões tornaram-se um veículo excelente para diversos ativos cosméticos, pois geram uma proteção e liberação adequada desses ativos mantendo ainda a estabilidade e eficácia dos componentes. Assim, essas formulações podem ser projetadas para apresentarem vários tamanhos de gotículas, estruturas de superfície e diferentes propriedades eletroquímicas (MCCLEMENTS, 2015).

A formação de emulsão (ou emulsificação) refere-se ao processo pelo qual uma emulsão é criada a partir de duas (ou mais) fases separadas, ou o processo em que o tamanho da gota é reduzido à uma emulsão existente. Para o processo de produção dessa mistura, é necessário a aplicação de uma energia suficiente na interface da mistura óleo/água para quebrar a fase oleosa em gotículas pequenas. Dessa maneira, considerando os métodos de obtenção de alta energia, quanto menor for a gotícula maior será a energia empregada para a sua formação (CALLENDER *et al.*, 2017; MCCLEMENTS, 2015). Outro aspecto que pode alterar o tamanho, a estabilidade e as características da superfície das gotículas é a escolha do surfactante ou emulsificante, pois esse tipo de composto químico permite que a emulsão apresente diversas características físicas e químicas ao promover a criação de micelas estáveis (SHAO *et al.*, 2020; TING *et al.*, 2014).

Características como tamanho, morfologia, reologia, carga e capacidade de encapsulamento podem ser estudadas e avaliadas usando instrumentos analíticos e metodologias padronizadas para se projetar e produzir sistemas emulsionados mais precisos e que possam atender melhor necessidades específicas de aplicações em diversas áreas da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (SHAO *et al.*, 2020).

A estabilidade da emulsão é compreendida como a capacidade das emulsões de resistir ao processo de alterações em suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo. Assim, processos como separação gravitacional (cremagem/sedimentação), floculação, coalescência, amadurecimento de Ostwald e inversão de fase são os mecanismos que levam à instabilidade da emulsão (CHUNG *et al.*, 2016; HONG, KIM, LEE, 2018). Os testes de estabilidade das emulsões prospectam o tempo de validade do produto e podem ser avaliados por meio de estudos de curto prazo, estudos em condições aceleradas e, ainda, estudos de longo prazo (ANVISA, 2004).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e antitirozinase do extrato de *P. juliflora* e desenvolver formulações cosméticas contendo o extrato em estudo, com foco nas atividades antioxidante e na harmonização da coloração da pele. Assim, essa pesquisa poderá trazer contribuições para um possível novo fitocosmético multifuncional, contribuindo ainda de forma significativa para aspectos socioeconômicos para as regiões produtoras da algaroba, além de agregar valor à cadeia produtiva da espécie.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver uma formulação cosmética com atividades antioxidante e antitirozinase para harmonização da coloração da pele contendo extrato dos frutos de *P. juliflora*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1 Obter o extrato de frutos de *P. juliflora*;

3.2.2 Caracterizar quimicamente o extrato obtido;

3.2.3 Avaliar a segurança *in vitro* do extrato de *P. juliflora*;

3.2.4 Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato de *P. juliflora*;

3.2.5 Avaliar a atividade antitirozinase do extrato em estudo;

3.2.6 Obter formulações cosméticas contendo o extrato de *P. juliflora*;

3.2.7 Avaliar das estabilidades preliminar e acelerada das formulações obtidas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DOS ESPÉCIMES VEGETAIS

Frutos (vagens com sementes) de *P. juliflora* (Fabaceae) foram coletados nas dependências do Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes – DNIT, localizado no município de Currais Novos-RN (6°15.469'S 36°30.529'O), no dia 14 de novembro de 2015, período de florada e frutificação da espécie na região (coleta realizada em período caracterizado como muito seco pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte). Os frutos encontravam-se congelados. Uma excisata foi depositada no Herbário da UFRN, sob o número de registro “*Prosopis juliflora* -- UFRN 20371”. A autorização de coleta do material foi concedida pelo SISBIO (32749-2).

### 4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi preparado de acordo com metodologia padronizada por Damasceno *et al.* (2020) com adaptações. Os frutos íntegros secos foram triturados por 5 minutos até a obtenção de um pó. O pó foi homogeneizado com água destilada na proporção de 1:10 (p/v) e mantidos em banho maria a 34°C por 3,5 h. Em seguida, o extrato foi filtrado e o etanol 99% foi adicionado a esse filtrado (e não ao material retido) na proporção de 1:1 (v/v) para precipitação dos polissacarídeos. O solvente orgânico foi rotaevaporado a 37°C sob pressão reduzida. As amostras foram congeladas a -20°C e liofilizadas (Christ Alpha 1–2 LD, Osterode am Harz, Alemanha) por 48 h. O experimento foi realizado em triplicata.

O rendimento de extração foi calculado de acordo com a equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa da amostra liofilizada}}{\text{massa das vagens secas e trituradas}} \times 100 \quad (1)$$

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

#### 4.3.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos presente no extrato de *P. juliflora* foi avaliado por meio do método de Folin-Ciocalteu (ATHUKORALA; KIM e JEON, 2006) utilizando como padrão o ácido gálico. Uma alíquota de 100,0 µL do reagente de Folin-Ciocalteu foi adicionada à 500,0 µL da amostra (1,0 mg/mL) e o volume

completado com água destilada para 1700,0  $\mu\text{L}$ . Após agitação, a solução foi submetida a banho maria (Solab, mod. SL-155/22, Brasil) durante 10 minutos a temperatura de 40°C. Aliquotas de 200,0  $\mu\text{L}$  foram transferidas para uma placa de 96 poços e avaliada espectrofotometricamente (Bio Tek, Epoch microplate spectrophotometer, EUA) na região de 765 nm. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.3.2 Flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado pelo método de complexação do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) proposto por Schimidt e Ortega (1983), com adaptações, utilizando a quercetina como padrão. Aliquota de 1,0 mL da solução de  $\text{AlCl}_3$  (2,5%) foi adicionada a 1,0 mL da amostra (1,0 mg/mL). Uma curva padrão foi delineada nas concentrações de 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$ . Foi utilizado o MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 como solução branco para a curva. Após 1 hora ao abrigo da luz foram mensuradas as leituras em espectrofotômetro (Spectrophotometer, mod. BEL 1105, Brasil) à 425 nm. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média e desvio padrão como  $\mu\text{g.EQ/mg}$  de quercetina.

#### 4.3.3 Caracterização química pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo *Time-of-flight* (LC-MS-TOF)

Para a caracterização do extrato, a amostra foi preparada utilizando uma solução 50:50 (Água ultrapura e metanol - grau HPLC) na concentração de 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$  e analisada em UHPLC (Agilent® 1260 Infinity) acoplado a analisador de massas e fonte de ionização do tipo *electrospray* e tempo de voo, respectivamente, (ESI-TOF) (Agilent® 6230). A coluna utilizada foi do tipo fase reversa, modelo Zorbax RRHD C18 (50 mm x 2,1 mm; 1,8  $\mu\text{m}$ ). O volume de injeção foi de 10,0  $\mu\text{L}$  sob um de fluxo 0,3  $\text{mL.min}^{-1}$ . A fase móvel usada para a separação foi ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água (A) e ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em acetonitrila (B) em um gradiente de eluição, conforme Tabela 1 a seguir:

**Tabela 1** - Gradiente de eluição do método cromatográfico utilizado para caracterização do extrato.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)	Vazão (ml.min <sup>-1</sup> )
0,00	95,0	5,0	
5,00	95,0	5,0	
40,00	0,0	100,0	0,3
45,00	0,0	100,0	
55,00	95,0	5,0	
60,00	95,0	5,0	

A amostra foi analisada no modo positivo e negativo nas seguintes condições típicas: a voltagem do fragmentador foi fixada em 175 V; o capilar em 3500 V; o *skimmer* em 65 V; nitrogênio foi usado como gás de secagem (325 °C; 8 L/min) e nebulização (35 psi). Para a aquisição foi utilizado o intervalo de 100-2000 *m/z* com a taxa de aquisição de 1 espectro/s. Para melhor manuseio dos dados, estes foram armazenados no modo centroide. Uma vez que a técnica utilizada é do tipo de alta resolução, foi utilizado como parâmetro limitador o erro de massa no valor de,  $\pm 50$  ppm. A partir dos dados obtidos, foi utilizado o *software MassHunter - Qualitative Analysis* e comparado frente a um banco de dados *in house* de compostos típicos da espécie (DAMASCENO *et al.*, 2020; SIDANA, SINGH, SHARMA, 2016).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE *Prosopis juliflora*

##### 4.4.1 Avaliação da citotoxicidade celular *in vitro* dos extratos de *Prosopis juliflora*

Os testes de citotoxicidade e viabilidade celular foram realizados *in vitro* em linhagens de células do tipo 3T3 (embrião de rato): BALB/c 3T3 (ATCC CCL-163) e B16-F10 (melanoma de murino): (ATCC CCL-6475).

##### 4.4.2 Cultura de células

As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 1% (v/v) de solução de antibióticos contendo 10.000 UI.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 10,0 mg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de anfotericina

B, 4 mM de glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (OECD 129, 2010). As linhagens celulares foram replicadas e semeadas em placas de 96 poços com  $7 \times 10^4$  células por poço e mantidas em condições padrão (5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C, 97% UR) (Thermo Scientific®, 3425, Massachusetts, EUA). As células foram incubadas por 24 horas para aderência e 24 horas para o carenciamento.

#### 4.4.3 Avaliação da viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

A viabilidade celular do extrato de *P. juliflora* foi avaliada por meio do ensaio de redução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). Após o período de aderência e carenciamento, as células de linhagem 3T3 e B16-F10 foram submetidas a diferentes concentrações da amostra (0,1, 0,3, 0,5 e 1,0 mg/mL, diluídas em DMEM) de *P. juliflora* por 24 horas. Em seguida, o meio foi aspirado, e adicionados 100,0 µL de uma solução de MTT (1,0 mg/mL) e incubadas por 4 horas. Posteriormente, as placas foram agitadas por 10 minutos e a leitura das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro de placas (Biotek®, modelo Synergy HT, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e a viabilidade celular calculada de acordo com a equação 2:

$$VC (\%) = \left( \frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \right) \times 100 \quad (2)$$

**Onde:** VC é a viabilidade celular,  $DO_{amostra}$  é a densidade óptica do extrato,  $DO_{controle}$  é a densidade óptica do controle de células do teste.

## 4.5 ESTUDOS *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.5.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

As amostras foram avaliadas de acordo com o método descrito por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). Diferentes concentrações das amostras foram avaliadas (0,10; 0,15; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg/mL). As alterações colorimétricas foram avaliadas por espectrofotometria (Bio Tek, Epoch microplate spectrophotometer, EUA) no comprimento de onda de 517 nm. O teste foi realizado

em triplicata. A porcentagem de sequestro de radicais foi mensurada por meio da equação 3 abaixo:

$$Seq. Rad. DPPH (\%) = [1 - (Abs_{AMOSTRA} - Abs_{BRANCO})] \times 100 \quad (3)$$

#### 4.5.2 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada utilizando um método espectrofotométrico fundamentado na metodologia descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), na redução do Molibdênio<sup>+6</sup> a Molibdênio<sup>+5</sup>, resultando em um complexo esverdeado denominado Fosfato/Molibdênio<sup>+5</sup> em meio ácido. Os tubos de vidro contendo as amostras e os reagentes (ácido sulfúrico a 0,6 M, fosfato de sódio a 28 mM e molibdato de amônia a 4mM) foram incubados a 95°C por 90min. A leitura foi realizada a 695 nm (Bio Tek, Epoch microplate spectrophotometer, EUA) e uma curva padrão foi delineada utilizando o ácido ascórbico como padrão (0,001; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020 e 0,025 mg/mL). Os testes foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos na forma de equivalentes de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/ g de amostra).

#### 4.5.3 Poder redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com o método descrito por Wang e colaboradores (2008). Diferentes concentrações das amostras (0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg/mL) foram solubilizadas em tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e incubadas com ferrocianeto de potássio (1%) a 50°C por 20 min. A reação foi finalizada com a adição de ácido tricloroacético (10%) e posteriormente homogeneizada com água destilada e cloreto de ferro III (0,1%). A absorbância foi mensurada a 700 nm (Bio Tek, Epoch microplate spectrophotometer, EUA). O experimento foi feito em triplicata. O resultado foi expresso como porcentagem de atividade correspondente a massa de ácido ascórbico.

#### 4.5.4 Quelação de íons de cobre (Cu<sup>2+</sup>)

Foi avaliada a capacidade da amostra em quelar o íon cobre (Cu<sup>2+</sup>) por meio do método descrito por Anton (1960). Diferentes concentrações da amostra (0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 mg/mL), solubilizadas em tampão acetato de sódio (pH

6,0), foram adicionadas a uma solução reagente (piracotecol 4mM e sulfato de cobre II pentahidratado) e mensuradas a 632 nm (Bio Tek, Epoch microplate spectrophotometer, EUA). De forma semelhante, uma curva padrão foi delineada utilizando o EDTA dissódico como padrão (0,005; 0,0065; 0,0080; 0,0095; 0,0200; 0,0350 e 0,0500 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos de acordo com a equação 4.

$$\text{Quelação de Cobre (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{Abs_{AMOSTRA} - Abs_{BRANCO}}{Abs_{BRANCO}} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

#### 4.5.5 Quelação de íons de ferro (Fe<sup>2+</sup>)

A capacidade das amostras em quelar o íon ferro foi avaliado espectrofotometricamente por meio de método adaptado de Decker e Welch (1990) em um comprimento de onda de 562nm (Bio Tek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Diferentes concentrações da amostra (0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg/mL) foram adicionadas de uma solução reagente (FeCl<sub>2</sub> 2mM, Ferrozina 5 mM) incubadas em temperatura ambiente por 10 min. De forma semelhante, uma curva padrão foi delineada utilizando o EDTA dissódico como padrão (0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos de acordo com a equação 5.

$$\text{Quelação de Ferro (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{Abs_{AMOSTRA} - Abs_{BRANCO}}{Abs_{BRANCO}} \right) \right] \times 100 \quad (5)$$

#### 4.5.6 Sequestro de radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

O extrato liofilizado das folhas de *P. juliflora* foi avaliado nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL. Foram adicionadas as diferentes concentrações para um volume final de 200,0 µL em tampão fosfato 50 mM pH 7,4. Para o controle negativo e o branco foram utilizados 200,0 µL de tampão fosfato 50 mM pH 7,4. Soluções de metionina (200,0 µL), EDTA (200,0 µL), NBT (200,0 µL) e riboflavina (200,0 µL) foram adicionadas aos tubos teste e controle. A solução branco foi protegida da luz e posteriormente adicionado solução de riboflavina (200,0 µL). Os tubos foram submetidos à agitação e posteriormente levados à câmara de fotoluminescência (Ethiktechnology® Rholder, 424/CF, Brasil) por um período de 15 minutos, simulando a luz solar. A solução branco permaneceu protegida da luz

durante todo o ensaio. Como controle positivo foi utilizado ácido gálico (DASGUPTA; DE, 2004). Todo o experimento foi realizado em triplicata. A absorbância foi mensurada a 560 nm (Spectrophotometer, mod. BEL 1105, Brasil) e o percentual de sequestro de radicais superóxido foi utilizado para expressar os resultados de acordo com a equação 6:

$$\text{Sequestro de radicais superóxido (\%)} = \frac{\text{Abs controle} - \text{abs amostra}}{\text{Abs controle} - \text{abs branco}} \times 100 \quad (6)$$

#### 4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTITIROSinASE DO EXTRATO DE *Prosopis juliflora*

A atividade inibitória da enzima tirosinase foi investigada por meio de um ensaio espectrofotométrico associando as metodologias descritas por: Khatib *et al.* (2005) e Laosirisathian *et al.* (2020). O extrato de *P. juliflora* foi previamente filtrado (0,45 µm) para remoção das possíveis partículas suspensas. Assim, 90,0 µL da enzima tirosinase (100 unidades/mL) foram adicionadas em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) e 10,0 µL de extrato nas concentrações 10 mg/mL (1%) e 30 mg/mL (3%) em uma placa de 96 poços de fundo plano (Costar, Corning Ltd., Sunderland, Reino Unido). Em seguida, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, 100,0 µL de L-tirosina 2,5 mM foram adicionados, e foi incubado à temperatura ambiente por mais 30 min. L-tirosina foi usada como substrato para a tirosinase de cogumelo. O tampão fosfato de sódio (pH 6,5) foi utilizado como controle negativo. A leitura das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro de placas (Biotek®, modelo Synergy HT, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 475 nm usando um detector multimodo (Beckman Coulter DTX880, Fullerton, CA, EUA) e uma curva padrão foi delineada utilizando o ácido kójico como padrão (10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 e 60,0 µg/mL). O teste foi realizado em triplicata. A atividade antitirosinase foi calculada usando a Equação (7):

$$\text{Atividade antitirosinase: } \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{absorbância do extrato})}{\text{Controle negativo}} \times 100 \quad (7)$$

## 4.7 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES

### 4.7.1 Estudo das matérias-primas

Realizou-se um estudo das matérias-primas viáveis para o desenvolvimento das formulações. As matérias-primas selecionadas foram apresentadas pelo *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI). A nomenclatura, nome comercial e respectivas funções estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Matérias-primas selecionadas para a obtenção das emulsões, nomes comerciais e respectivas funções.

Nomenclatura (INCI)	Nome comercial	Função
<i>Disodium EDTA</i>	EDTA	Quelante
<i>Phenoxyethanol (and) Ethylhexyl Glycerin</i>	ProTeg SL	Conservante
<i>Distilled Water</i>	Água destilada	Veículo
<i>Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7</i>	Focus gel	Agente espessante auto emulsionante previamente neutralizado
<i>Extract of Anacardium occidentale</i>	Plantus 360	Base autoemulsionante com polímero aniônico espessante
<i>Sodium Acrylates Copolymer Lecithin</i>	Lecigel	Agente geleificante com propriedade emulsionantes

Fonte: Autoria própria.

### 4.7.2 Preparo das emulsões

As emulsões foram preparadas pelo processo de emulsificação a frio. A escolha da formulação teve como objetivo a obtenção de emulsão do tipo O/A com o extrato de *P. juliflora*. A composição das formulações está descrita na Tabela 3.

Inicialmente, em um recipiente, foi preparada a fase A: o EDTA e o extrato foram solubilizados no volume total de água destilada da formulação e em seguida, foi adicionado o ProTeg SL. Em outro recipiente, pesou-se a fase B (Focus gel) e/ou a fase C (Plantus 360). A este recipiente sob a agitação de 290 rpm (Ika, mod. RW 20 digital, Alemanha), adicionou-se a fase A. Essa mistura ficou sob agitação por 25 minutos. Em seguida, foi adicionada a fase D (Lecigel) e foi submetida a agitação (290 rpm) por 15 minutos. Todas as formulações foram preparadas em três lotes.

#### **4.7.3 Análise macroscópica das formulações**

A análise macroscópica foi realizada após vinte e quatro horas do preparo das formulações, observando as características organolépticas (cor, odor e aspecto) e a homogeneidade das formulações para que fenômenos de instabilidade tais como cremeação, floculação e coalescência fossem identificados (FERRARI, 1998, 2002). Foram utilizados os seguintes critérios de registros para as observações: normal ou sem alterações (N); levemente modificada (LM); modificada (M) e intensamente modificada (IM) (ANVISA, 2004; FERRARI, 1998, 2002).

As formulações que mantiveram as características macroscópicas inalteradas foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar.

**Tabela 3** - Composição das emulsões com extrato de *P. juliflora*.

Formulações	Fase A (%)				Fase B (%)	Fase C (%)	Fase D (%)
	EDTA	Proteg SL	Água destilada	Extrato	Focus gel	Plantus 360	Lecigel
F1	0,05	0,50	94,45	3,00	-	-	2,00
F2	0,05	0,50	92,45	3,00	2,00	-	2,00
F3	0,05	0,50	92,45	3,00	-	2,00	2,00
F4	0,05	0,50	90,45	3,00	2,00	2,00	2,00

**Fonte:** Autoria própria.

## 4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

### 4.8.1 Avaliação da estabilidade preliminar

#### 4.8.1.1 Teste de centrifugação

Em tubo cônico para centrifuga foram adicionadas 10,0 g de cada formulação e submetidas a 3000 rpm durante trinta minutos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (FERRARI, 1998, 2002; LIMA *et al.*, 2008; PIANOVSKI *et al.*, 2008).

As amostras que não apresentaram alterações no teste de centrifugação foram submetidas aos testes de estresse térmico.

#### 4.8.1.2 Estresse Térmico

As amostras foram mantidas por cinco dias em estufa a  $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . As avaliações foram realizadas após 24 horas do preparo ( $t_0$ ) e ao final do quinto dia ( $t_5$ ) (BARRETO *et al.*, 2017), de acordo com os seguintes parâmetros:

##### 4.8.1.2.1 Análise macroscópica

Realizada conforme descrito no item 4.7.3

##### 4.8.1.2.2 Determinação do valor do pH

Em um tubo de ensaio foram adicionados 1,0 g da amostra e 9,0 g de água recém destilada, homogeneizadas e determinado o valor do pH, inserindo o eletrodo (Hanna Instruments, mod. HI 21) diretamente na amostra diluída (DAVIS, 1977).

##### 4.8.1.2.3 Determinação da viscosidade mínima aparente

A determinação da viscosidade foi realizada em viscosímetro (Brookfield– modelo RV-III, EUA) tipo cone e placa, acoplado a um *Software Rheocalc* versão V3.01. Os parâmetros foram determinados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  utilizando o *spindle* CP 52 ( $d=12$  mm,  $\theta =3.00$ ) e 0,5 g de cada amostra. Os reogramas foram obtidos com curvas ascendentes e descendentes com aumento da velocidade de rotação progressivo (1-10 rpm) para obter-se a curva ascendente, o procedimento foi repetido no sentido inverso com a diminuição das velocidades (10-1 rpm) para obter-se a curva descendente. As medidas foram realizadas em intervalos de 2 rpm, mantendo a rotação durante 10 segundos em cada velocidade (FERRARI; ROCHA-

FILHO, 2011; LIMA *et al.*, 2008).

#### **4.8.2 Avaliação da estabilidade acelerada**

As emulsões consideradas estáveis no estudo de estabilidade preliminar foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada. As amostras foram preparadas e acondicionadas em frascos de vidro (15,0 g por frasco) e submetidas a condições variáveis de temperatura por 60 dias:  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Geladeira Consul, Mod. 280, Brasil), temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e estufa (Nova Ética, mod. 420-CLDTS150, Brasil) ( $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). As leituras foram realizadas 24h após o preparo e após 30 e 60 dias (ANVISA, 2004; FERRARI; ROCHA-FILHO, 2011). Os parâmetros avaliativos foram: determinação do valor do pH (4.8.1.2.2), viscosidade mínima aparente (4.8.1.2.3). Foram preparados três lotes e as avaliações realizadas em triplicata em cada lote.

#### **4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados dos testes para avaliação das estabilidade preliminar das emulsões foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e analisados pelo *t-student*. Na estabilidade acelerada os resultados nas emulsões foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e analisados por meio do teste ANOVA e o pós teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$  estatisticamente significativo, utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 8.0.2.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Durante o processo de produção de extratos, existem diversos fatores que podem influenciar nos rendimentos dos extratos finais, como tipo de solvente, metodologia de extração aplicada, tempo, temperatura e pressão (CELEP *et al.*, 2019). Além disso, outros fatores como espécie do gênero, o tipo de tecido vegetal empregado, período e região da colheita podem contribuir para as mudanças nos rendimentos (ROSA *et al.*, 2008).

O extrato obtido após o processo de liofilização apresentou-se na forma de pó, com aspecto cristalino com coloração amarelada/alaranjada e característica higroscópica (Figura 4). Após esse processo de secagem, foi obtido um total de 99,24 g de extrato seco (200,51 g foi o peso total de frutos utilizados). Dessa forma, o rendimento após as condições de extração foi de 49,49%. Valor este superior aos rendimentos encontrados na literatura, que apresentaram uma variação de rendimento entre 14% (LÓPEZ-FRANCO *et al.*, 2013; RINCÓN *et al.*, 2014) e 38% (Damasceno *et al.*, 2020), para estudos que utilizaram os frutos de *P. juliflora* e metodologias semelhantes.

Damasceno e colaboradores (2020) utilizaram a mesma metodologia de extração, contudo o tempo de liofilização foi de 96 h. Assim, essa alteração no parâmetro de tempo de liofilização pode ter interferido na umidade residual do extrato e, conseqüentemente, diminuído o valor do rendimento. Prosapio e Norton (2017) relataram que maiores tempos de liofilização proporcionam menores valores de umidade nos extratos. Isso faz com que o peso final do extrato e o rendimento sejam menores devido à remoção da água.

**Figura 4** – Extrato liofilizado de *Prosopis juliflora*.



**Fonte:** Autoria própria.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

### 5.2.1 Compostos fenólicos totais e flavonoides totais

Os compostos fenólicos têm ação antioxidante devido à sua predisposição em doar hidrogênios ou elétrons, além de possuírem em sua composição radicais intermediários estáveis, que bloqueiam a oxidação de várias células. Desse modo, compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, são capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de diversos sistemas celulares, exercendo efeitos benéficos sobre o organismo (D'AMELIA *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2022).

A ação antioxidante dos flavonoides está relacionada com a sua estrutura química. Assim, a quantidade de substituintes hidroxila que os flavonoides apresentam em sua constituição, a ligação entre o maior número desses substituintes e o aumento da atividade do composto flavonoide são fatores que influenciam no efeito de inibir ou retardar os processos de oxidação gerados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo humano. Além disso, os flavonoides possuem a capacidade de ação inibitória de diversas espécies oxidantes como superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxila (D'AMELIA *et al.*, 2018; SAMEC *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos mostraram que a concentração dos fenóis totais e flavonoides totais foram respectivamente,  $0,21 \pm 0,01$  mg GAE/g e  $1,71 \pm 0,26$  µg EQ/mg.

Salari e colaboradores (2019) avaliaram *in vitro* o potencial antioxidante do extrato da fruta de *Prosopis farcta* e os valores de flavonoides totais e fenóis totais foram, respectivamente,  $283,33 \pm 3,09$  mg EQ/mg e  $366,21 \pm 3,03$  mg/g GAE. A diferença observada nos teores de fenóis e flavonoides pode ser justificada pela espécie da planta (FERREIRA *et al.*, 2016). Além disso, os autores utilizaram a água deionizada sob temperatura por 30 minutos como processo extrativo. O solvente e a temperatura pode alterar as concentrações dos flavonoides e fenóis no extrato obtido (AGCAM; AKYILDIZ; EVRENDILEK, 2014; SINGH *et al.*, 2015).

### 5.2.2 Caracterização química pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo *Time-of-flight* (LC-MS-TOF)

Devido a limitação desse banco de dados, só foi possível a anotação de

alguns metabólitos secundários do tipo flavonoides e saponinas, bem como alguns de seus respectivos derivados glicosídicos.

Inicialmente, no modo positivo, foram anotadas 19 substâncias, que após o critério estabelecido, foram confirmadas 12 substâncias. Para o modo negativo, também foram inicialmente identificadas 19 substâncias, mas apenas 9 atingiram o critério (APÊNDICE A e B). Entre os dois modos, 7 substâncias estão em comum anotadas, sendo elas: triptofano, genisteína 8-C-glicosídeo, acetato de 5-(6-acetiloxi-3,5,7-trimetoxi-4-oxocromen-2-il)-2-metoxifenilo, apigenina-6-C-glicosídeo-8-C-arabinosídeo, apigenina-6,8-di-C-glicosídeo, isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (Narcisino) e 5,7-dihidroxi-flavona, sendo um fator que corrobora para a confirmação da presença dessas substâncias no extrato obtido. Além disso, 5 substâncias foram anotadas exclusivamente no modo positivo e 2 exclusivamente no modo negativo. Todas as substâncias identificadas estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4 a seguir, incluindo aquelas que não atingiram os critérios estabelecidos como parâmetro limitador do erro de massa de  $\pm 50$  ppm.

**Tabela 4** – Compostos identificados por LC-MS-TOF no modo positivo (continua).

<b>COMPOSTO</b>	<b>MASSA TEÓRICA (m/z)</b>	<b>MASSA EXPERIMENTAL (m/z)</b>	<b>ERRO (PPM)</b>	<b>TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)</b>	<b>NOME DO COMPOSTO</b>
1	205,0972	205,1026	-26,3290	2,473	Triptofano
2	2873055	287,1447	-312,4837	10,425	Luteolina/Canferol*
3	300,2897	300,2962	-21,6458	18,625	Julifloridina
4	301,0707	301,1483	-257,7468	29,112	Canferol 3-O-metil eter*
5	314,3054	314,3126	-22,9077	18,957	N-metil julifloridina
6	343,1235	343,1573	-98,5068	1,761	Trealose*
7	361,1646	361,1545	27,9651	4,113	(-)-Iariciresinol
8	433,1129	433,1212	-19,1636	13,854	Genisteina 8-C-glicosídeo
9	449,1078	449,1714	-141,6141	7,277	Luteolina 7-O-glicosídeo*
10	459,1286	459,1197	19,3845	0,783	Acetato de 5-(6-acetiloxi-3, 5, 7 –trimetoxi-4-oxocromen-2-il)-2-metoxifenilo
11	495,1133	495,1568	-87,8587	13,655	Patulitrina*
12	565,1552	565,1673	-21,4100	12,993	Apigenina-6-C-glicosídeo-8-Carabinosídeo
13	595,1658	595,1782	-20,8345	12,148	Apigenina-6,8-di-C-glicosídeo/Saponarina
14	625,1763	625,1884	-19,3545	14,815	Isorhamnetina -3-O-rutinosídeo (Narcisina)
15	257,0808	257,0714	36,5644	1,694	5,7- dihidroxiflavona
16	331,1176	331,1356	-54,3614	11,204	7-O-Metileucomol*

**Tabela 4** – Compostos identificados por LC-MS-TOF no modo positivo (conclusão).

17	429,2999	429,3265	-61,9613	31,266	Botogenina/ dehidrohecogenina*
18	447,3105	447,3113	-1,7885	34,496	Manogenina
19	741,2237	741,235	-15,2451	13,407	Canferol 3-(2"-rhamnosylrutinosídeo)

**Onde:** \* Compostos destacados apresentaram o erro em massa de  $\pm 50$  ppm. **Fonte:** Autoria própria.

**Tabela 5** – Compostos identificados por LC-MS-TOF no modo negativo (continua).

COMPOSTO	MASSA TEÓRICA (m/z)	MASSA EXPERIMENTAL (m/z)	ERRO (PPM)	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	NOME DO COMPOSTO
1	203,0826	203,085	-11,8179	2,255	Triptofano
2	239,0139	239,0591	-189,1103	5,27	3',6-dimetilflavone*
3	285,0405	285,063	-78,9362	2,487	Luteolina/Canferol*
4	417,0827	417,1057	-55,1449	4,541	Canferol 3-O-arabinosídeo*
5	431,0984	431,1003	-4,4073	13,57	Genisteina 8-C-glicosídeo
6	457,114	457,0998	31,0645	7,277	Acetato de 5-(6-acetiloxi-3, 5, 7 –trimetoxi-4-oxocromen-2-il)-2-metoxifenilo
7	563,1406	563,1445	-6,9254	12,974	Apigenina-6-C-glicosídeo-8-Carabinosídeo
8	593,1512	593,1545	-5,5635	12,112	Apigenina-6,8-di-C-glicosídeo/Saponarina
9	609,1461	609,1441	3,2833	11,499	Quercetina 3-O-rutinosídeo
10	623,1618	623,1634	-2,5676	14,796	Isorhamnetina -3-O-rutinosídeo (Narcisina)

**Tabela 5** – Compostos identificados por LC-MS-TOF no modo negativo (conclusão).

11	255,0663	255,0554	42,7340	1,51	5,7- dihidroxiflavona
12	283,0976	283,0712	93,2541	0,979	dihidro-bonducelina*
13	329,1031	329,2357	-402,9133	19,898	7-O-Metilleucomol*
14	431,3167	431,0995	503,5743	13,819	12-epi- Rockogenina/Barbourgenina/Clorogenina/Gitogenina/Rockogenina/Ruizgenina*
15	591,3539	591,3222	53,6058	13,852	Agavoside A*
16	593,3695	593,1545	362,3375	12,112	Clorogenina 3-O-b-D-glucopiranosídeo/ Clorogenina 6-O-b-D- glucopiranosídeo*
17	755,204	755,2052	-1,5890	12,808	Canferol 3-rutinosídeo-4'-glucosídeo
18	769,4016	769,2186	237,8472	13,752	(25R)-5a-Spirostan-3b,6a-diol-12-one 3,6-di- O-b-D-glucopiranosídeo*
19	787,4122	787,2653	186,5605	13,322	Agamenosídeo H*

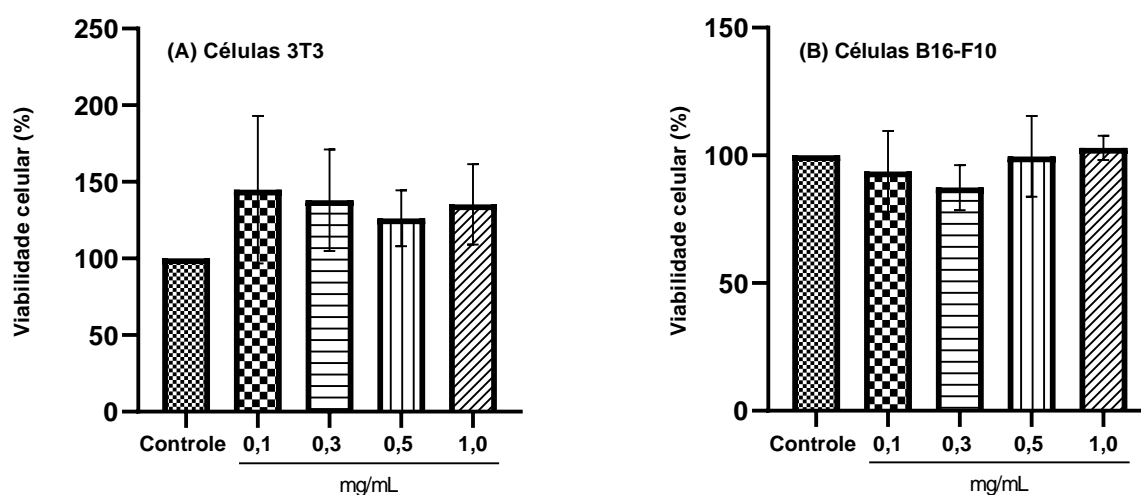
**Onde:** \* Compostos destacados apresentaram o erro em massa de  $\pm 50$  ppm. **Fonte:** Autoria própria.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO DE *Prosopis juliflora*

#### 5.3.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Nas diferentes concentrações avaliadas, o extrato de *P. juliflora* apresentou uma viabilidade celular superior a 90% para as linhagens de 3T3 e B16-F10 (Figura 5) não sendo possível calcular a concentração inibitória 50% (IC50), pois na maior concentração testada não teve 50% de redução de morte celular.

**Figura 5** – Viabilidade celular em linhagens 3T3 e B16-F10 do extrato de *Prosopis juliflora*.



Diversos ensaios colorimétricos, fluorimétricos e fundamentados em luminescência de alto rendimento foram desenvolvidos e otimizados para avaliar a viabilidade de células diretamente no formato de placas de 96 poços usando um espectrofotômetro de varredura de poços múltiplos. O princípio desses ensaios depende da conversão do substrato em produto cromogênico (COOK; MITCHELL, 1989). Um dos métodos viáveis e amplamente utilizado para analisar a viabilidade celular é o de ensaio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol--2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]. Esse método, pode ser usado para determinar a citotoxicidade de potenciais agentes medicinais e materiais tóxicos, uma vez que esses agentes estimulariam ou inibiriam a viabilidade e o crescimento celular. (GOKDUMAN; GOK, 2020; STOCKERT *et al.*, 2018).

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um sal de tetrazólio amarelo solúvel em água. O MTT é reduzido nas mitocôndrias de células

metabolicamente ativas pela succinato desidrogenase para formar um cristal de formazan roxo insolúvel em água (GARN *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1997; PENG, WANG; REN, 2005; VOSTÁLOVÁ *et al.*, 2018), que sua medição pode ser avaliada espectrofotometricamente após o processo de solubilização. A quantidade total de formazan produzida está diretamente ligada ao número de células viáveis na cultura. (BURANAAMNUAY, 2021). A permeabilidade do MTT às membranas celulares é possível devido à sua carga líquida positiva, enquanto os demais ensaios em sais tetrazólios (MTS e XTT) possuem uma carga líquida negativa e impermeável à célula. Desse modo, o ensaio MTT é caracterizado como um método padrão para avaliar a viabilidade celular (PENG; WANG; REN, 2005; SHOEMAKER; COHEN; CAMPBELL, 2004).

Mosmann (1983) foi o responsável por descrever que a produção de MTT-formazan era proporcional ao número de células metabolicamente viáveis. Este teste é fundamentado na análise quantitativa da atividade da desidrogenase dos produtos da reação NADH ou NADPH, que por sua vez reduz a atividade formazan do MTT em células viáveis. Alterações na atividade de dezenas de oxidoredutases mitocondriais e não mitocondriais, perturbações metabólicas e energéticas celulares e estresse oxidativo podem afetar significativamente a leitura do ensaio MTT sendo, portanto, uma ferramenta interessante na avaliação do efeito citotóxico de extratos e moléculas sobre diferentes tipos de culturas celulares (HOLDER *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2019).

Desse modo, o teste de citotoxicidade *in vitro* é essencial no processo de caracterização inicial da biocompatibilidade de biomateriais que visam aplicação clínica e promove uma investigação do efeito do extrato sobre as células estudadas (WAHAB; AZIZUL; IBRAHIM, 2020). Desse modo, o extrato de *P. juliflora* por não apresentar ação citotóxica em linhagens 3T3 e B16-F10, pode ser considerado seguro para aplicação em formulações cosméticas. Assim, as demais etapas do estudo foram realizadas (GOKDUMAN; GOK, 2020).

Damasceno *et al.* (2020) realizaram testes de segurança para extrato de *P. juliflora* por metodologias *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro*, foram realizados em cultura de células fibroblastos 3T3 (embrião de rato): BALB/c 3T3, bem como em cultura de células HaCat e a viabilidade celular também foi avaliada utilizando o MTT. Na metodologia *in vivo*, o teste foi realizado pela avaliação da compatibilidade cutânea, com 19 indivíduos voluntários, ambos os sexos, com fototipo de pele de I a

IV e idade entre 20 e 67 anos. Nesse experimento foram fixados quatro apósitos para testes de contato (*patch test*) na parte superior do dorso dos voluntários, cada um contendo 20,0 µL de uma solução contendo 0,5% e 3,0% do extrato de *P. juliflora*. Nas duas metodologias empregadas os extratos de algaroba foram considerados seguros para serem incorporados em produtos cosméticos.

#### 5.4 ESTUDOS *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 5.4.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Os resultados para avaliação do sequestro do radical DPPH estão demonstrados na Tabela 6. É possível observar que o extrato avaliado foi capaz de sequestrar o radical DPPH de forma concentração dependente em todo o intervalo de concentrações testado.

**Tabela 6** - Atividade antioxidante de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) pelo extrato de *Prosopis juliflora*.

Concentração (mg/mL)	Atividade (%)
2,00	3,54 ± 0,59
3,00	6,30 ± 0,38
4,00	8,74 ± 0,10
5,00	13,65 ± 0,24
8,00	21,53 ± 0,57
10,00	24,17 ± 0,81

**Fonte:** Autoria própria. Dados foram expressos como média ± desvio padrão

A eliminação de radicais livres é um dos mecanismos conhecidos pela qual os antioxidantes bloqueiam a oxidação lipídica. Este teste é um ensaio bastante empregado em estudos de atividade antioxidante. É uma técnica rápida para triagem da atividade de eliminação de radicais de compostos específicos, sendo um dos procedimentos com alto grau de sensibilidade e reprodutividade (OLIVEIRA *et al.*, 2016). O método de DPPH, é frequentemente usado para determinação da capacidade antioxidante de alimentos, bebidas e extratos vegetais. Tanto os cromógenos quanto os compostos radicais podem reagir diretamente com antioxidantes (GULCIN, 2020).

Aquino-Martins e colaboradores (2019) realizaram um estudo para identificar o perfil fitoquímico e as atividades biológicas, incluindo a atividade antioxidante, de seis polpas de extratos de *Melocactus zehntneri*, espécie também pertencente a Caatinga. Os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH de todos os extratos a 25,0 µg/mL mostraram 60% de atividade que, segundo os autores confirmava a atividade antioxidante das amostras. Na presente pesquisa na concentração de 10,0 mg/mL foi encontrada a maior atividade de antioxidante pelo método DPPH de 24,17% ± 0,81, isso demonstrou que maiores concentrações testadas do extrato de algaroba apresentaram uma maior atividade antioxidante pelo método DPPH.

Damasceno e colaboradores (2020), utilizando uma fração purificada, rica em polissacarídeos, do extrato de *P. juliflora*, observaram uma atividade de 58,5% (0,25mg/mL). A maior atividade observada pelos autores pode ser justificada pelo processo de purificação que aumentou a atividade antioxidante do extrato sobre o radical DPPH ao retirar alguns compostos que podem ser inativos para participar na eliminação de radicais DPPH, concentrando também os compostos ativos (Zhao *et al.*, 2022). Por outro lado, esta pesquisa apontou que mesmo sem as etapas de purificação, o extrato de *P. juliflora* manteve sua propriedade antioxidante, demonstrando uma vantagem, especialmente, para a aplicação como insumo para formulações cosméticas .

#### **5.4.2 Capacidade antioxidante total (CAT)**

Foram observados valores da capacidade antioxidante total equivalente a 25,06 mg/g de ácido ascórbico, na concentração de 5,0 mg/mL. Damasceno e colaboradores (2020) ao analisarem a amostra purificada do extrato de *P. juliflora*, observaram um CAT de 11,21 mg/g de ácido ascórbico (5,0 mg/mL). Isso pode demonstrar que os extratos sem processos de purificação, por apresentarem uma matriz complexa de metabólitos secundários, como os carotenóides, os polissacarídeos e os compostos fenólicos e especialmente os flavonóides, podem promover aumento dos valores da capacidade antioxidante total (SCHAFRANSKI *et al.*, 2019; TOHMA *et al.*, 2016).

Ghanimi e colaboradores (2022) realizaram o teste CAT seguindo a mesma metodologia empregada nesse trabalho. No entanto, prepararam extratos com diferentes solventes com a *Lavandula mairei* Humbert. Foram obtidas soluções

extrativas etanólica, metanólica, acetato de etila e aquosa, onde a primeira apresentou maior valor ( $176,34 \pm 2,4$  mg/g de ácido ascórbico), demonstrando assim que o tipo de solvente utilizado no processo extrativo influenciou no resultado gerado. Além disso, espécies vegetais diversas possuem concentrações de compostos primários e secundários diferentes e isso interfere na capacidade antioxidante total (ISAH, 2019; WINK, 2016).

Analisando o fundamento desta metodologia, as substâncias antioxidantes presentes no extrato podem atuar como doadores de elétrons, bem como por meio do potencial em sequestrar espécies reativas de oxigênio, tanto em função da presença dos flavonoides, quanto pela presença dos grupamentos hidroxilas presentes nos açúcares encontrados na espécie. Esses grupamentos atuam como doares de hidrogênio para estabilização das espécies reativas (ZHANG; LIU; LIN, 2014).

Apenas uma metodologia *in vitro* antioxidante é insuficiente para afirmar que o extrato tem essa ação, portanto, outros testes que envolvam a capacidade antioxidante para o extrato de *P. juliflora* foram realizados para que fosse possível determinar potencial uso antioxidante em formulações cosméticas.

#### 5.4.3 Poder redutor

O poder redutor é um dos testes utilizado para avaliar a atividade antioxidante em compostos químicos naturais (YEN; CHEN, 1995). A Tabela 7 apresenta os resultados da atividade antioxidante nas diferentes concentrações do extrato de *P. juliflora* testada.

**Tabela 7** - Resultado da determinação de poder redutor do extrato de *Prosopis juliflora*.

Concentração (mg/mL)	Atividade (%)
0,25	$0,02 \pm 0,04$
1,00	$7,46 \pm 0,14$
2,00	$11,69 \pm 0,82$

**Fonte:** Autoria própria. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Assim como na avaliação do sequestro do radical DPPH, o presente estudo apresentou menor capacidade de redução dos radicais, quando comparado ao já

publicado na literatura para a fração purificada do extrato de *P. juliflora* (Damasceno *et al.*, 2020). O valor acima do que foi observado para o extrato de *P. juliflora* em estudo na mesma concentração pode ser justificado, mais uma vez, pelo processo de purificação por ultrafiltração por centrifugação, que é utilizado para compostos com baixo peso molecular, que para aquele trabalho, poderiam ser consideradas como interferentes (WANG *et al.*, 2018a; WANG *et al.*, 2018b).

Ensaio de sequestro de radicais DPPH, capacidade antioxidante total e o poder redutor são testes utilizados para avaliar a atividade de moléculas na fase inicial da cascata de produção de radicais livres (RADI, 2018; SOTO-MADRID *et al.*, 2021). Assim, analisando os resultados obtidos a partir dessas metodologias é possível afirmar que o extrato de *P. juliflora* atua nessa fase da cascata. A metodologia utilizada nessa pesquisa apresenta menos etapas favorecendo o escalonamento e, além disso é possível sugerir que é um extrato candidato para atuar como um antioxidante em formulações cosméticas.

#### 5.4.4 Quelação de íons de Cobre (Cu<sup>2+</sup>) e Ferro (Fe<sup>2+</sup>)

Os resultados para os testes de quelação de íons cobre e de ferro estão demonstrados na Tabela 8. Os íons de cobre e de ferro são ativos em reações de oxirredução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. Assim, os agentes quelantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, catalisadores da peroxidação lipídica. Dessa forma, esses agentes sequestrantes minimizam também a produção de espécies reativas de oxigênio (KIM; KIM; KUMAR, 2019).

**Tabela 8** - Atividade antioxidante de quelação de cobre e ferro pelo extrato de *Prosopis juliflora*.

Concentração (mg/mL)	Quelação Cu <sup>2+</sup> (%)	Quelação Fe <sup>2+</sup> (%)
0,25	48,02 ± 1,83	-
0,50	65,37 ± 0,45	5,07 ± 0,07
1,00	66,48 ± 0,08	17,03 ± 2,02
2,00	66,60 ± 0,40	43,65 ± 1,10

**Fonte:** Autoria própria. Dados foram expressos como média ± desvio padrão

Nas mesmas concentrações utilizadas por Damasceno e colaboradores (2020), ao avaliarem o potencial antioxidante de uma fração de peso molecular

acima de 3Kda do extrato de *P. juliflora*, o extrato nesta pesquisa sem purificação apresentou maior atividade do que aquela purificada, demonstrando seu alto poder para se complexar com  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  na fase de propagação e possivelmente impedir a formação de radicais livres (SUBRAMANIAN; CHINTALWAR; CHATTOPADHYAY, 2021).

#### 5.4.5 Sequestro de radicais Superóxidos ( $\text{O}_2^-$ )

Os resultados para os testes de sequestro de radicais superóxido estão apresentados na Tabela 9. É possível observar que o extrato de *P. juliflora* apresentou maior ação de sequestro de radicais superóxidos na concentração de 0,25 mg/mL, que foi igual a 20,41%. Em estudo realizado por Zhao e colaboradores (2020) com o polissacarídeo isolado dos extratos de *Enteromorpha prolifera* viram que ao separar o polissacarídeo bruto em quatro frações, que foram purificadas em cromatografia, isoladas e a taxa de eliminação do radical superóxido PAP-1, na concentração de 1,00 mg/mL, foi de 54,27%  $\pm$  0,04. Desse modo, ao comparar o resultado do sequestro de radicais superóxidos com os resultados obtidos nos testes DPPH e ABTS, os autores analisaram que as propriedades bioativas de polissacarídeos extraídos de álcalis de *E. prolifera* possuem um potencial promissor para a atividade antioxidante. Damasceno e colaboradores (2020) demonstraram que o extrato de *P. juliflora* possui polissacarídeos como  $\alpha$ -glucanas, que podem estar contribuindo para o sequestro dos radicais superóxidos.

**Tabela 9** - Atividade antioxidante de sequestro de radicais superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ) pela amostra de *Prosopis juliflora*.

Concentração (mg/mL)	Sequestro $\text{O}_2^-$ (%)
0,25	20,41 $\pm$ 1,19
0,50	17,85 $\pm$ 10,08
1,00	16,19 $\pm$ 1,24
2,00	14,18 $\pm$ 9,82

**Fonte:** Autoria própria. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Em estudo realizado com polissacarídeos de *Porphyra haitanensis*, os autores obtiveram quatro amostras de carboidratos quimicamente purificados e avaliaram a

atividade contra radicais superóxido. Observaram que todas as amostras de polissacarídeos, dependente da concentração, possuíam atividade de eliminação de dos radicais  $O_2^-$ . Os valores explanados entre 44,78% a 56,39 indicando que todas amostras tiveram atividade menor que a Vitamina C (taxa de eliminação de 1,0 mg/mL é 92,78%) (WU *et al.*, 2020). Já Damasceno e colaboradores (2020) utilizando polissacarídeos purificados de *P. juliflora*, demonstraram atividade sequestrante do radical superóxido de 26,47%. O processo de purificação do extrato promoveu um aumento da atividade sequestradora de radicais superóxidos.

Os frutos de *P. juliflora* foram coletados há mais de 7 anos e mesmo sob congelamento a  $-20^\circ\text{C}$  podem sofrer perdas por degradação dos compostos primários e secundárias. Segundo Agostini-Costa e colaboradores (2003) e Yamashita *et al.* (2003) o processo de congelamento tende à preservar os alimentos para armazenamento a longo prazo. No entanto, mesmo em temperaturas abaixo de  $0^\circ\text{C}$ , algumas mudanças em teores de compostos ocorrem. A velocidade de congelamento e a estabilidade da temperatura durante o armazenamento são fatores que contribuem para a estabilidade. Gonçalves, Portari e Jordão (2019) relataram que o processo de congelamento de várias frutas, como pera, maçã, goiaba, entre outras houve diminuição significativa de teores de vitamina C, fenólicos totais e antocianinas após armazenamento por 8 semanas sob congelamento por  $-20^\circ\text{C}$ .

Diante do exposto, o extrato de *P. juliflora* atuou nas etapas de iniciação e propagação da cascata oxidativa: na fase da iniciação, de acordo com os testes de CAT, poder redutor e sequestro do DPPH e no sequestro dos radicais superóxido; na fase de propagação, impedindo a formação de radicais livres, conforme os testes de quelação de metais de cobre e ferro.

## 5.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTITIROSinASE DO EXTRATO DE *Prosopis juliflora*

### 5.5.1 Teste da enzima tirosinase

A Tabela 10 apresenta os resultados da atividade antitirosinase dos extratos de *P. juliflora* nas concentrações de 10 mg/mL (1%) e 30 mg/mL (3%).

**Tabela 10** - Atividade antitirosinase dos extratos de *Prosopis juliflora*.

Concentração (mg/mL)	Atividade antitirosinase (%)
10,00	59,95 ± 0,82
30,00	62,48 ± 2,09

**Fonte:** Autoria própria. Dados foram expressos como média ± desvio padrão.

O uso de inibidores de tirosinase como ácido kójico e hidroquinona está consolidado na indústria cosmética devido ao seu efeito antimelanogênico. Essas substâncias sintéticas podem causar reações adversas, como por exemplo, processos de irritação e/ou sensibilização da pele (RAUNIYAR *et al.*, 2014). Então os consumidores estão procurando alternativas aos produtos sintéticos em produtos naturais. O uso tradicional de plantas no tratamento de desordens da pele, principalmente para fins cosméticos, é uma prática comum na medicina popular de muitas culturas e pode ser uma indicação para a descoberta de melhores agentes para harmonização da coloração da pele (ZAIDI *et al.*, 2014). Alguns potentes inibidores da tirosinase, como cuminaldeído, resveratrol oxidado, canferol, quercetina e derivados do ácido gálico, foram isolados de várias plantas (RAUNIYAR *et al.*, 2014).

O teste *in vitro* enzimático utilizado nessa pesquisa concentra-se em ensaio óptico para detecção da atividade da tirosinase por meio da espectrofotometria. Esse método é o mais utilizado, pois apresenta baixo custo, sensibilidade e proporciona um estudo contínuo do processo reacional da cascata que converte tirosina ao biopolímero melanina (MALASPINA *et al.*, 2020). A L-DOPA e L-tirosinase podem ser utilizadas como substratos para formar os dopacromos (WINDER; HARRIS, 1991). Contudo, essa técnica apresenta limitações, pois durante o processo de oxidação dos substratos, os dopacromos que são formados apresentam instabilidade e baixo coeficiente de absorção em meio aquoso. Além disso, existem interferentes externos como temperatura e oxigênio que podem provocar interferências na execução do técnica. (DENG *et al.*, 2019; MANN *et al.*, 2018).

Nenhuma das concentrações estudadas para os extratos de *P. juliflora* apresentaram inibição enzimática superior a do ácido kójico, que na concentração de 60 µg/mL a atividade foi de 89,90%. A inibição apresentada pelo extrato na concentração de 30 mg/mL foi de 62,48 ± 2,09. Isso sugere que o extrato de algaroba possui capacidade de inibir o processo de oxidação da L-tirosina a

Dopaquinona, por meio da enzima tirosinase e, desse modo, podendo, possivelmente, impedir o processo de hiperpigmentação cutânea.

A tirosinase é uma metaloenzima oxidase contendo como substrato dois íons de cobre com atividade monofenolase (oxidação de L-tirosina em e L-dopa) e atividade difenolase (oxidação de L-dopa em dopaquinona), que é essencial para produção de melanina (PILLAIYAR *et al.*, 2018). Os agentes antioxidantes, como o ácido kójico, podem quelar esses íons de cobre no sítio ativo da tirosinase e impedir a melanogênese (ZAID; AI, 2019; ZILLES, *et al.*, 2022). Nesta pesquisa foi avaliada a quelação dos íons metálicos de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (conforme os resultados descritos no item 5.4.4). Se o extrato em estudo que apresenta o potencial de quelar cobre atuar pelo mesmo mecanismo de ação do ácido kójico, tem-se um bioativo com potencial de inibir a tironisa. Outros estudos devem ser realizados para comprovar o mecanismo antitirosinase do extrato de *P. Juliflora*.

A possível atividade de harmonização da coloração da pele exibida pelo extrato de *P. juliflora*, pode estar associada a sua composição química composta por fenólicos como, derivados de luteolina, apigenina e quercetina, que possuem atividade antitirosinase relatada na literatura (BURGER *et al.*, 2017; LALL *et al.*, 2015).

Há estudos sobre a inibição da tirosinase por compostos fenólicos de origem vegetal. Zolghadri *et al.* (2019), sugerem que a atividade antioxidante pode ser também uma das atividades essenciais para a atividade inibitória da tirosinase. Muitos fenóis são aceitos como substrato da enzima e a depender da posição da ligação dos grupos hidroxilas podem atuar como inibidores. Os grupos hidroxila podem formar ligações de hidrogênio no sítio ativo da tirosinase, resultando em impedimento estérico ou alterações conformacionais, levando a redução da atividade enzimática (BAEK *et al.*, 2008).

Zagórska-Dziok *et al.* (2022), ao avaliarem os efeitos antitirosinase de quatro tipos de extratos de *Schisandra chinensis* mostraram que todos foram inibidores da tirosinase. A porcentagem de inibição variou de 96,2% a 98,5%. Essa inibição foi correlacionada aos compostos fenólicos encontrados na análise cromatografia, a qual revelou que três grupos de compostos fenólicos foram predominantes no extrato analisado, incluindo lignanas, ácidos fenólicos e flavonoides e os ácidos protocatequicos e p-cumarilquínicos. Diferentes trabalhos abordam que compostos fenólicos produzidos por plantas podem interagir com a tirosinase inibindo-a

(BURGER *et al.*, 2017; OKOMBI *et al.*, 2006; ZEITOUN *et al.*, 2019).

Zeitoun *et al.* (2020) ao analisarem a atividade antitirozinase dos extratos das plantas *Combretum micranthum*, *Euphorbia hirta* e *Anacardium occidentale* demonstraram que essa capacidade de inibir a enzima tirosina está associada principalmente aos compostos fenólicos e triterpenóides, que foram identificados pelo técnica de espectrometria de massas de alta resolução.

Diante da atividade antitirozinase *in vitro*, o extrato de *Prosopis juliflora* atuou inibindo a enzima tirosinase na cascata da melanogênese. Dessa forma, pode-se sugerir que possui potencial antitirozinase para compor emulsões destinadas à harmonização da coloração da pele.

## 5.6 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

### 5.6.1 Testes preliminares de estabilidade

As emulsões foram manipuladas em três lotes, seguindo as composições apresentadas na Tabela 3 e após 24 horas foram avaliadas as características macroscópicas. As formulações que foram estáveis macroscopicamente foram submetidas ao teste de centrifugação por 30 minutos. A Tabela 11 mostra as características dessas formulações.

**Tabela 11** - Avaliação macroscópica das formulações após 24h de obtenção e do teste de centrifugação.

Formulações	Avaliação macroscópica após 24 horas de	
	obtenção	Centrifugação
F1	N	N
F2	N	N
F3	N	M
F4	N	M

**Onde:** M = modificada; IM=Intensamente modificada; LM = levemente modificada; N = normal ou sem alterações; NA = não avaliadas. **Fonte:** autoria própria.

O Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (2004) indica que as formulações devem ser submetidas a testes de estresse anteriormente ao início dos estudos de estabilidade. Todas as formulações após as 24 horas não apresentaram

sinais macroscópicas de instabilidades. Contudo, após o teste de centrifugação as formulações F3 e F4 apresentaram separação de fases e não seguiram para o teste de estabilidade preliminar.

O teste de centrifugação é responsável por gerar tensões na amostra, simular o aumento da gravidade, aumentar a mobilidade das partículas e possibilitar a previsão de possíveis instabilidades, que podem ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de corpos compactos, sedimentos e coalescência, dentre outros (ANVISA, 2004).

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos das formulações armazenadas a  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante cinco dias e avaliadas quanto ao valor do pH e viscosidade mínima aparente. Durante os estudos de estabilidade preliminar as formulações contendo o extrato liofilizado de *P. juliflora* apresentaram coloração marrom claro e o odor característico do extrato.

**Tabela 12** - Resultados do estudo de estabilidade preliminar das emulsões contendo (F1 e F2) 3% de extrato de *Prosopis juliflora* quanto ao valor de pH e a viscosidade mínima aparente.

Parâmetros avaliativos	Formulações	
	F1	F2
<b>Tempo inicial (Após 24 horas)</b>		
pH	5,91 $\pm$ 0,03	6,01 $\pm$ 0,02
Viscosidade mínima aparente (cP)	1430,97 $\pm$ 254,79	4432,36 $\pm$ 490,86
<b>Pós-Estresse térmico</b>		
pH	5,95 $\pm$ 0,00*	6,02 $\pm$ 0,01
Viscosidade mínima aparente (cP)	5861,70 $\pm$ 507,16*	4259,30 $\pm$ 281,74

**Onde:** \*p < 0,05 comparado com tempo inicial. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. n=9.

**Fonte:** Autoria própria.

Os estudos preliminares de estabilidade incluem testes durante os estágios iniciais de desenvolvimento do produto. Utilizam condições variáveis de temperatura, que geram um estresse térmico, com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os seus reagentes e o aparecimento de sinais observados e analisados de acordo com as características específicas de cada produto (ANVISA, 2004; CASTRO, 2014).

Após o estudo, apenas a formulação 1 apresentou variação significativa quanto ao valor de pH, como apresentado na Tabela 12.

A avaliação do pH é um dos parâmetros utilizados para monitorar alterações nas formulações, que nem sempre são detectáveis visualmente. Esta análise físico-química pode indicar problemas de estabilidade entre os componentes da formulação, que podem ser reações hidrolíticas e oxidativas ou alterações induzidas no processo de fabricação, como a contaminação bacteriana, que podem comprometer a qualidade, eficácia e segurança do produto final (ANVISA, 2004).

A diminuição ou aumento do pH das formulações em diferentes condições de armazenamento pode ser decorrente da geração de determinados metabólitos ácidos ou básicos ou da decomposição de um dos excipientes durante o aquecimento (AKHTAR *et al.*, 2011). Tais reações podem comprometer as propriedades iniciais e desejadas da formulação, o que poderia levar a considerá-la instável. Esta análise por si só não é suficiente para confirmar esta situação.

Durante o desenvolvimento de formulações cosméticas de uso tópico, a análise do pH é de extrema importância, pois permite obter informações sobre possíveis alterações que possam afetar seu uso e, assim, impedir sua aplicação na pele (ANVISA, 2004).

Na tabela 12 é possível observar que a viscosidade na F2 após o estresse térmico não apresentou variações estatísticas significantes.

A viscosidade é uma expressão da resistência de um fluido ao escoamento: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (ANVISA, 2004). Seus estudos indicam se um produto mantém suas propriedades intrínsecas e de fluxo na prateleira (TADROS, 2004). Mudanças significativas nesse parâmetro podem demonstrar, portanto, instabilidade, ou seja, a formulação não conseguirá manter suas propriedades iniciais a longo prazo, o que também pode comprometer a eficácia e a segurança.

Após o estresse térmico, a emulsão F1 apresentou variações estatísticas significantes no valor de viscosidade mínima aparente e no valor do pH. Sendo assim, apenas a formulação F2 foi considerada estável e prosseguiu para o estudo de estabilidade acelerada.

### **5.6.2 Estabilidade acelerada de 60 dias**

Após 60 dias de estocagem em diferentes condições de temperatura propostas para os testes de estabilidade acelerada foi observado que as formulações aditivadas com o extrato do *P. juliflora* armazenadas a 45°C apresentaram uma discreta alteração na coloração, em comparação às formulações iniciais com extrato (colocaração mudou para um marrom mais escuro).

Segundo o Guia de estabilidade de formulações cosméticas (2004), há fatores extrínsecos que interferem diretamente na estabilidade dos sistemas semissólidos como: tempo; temperatura; luz e oxigênio; umidade; material de acondicionamento; microrganismos e vibração. Esse segundo pode promover mudanças físico-químicas e gerar alterações no aspecto, cor, odor e viscosidade.

**Tabela 13** - Resultados do estudo de estabilidade acelerada das formulações com 3% de extrato de *Prosopis juliflora* submetidas em diferentes condições de temperatura.

Parâmetros avaliativos	Formulações			
	t0	Temp. ambiente 25 ± 2°C	Temp. geladeira 4 ± 2°C	Temp. estufa 45 ± 2°C
		t60	t60	t60
	F2	F2	F2	F2
Características macroscópicas	N	N	N	N
Valor do pH	5,89 ± 0,11	5,72 ± 0,35	5,59 ± 0,08*	5,21 ± 0,04*
Viscosidade mínima aparente (cP)	4467,08 ± 286,77	5264,21 ± 622,24	4963,40 ± 232,15	5630,37 ± 1361,11

**Onde:** \*p < 0,05 comparado com tempo inicial. Dados foram expressos como média ± desvio padrão. n=9.

**Legenda:** N= Normal; t0 = Após 24h da produção da formulação; t60 = Após 60 dias da produção da formulação.

**Fonte:** Autoria própria.

Com relação aos valores de pH, após os 60 dias (Tabela 13), as formulações (F2) armazenadas a 4°C e 45°C apresentaram variações estatísticas. Entretanto, os valores de pH das emulsões mantiveram-se entre 5,21 e 5,89, que são valores aceitáveis para produtos tópicos (CENTURIÃO *et al.*, 2021).

O pH dos cosméticos varia de acordo com a aplicabilidade. Os produtos de longa duração na pele devem ter um pH de 4,0 a 7,0, ou seja, o pH deve ser o mais próximo possível do pH da pele (4,6 a 5,8) (DUPLAN; NOCERA, 2018). Valores extremos de pH (abaixo de 3,0 ou acima de 8,0) podem causar degradação de queratina ou remoção excessiva de oleosidade, resultando em pele seca. Assim, quebra a barreira cutânea e facilita os processos inflamatórios e infecciosos nesse órgão (DUPLAN; NOCERA, 2018). Portanto, o pH da emulsão desenvolvida deve ser mantido próximo ao pH da pele, preferencialmente dentro da faixa ideal para formulação que se encontram em temperatura ambiente, que está entre 4,0 - 7,0 (DAHER, 2014; DUPLAN; NOCERA, 2018).

As formulações F2, após 60 dias não apresentaram alterações estatisticamente significantes nos valores de viscosidade mínima aparente nas condições de temperaturas avaliadas quando comparadas aos valores obtidos para o t0.

Embora, as formulações tenham apresentado uma variação de pH quando armazenada a 4°C e 2°C, essas variações não foram acompanhadas de mudanças nos outros parâmetros avaliados e continuam dentro do valor de pH de compatibilidade cutânea. Foram consideradas estáveis e adequadas como um protótipo de formulação contendo o extrato de *Prosopis juliflora* para atender os objetivos propostos para a pesquisa.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos frutos de *P. juliflora* foi obtido o extrato liofilizado com rendimento de 49,49%. Esse extrato se apresentou como um pó de coloração amarelo-alaranjado, odor característico e higroscópico.

Além disso, foi realizada a caracterização química do extrato de *P. juliflora* quanto aos conteúdos de fenóis e flavonoides totais, em que os resultados obtidos mostraram que a concentração dos flavonoides totais é  $1,71 \pm 0,26 \mu\text{g EQ/mg}$  e o conteúdo e equivalência de ácido gálico ( $0,21 \pm 0,01 \text{ mg GAE/g}$ ).

Assim, os extratos de algaroba foram caracterizados pela técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo TOF e foi anotado triptofano, compostos fenólicos como: apigenina, genisteína, luteolina, isorhamnetina, canferol, dentre outros.

O extrato de algaroba não apresentou citotoxicidade em duas linhagens celular de camundongos BALB 3T3 e B16-F10.

Nas condições experimentais padronizadas nessa pesquisa, foi possível concluir que o extrato de algaroba atuou nas diferentes etapas da cascata oxidativa.

A atividade antitirozinase foi avaliada por ensaio enzimático e os resultados obtidos demonstraram que o extrato de *P. juliflora* pode ter a capacidade de inibir a cascata da melanogênese. Assim, esse extrato possui potencial de atividade antimelanogênica.

Por meio do teste de estabilidade acelerada após 60 dias foi possível verificar que a formulação aditivada com 3% de *P. juliflora*, foi estável nas condições padronizadas.

Diante disto, os frutos de *P. juliflora*, podem tornar-se fonte de compostos ativos para formulações cosméticas para cuidados da pele, com propriedades antienvhecimento e antimelanogênese, associando benefícios ambientais, socioeconômicos e, conseqüentemente, promovendo renda para as famílias que vivem em torno da cadeia produtiva de *P. juliflora*.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. Surfactant Science: Principles and Practice. Creative commons. 2016. Disponível em: <http://www.stevenabbott.co.uk/practical-surfactants/the-book.php>; Acessado em: Nov. de 2020.
- ABIHPEC - Associação Brasileira de Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/>. Acesso em: 30 de nov. 2022.
- AGCAM, E.; AKYILDIZ, A.; EVRENDILEK, G. A. Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurization. *Food Chemistry*, v. 143, p. 354–361, 2014.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. *et al.* Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenoides. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 56-59, 2003.
- AHMAD, R.; ISMAIL, S. Use of Prosopis in Arab/Gulf states including possible cultivation with saline water in deserts. In Prosopis: Semi-Arid Fuelwood and Forage Tree. *Building Consensus for the Disenfranchised*, p. 141–152, 1996.
- AKDEMIR, F.N.E. *et al.* A Comparative study on the antioxidant effects of hesperidin and ellagic acid against skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 31, p. 114–118, 2016.
- AKHTAR, N. *et al.* Formulation development and pharmaceutical evaluation of a w/o emulsion of Coleus extract. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 45, p. 236-241, 2011
- ALAM, M. B. *et al.* Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–7, 2017.
- ALAM, N.; BRISTI, N. C.; RAFQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, p. 143–152, 2013.
- ALEH, I.; ABU-DIEYEH, M. H. Novel Prosopis juliflora leaf ethanolic extract as natural antimicrobial agent against food spoiling microorganisms. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 7871, 2021.
- ALMARAZ-ABARCA, N. *et al.* Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 2, p. 119-124, 2007.
- ALMEIDA, M.G.J. *et al.* Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. *Acta farmaceutica bonaerense*,

v. 32, p. 90-95, 2013.

ALVAREZ, M. *et al.* Recovery and germination of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC seeds after ingestion by goats and cattle. *Arid Land Research and Management*, v. 31, n. 1, p. 71–80, 2017.

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

ANDERSEN, S. E.; HOVRING, C. M. CSR stakeholder dialogue in disguise: hypocrisy in story performances. *Journal of Business Research*, v. 114, p. 421–435, 2020.

ANGELOPOULOU, E. Understanding the color of human skin. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

ANRAKU, M. *et al.* Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. *Carbohydrate Polymers*, v. 199, p. 141–149, 2018.

ANTON, A. Colorimetric estimation of Aluminium with pyrocatechol Violet. *Analytical Chemistry*, v. 32, n. 6, p. 725-726, 1960.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:

[https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/pareceres/parecer-tecnico-no-1-de-28-de-julho-de-2009)

[br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/pareceres/parecer-tecnico-no-1-de-28-de-julho-de-2009](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/pareceres/parecer-tecnico-no-1-de-28-de-julho-de-2009). Acesso em: 02 de jul. 2023.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília: Anvisa, 2004.

AQUINO-MARTINS, V.G.D.Q. *et al.* In vitro antioxidant, anti-biofilm, and solar protection activities of melocactus zehntneri (Britton&rose) pulp extract. *Antioxidants*, v. 8, p. 439, 2019.

ARRON, S. Anatomy of the skin and pathophysiology of radiation dermatitis. In: Skin care in radiation oncology. *Springer Cham*, p. 9–14, 2016.

ARYA, G. *et al.* Catalytic, antibacterial and antibiofilm efficacy of biosynthesised silver nanoparticles using *Prosopis juliflora* leaf extract along with their wound healing potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 190, n. 0, p. 50-58, 2019.

ATHUKORALA, Y.; KIM, K.N.; JEON, Y.J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown algae, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 7, p. 1065-1074, 2006.

BAEK, H. S. *et al.* The inhibitory effect of new hydroxamic acid derivatives on melanogenesis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 29, p. 43–46, 2008.

BAEK, S. H.; KANG, M. G.; PARK, D. Inhibitory Effect of Sesamol on Melanogenesis in B16F10 Cells Determined by In Vitro and Molecular Docking

Analyses. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 169–178, 2020.

BARREIRO, E. Role of Protein Carbonylation in Skeletal Muscle Mass Loss Associated with Chronic Conditions. *Proteomes*, v. 4, n. 2, p. 18, 2016.

BARRETO, S. M. A. G. *et al.* Evaluation of in vitro and in vivo safety of the by-product of Agave sisalana as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. *Industrial Crops and Products*, v. 108, n. Supplement C, p. 470-479, 2017.

BARRETO, S. M. A. G. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant activity of agavesisalana agro-industrial residue. *Biomolecules*, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2020.

BATISTA, R. *et al.* In vivo antimalarial extracts and constituents of *Prosopis juliflora* (Fabaceae). *Journal of Functional Foods*, v. 44, n. 0, p. 74-78, 2018.

BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. C. *Topical and Transdermal Drug Delivery: Principles and Practice*, 2012.

BERKER, K. I. *et al.* Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. *Food Analytical Methods*, v. 3, p. 154–168, 2010.

BHATTACHARJEE, S. ROS and Oxidative Stress: Origin and Implication. *Reactive Oxygen Species in Plant Biology*, p. 1–31, 2019.

BHATTACHARYA, N. *et al.* Epidermal Lipids: Key Mediators of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, v. 25, n. 6, p. 551-562, 2019.

BIRCH, J.; BARNES, P. J.; PASSOS, J. F. Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 189, p. 34-39, 2018.

BORGES, I. F. *Obtenção e caracterização do melado de algaroba (Prosopis juliflora (Sw) D.C.) e sua utilização em uma formulação alimentícia*. 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2004.

BOSKO, C.A. Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 18, n. 1, p. 63-67, 2019.

BRACONI, F. L.; OLIVEIRA, I. S.; BARONI, M. N. F.; ROCHA FILHO, P. A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12. São Paulo. *Anais*. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, p. 6-19, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical

Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BROWN, T.M.; KRISHNAMURTHY, K. Histology, dermis. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2018.

BURGER, P. *et al.* Whitening Agents from Reseda luteola L. and Their Chemical Characterization Using Combination of CPC, UPLC-HRMS and NMR. *Cosmetics*, v. 4, n. 4, p. 51, 2017.

BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, v. 11, n. 2, p. 251-269, 2021.

BURKART, A. A monograph of the genus Prosopis (Leguminosae subfam. Mimosoideae). (Part 1 and 2). Catalogue of the recognized species of Prosopis. *Journal of the Arnold Arboretum*, v. 57, p. 450–525, 1976.

CALLENDER, S. P. *et al.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CAROCHO, M. F. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15–25, 2013.

CASTILLO, M. L. *et al.* Genetic insights into the globally invasive and taxonomically problematic tree genus Prosopis. *AoB PLANTS*, v. 13, n. 1, 2020.

CASTRO, R. M. L. *Emulsão: uma revisão bibliográfica*. 2014. 59 f. Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 02 dez. 2014.

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.

CELEP, E. *et al.* Influence of extraction method on enzyme inhibition, phenolic profile and antioxidant capacity of *Sideritis trojana* Bornm. *South African Journal of Botany*, v. 121, p. 360–365, 2019.

CENTURIÃO, P. O. *et al.* Avaliação da qualidade de produtos cosméticos contendo ácido glicólico. *Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas*, v. 50, n. 1, p. 158-173, 2021.

CHAIKUL, P.; LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antimelanogenesis and cellular antioxidant activities of rubber (*Hevea brasiliensis*) seed oil for cosmetics. *Industrial Crops and Products*, v. 108, p. 56–62, 2017.

CHAIYANA, W. *et al.* A. Enhancement of the Antioxidant, Anti-Tyrosinase, and Anti-

Hyaluronidase Activity of *Morus alba* L. Leaf Extract by Pulsed Electric Field Extraction. *Molecules*, v. 25, p. 2212, 2020.

CHAN, Y. Y.; KIM, K. H.; CHEAH, S. H. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Jornal Ethnopharmacol*, v. 137, p. 1183–1188, 2011.

CHANDRASEKARAN, A.; IDELCHIK, M. D. P. S.; MELENDEZ, J. A. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, v. 11, p. 91–102, 2017.

CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 2009.

CHAO, Y.; SHUM, H. C. Emerging Aqueous Two-Phase Systems: From Fundamentals of Interfaces to Biomedical Applications. *Chemical Society Reviews*, v. 49, p. 114–142, 2020.

CHEN, Y. *et al.* Structure-thermodynamics-antioxidant activity relationships of selected natural phenolic acids and derivatives: An experimental and theoretical evaluation. *PLoS ONE*, v. 10, p. 1–20, 2015.

CHEN, Y. *et al.* Greenwash and green purchase behaviour: the mediation of green brand image and green brand loyalty. *Total Quality Management & Business Excellence*, v. 31, p. 1-16, 2018.

CHO, U. M. *et al.* Inhibitory Effect of Ficin Derived from Fig Latex on Inflammation and Melanin Production in Skin Cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 24, n. 2, p. 288–297, 2019.

CHOGE, S. K. *et al.* Status report on commercialization of *Prosopis* tree resources in Kenya. *Technical report for the KEFRI/KFS Technical Forest Management and Research Liaison Committee*, 2012.

CHOUDHARY, M.I. *et al.* Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site- binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 332, p. 1171–1179, 2005.

CHUNG, C. Reduced Fat Food Emulsions: Physicochemical, Sensory, and Biological Aspects. *Crit. Rev. Food Science and Nutrition*, v. 56, p. 650–685, 2016.

CHUNG, Y. C. *et al.* Antimelanogenic Effects of *Polygonum tinctorium* Flower Extract from Traditional Jeju Fermentation via Upregulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Protein Kinase B Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 1–15, 2018.

CICHOREK, Mirośława *et al.* Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, v.30, n. 1, p. 30–41, 2013.

COMUNIAN, T. A.; JAFARI, S. M. Production of food bioactive-loaded

nanostructures by Micro-/Nanofluidics. *Nanoencapsulation of food ingredients by specialized equipment*. London: Elsevier, p. 213–50, 2019.

CONTENTE, D. M. L. Obtenção e caracterização de nanoemulsão óleo em água a partir de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* M.). [s.l.] Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, 2016.

COOK, J. A.; MITCHELL, J. B. Viability measurements in mammalian cell systems. *Analytical Biochemistry*, v. 179, p. 1-7, 1989.

DAHER, C. C. *et al.* Development of O/W emulsions containing Euterpe oleracea extract and evaluation of photoprotective efficacy. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 3, p. 639-652, 2014.

DAMASCENO, Gabriel A. B. *et al.* *Prosopis juliflora* as a new cosmetic ingredient: Development and clinical evaluation of a bioactive moisturizing and anti-aging innovative solid core. *Carbohydrate Polymers*, n. 233, p. 1-7, 2020.

D'AMELIA, V. *et al.* The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, v. 17, n. 3, p. 611–625, 2018.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro. *Food Chemistry*, v. 88, n. 2, p. 219-224, 2004.

DAVIS, H. M. Analysis of creams and lotions. In: SENZEL, A. J. (Ed.). *Newburger's manual of cosmetic analysis*. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1977. cap.4, p.32.

DECKER, E. A.; WELCH, B. Role of ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food?. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 38, p. 4, 1990.

DELVA, E.; TUCKER, D.K.; KOWALCZYK, A. P. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, v. 1, n. 2, 2009.

DEMIRCI-HAMMER, S. *et al.* Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 209, 2022.

DENG, H. H. *et al.* Colorimetric tyrosinase assay based on catechol inhibition of the oxidase-mimicking activity of chitosan-stabilized platinum nanoparticles. *Mikrochim Acta*, v. 186, p. 301, 2019.

DE SOUZA NASCIMENTO, C. E. *et al.* The introduced tree *Prosopis juliflora* is a serious threat to native species of the Brazilian Caatinga vegetation. *Science of The Total Environment*, v. 481, n. 0, p. 108-113, 2014.

DHIVYA, Kumarasamy *et al.* Bioprospecting of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC seed pod extract effect on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Physiological and molecular plant pathology*, v. 101, p. 45-53, 2018.

DIMITROVA, T. D. *et al.* Non-Aqueous, Surfactant-Free Antifoam Emulsions:

Properties and Triggered Release. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 92, p. 330–336, 2014.

DINI, I.; LANERI, S. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules*, v. 26, n. 13, p. 3921, 2021.

DIPLOCK, A. T. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, v. 80, p. 77–112, 1998.

D'ISCHIA, M. *et al.* Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. *Pigment cell & melanoma research*, v. 28, n. 5, p. 520–544, 2015.

DJERIDANE, A. *et al.* Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, v. 97, n. 4, p. 654–60, 2006.

DOOLAN, B. J.; GUPTA, M. Melasma. *Australian journal of general practice*, v. 50, n. 12, p. 880–885, 2021.

DRUMOND, M. A.; MORGADO, L. B. Espécies arbóreas alternativas parasistemas agroflorestais na região semiárida do nordeste brasileiro. *Agrossilvicultura*, v. 1, n. 1, p. 43-50, 2004.

DUPLAN, H.; NOCERA, T. Hydratation cutanée et produits hydratants. *Annales de Dermatologie Et de Vénérologie*, v. 145, n. 5, p. 376-384, 2018.

DZIAŁO, M. *et al.* The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 2, p. 160, 2016.

ECKHART, L.; TSCHACHLER, E.; GRUBER, F. Autophagic Control of Skin Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 7, p. 143, 2019.

EGAWA, G. Pathomechanism of 'skin-originated' allergic diseases. *Immunol Medical*, v. 41, n. 4, p. 170-176, 2018.

EI HAWARY, S. S. *et al.* Phytochemical constituents and anti-tyrosinase activity of *Macadamia integrifolia* leaves extract. *Natural Product Research*, p. 1–6, 2020.

ELBEHAIRI, S. *et al.* *Prosopis juliflora* leave extracts induce cell death of MCF-7, HepG2, and LS-174T cancer cell lines. *EXCLI journal*, v. 19, p. 1282–1294, 2020.

ELSHIBANI, F. *et al.* Determination of Arbutin Content and In-vitro Assessment of Anti-hyperpigmentation Activity of Microemulsion Prepared from Methanolic Extract of the Aerial Part of *Arbutus Pavarii* Pampan Growing in East of Libya. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, v. 9, n. 3, 2020.

FERRARI, M. *Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo oleos de andiroba e copaíba*. 1998. 147 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P. A. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (*Euterpe oleracea*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 4, p. 737-743, 2011.

FERRARI, M.; NAKANO, A. K.; CAETANO, J. P. S.; ROCHA FILHO, P. A. *Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba*. In: 16 Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2002, São Paulo. Anais eletrônicos. São Paulo: Elkadi, 2002.

FERREIRA *et al.* Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-de-são-paulo sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FRANCO, E. S. *et al.* Viabilidade sócio-ambiental da algaroba no cariri paraibano. *Engenharia Ambiental*, v. 7, n. 4, p. 232-248, 2010.

FRIJHOFF, J. *et al.* Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, v. 23, n. 14, p. 1144–1170, 2015.

GARN, H. *et al.* An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. *Journal of Immunological Methods*, v. 168, n. 2, p. 253–256, 1994.

GAUR, M.; DOBKE, M.; LUNYAK, V. Mesenchymal stem cells from adipose tissue in clinical applications for dermatological indications and skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, p. 208, 2017.

GAYATHRI, G; UPPULURI, K. B. The comprehensive characterization of *Prosopis juliflora* pods as a potential bioenergy feedstock. *Scientific Reports*, v. 3, n. 12, 2022.  
WAKIE, T. T. *et al.* Is control through utilization a cost effective *Prosopis juliflora* management strategy?. *Journal of environmental management*, v. 168, p. 74-86, 2016.

GEILFUS, C. M. *Controlled Environment Horticulture: Improving Quality of Vegetables and Medicinal Plants*. Springer International Publishing, 2019.

GEORGIEV, V. *et al.* Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*, v. 18, p. 779–798, 2018.

GHANIMI, R. *et al.* The Antioxidant Activities of Ethanolic, Methanolic, Ethyl Acetate, and Aqueous Extracts of the Endemic Species, *Lavandula mairei* Humbert (A Comparative Study between Cold and Hot Extraction). *Ethiopian journal of health sciences*, v. 32, n. 6, p. 1231-1236, 2022.

GHOSH, K.; CAPELL, B. C. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, p. 2133–2139, 2016.

GOKDUMAN, K.; GOK, A. In Vitro Investigation of Therapeutic Potential of Bare Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles (≤100 ppm) on Hepatocellular Carcinoma Cells.

*Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 20, p. 1391–1400, 2020.

GONÇALVES, N. B.; PORTARI, G. V.; JORDÃO, A. A. Quantificação de compostos antioxidantes em frutos in natura e polpa congelada. *Journal Health Science Institute*, v. 37, n. 1, p. 73-6, 2019.

GOTTARDO, S. *et al.* Towards safe and sustainable innovation in nanotechnology: State-of-play for smart nanomaterials. *NanoImpact*, v. 21, 2021.

GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020.

GULCIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, v. 78, p. 803–811, 2006.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

GUNES, D. Z. Microfluidics for food science and engineering. *Current Opinion In Food Science*, v. 21, p. 57-65, 2018.

HAN, H. J. *et al.* Anti-Melanogenic Effect of Ethanolic Extract of Sorghum bicolor on IBMX – Induced Melanogenesis in B16/F10 Melanoma Cells. *Nutrients*, v. 12, n. 3, p. 832, 2020.

HASAN, M. M. U. *et al.* Anti-emetic activity of some leguminous plants. *Pakistan Journal of Botany*, n. 44, p. 389–391, 2012.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Fotopoulos V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, v. 9, p. 681, 2020.

HASHIM, F. J. *et al.* Alternative Approach for Specific Tyrosinase Inhibitor Screening: Uncompetitive Inhibition of Tyrosinase by Moringa oleifera. *Molecules*, v. 26, n. 15, p. 4576, 2021.

HAYASE, M. Introduction to cosmetic materials, cosmetic science and technology. *Theoretical Principles and Applications*, p. 149–54. 2017.

HENCIYA, S *et al.* Biopharmaceutical potentials of Prosopis spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 25, n. 1, p. 187-196, 2016.

HOLDER, A. L. *et al.* Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology*, v. 25, p. 1885-1892, 2012.

HONG, K; KIM, I. S; LEE, S.B. Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 67, p. 123-131, 2018.

HONG, S. J. *et al.* In vitro and in vivo investigation for biological activities of

- neoagarooligosaccharides prepared by hydrolyzing agar with  $\beta$ -agarase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 22, n. 4, p. 489–496, 2017.
- HOWARI, F. M. Changes in the Invasion Rate of *Prosopis juliflora* and Its Impact on Depletion of Groundwater in the Northern Part of the United Arab Emirates. *Plants*, v. 11, n. 5, p. 682, 2022.
- HSU, J. *et al.* Anti-Melanogenesis Effects of Lotus Seedpod In Vitro and In Vivo. *Nutrients*, v. 12, n. 11 p. 3535, 2020.
- HUANG, H. C. *et al.* *Phoenix dactylifera* L. seed extract exhibits antioxidant effects and attenuates melanogenesis in B16F10 murine melanoma cells by downregulating PKA signaling. *Antioxidants*, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2020.
- HUSSAIN, H. *et al.* Quantitative Analysis of Free Amino Acids and Urea Derived from Isolated Corneocytes of Healthy Young, Healthy Aged, and Diseased Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 32, n. 2, p. 94-100, 2019.
- ISAH, T. Stress and Defense Responses in Plant Secondary Metabolites Production. *Biological Research*, v. 52, n. 39, p. 52- 39, 2019.
- JAMPA, M. *et al.* Multiple Bioactivities of *Manihot esculenta* Leaves: UV Filter, Anti-Oxidation, Anti-Melanogenesis, Collagen Synthesis Enhancement, and Anti-Adipogenesis. *Molecules*, v. 27, n. 5, p. 1556, 2022.
- JOO, I. H. *et al.* *Ligularia fischeri* ethanol extract: An inhibitor of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Journal of Cosmetic Dermatology*, p. 1-8, 2022.
- JULIANO, C. C. A. Spreading of Dangerous Skin-Lightening Products as a Result of Colourism: A Review. *Applied Sciences*, v. 12, p. 1–15, 2022.
- KAUR, M.; GUPTA, A. K.; ZHAWAR, V. K. Antioxidant response and *Lea* genes expression under exogenous ABA and water deficit stress in wheat cultivars contrasting in drought tolerance. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v. 23, n. 1, p. 18–30, 2014.
- KHATIB, S. *et al.* Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 13, n. 2, p. 433-41, 2005.
- KE, Y.; WANG, X. J. TGF $\beta$  Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. *The Journal of investigative dermatology*, v. 141, n. 4S, p. 1104–1110, 2021.
- KERDUDO, A. *et al.* Development of a natural ingredient—Natural preservative: A case study. *Comptes Rendus Chimie*, v 19, n. 9, p. 1077–1089, 2016.
- KIM, J. J.; KIM, Y. S.; KUMAR, V. Heavy metal toxicity: an update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, v. 54, p. 226–231, 2019.

- KIM, M.; MENG, X.; KIM, A. Developing a long-lasting tyrosinase inhibitor from *Morus alba* L. *Cosmet & Toiletries*, v. 27, p. 91–102, 2006.
- KOLARSICK, P.A.; KOLARSICK, M.A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.
- KOOHGOLI, R. *et al.* Bad air gets under your skin. *Experimental Dermatology*, v. 26, p. 384–387, 2017.
- KRAWCZYK, H. The stilbene derivatives, nucleosides, and nucleosides modified by stilbene derivatives. *Bioorganic Chemistry*, v. 90, 2019.
- KRUTMANN, J. *et al.* The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science*, v. 85, n. 3, p. 152–161, 2017.
- KUSUMAWATI, L. A. I. *et al.* Tyrosinase Inhibition Assay and Skin Whitening Cream Formulation of Edamame Extract (Glycine Max). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, v. 7, n. 6, p. 1167–1171, 2015.
- LALL, N. *et al.* Extract from *Ceratonia siliqua* exhibits depigmentation properties, *Phytotherapy Research*, v. 29, n. 11, p. 1729–1736, 2015.
- LAOSIRISATHIAN, N. *et al.* The Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities, and Irritation Properties of *Sripanya Punica granatum* Peel Extract. *Cosmetics*, v. 7, n. 1, p. 7, 2020.
- LAZZARO, L. *et al.* Impact of invasive alien plants on native plant communities and Natura 2000 habitats: State of the art, gap analysis and perspectives in Italy. *Journal of environmental management*, v. 274, 2020.
- LEE, E.; CHA, H. L. Inonotus obliquus Extract as An Inhibitor of  $\alpha$ -MSH-Induced Melanogenesis in B16-F10 Mouse Melanoma Cells. *Cosmetics*, v. 6, p. 1–9, 2019.
- LEE, K. T.; KIM, B.J.; KIM, J.H. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 19, p. 291–298, 1997.
- LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, v. 26, n. 13, p. 757-772, 2018.
- LIMA, C. G.; VILELA, A. F. G.; PIANOVSKI, A. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (Orbignya oleifera)*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.
- LIN, H. L. *et al.* Evaluation of cockerel spermatozoa viability and motility by a novel enzyme based cell viability assay. *British Poultry Science*, v. 60, n. 4, p. 467–471, 2019.

LIU, Y *et al.*. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, v. 69, p. 581–593, 1997.

LIU, Y. *et al.* A review on emulsification via microfluidic processes. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, p. 1-15, 2020.

LÓPEZ-FRANCO, Y.L. *et al.* Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, v. 30, n. 2, p. 656-660, 2013.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.

LUO, X; ZHANG, Q; ZHANG, S. External financing demands, media attention and the impression management of carbon information disclosure. *Carbon Management*, v.12, n. 3, p. 235–247, 2021.

MA, Q. *et al.* Melatonin Attenuates Postharvest Physiological Deterioration of Cassava Storage Roots. *Journal of Pineal Research*, v. 60, p. 424–434, 2016.

MALASPINA, P. *et al.* Depigmenting potential of lichen extracts evaluated by invitro and in vivo tests. *PeerJ*, v. 8, p. 9150, 2020.

MANN, T. Structure-Activity Relationships of Thiazolyl Resorcinols, Potent and Selective Inhibitors of Human Tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 690, 2018.

MASSON, D. S. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes*. 2005. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, n. 7, p. 611-649, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC Press, 2015.

MINTIE, C. A; SINGH, C. K.; AHMAD, N. Whole Fruit Phytochemicals Combating Skin Damage and Carcinogenesis. *Translation Oncology*, v. 13, n. 2, p. 146-156, 2020.

MIWA, S. *et al.* Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *The Journal of clinical investigation*, v. 132, p. 13, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application

to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential. *Journal of Herbal Medicine*, n. 14, p. 1-16, 2018.

MUNIZ, M. B. *Processamento das vagens de algaroba (Prosopis juliflora) para produção de bioprodutos*. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2009.

MUTURI, G. M. *et al.* Unleached Prosopis litter inhibits germination but leached stimulates seedling growth of dry woodland species. *Journal of Arid Environments*, v. 138, p. 44–50, 2017.

NASCIMENTO *et al.* The introduced tree Prosopis juliflora is a serious threat to native species of the Brazilian Caatinga vegetation. *Science of the Total Environment*, n. 481, p. 108–113, 2014.

NASCIMENTO, C. E. D. S. *Comportamento invasor da algarobeira Prosopis juliflora (Sw) DC. nas planícies aluviais da caatinga*. 2008. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NAVES L. B. *et al.* Emulsions stabilization for topical application. *Journals of Biomaterials and Medical Applications*, v. 1, n. 1, 2017.

NORDLUND, J. J.; BOISSY, R. E. The biology of melanocytes. *The Biology of the Skin*. CRC Press, p. 113-130, 2001.

ODHIAMBO, RS. *et al.* Evaluation of in vitro ovicidal activity of ethanolic extracts of Prosopis juliflora (Sw.) DC (Fabaceae). *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 9, p. 15–18, 2014.

OECD. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests 129. *Health and Safety Publications*, v. 129, 2010.

O GLOBO ECONOMIA. *L'Oréal vai retirar termos como 'branqueador' e 'clareamento' de seus produtos*. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/loreal-vai-retirar-terminos-com-branqueador-clareamento-de-seus-produtos-24503320>. Acesso em 05 fev 2020.

OKOMBI, S. *et al.* Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, n. 8, p. 2252-2255, 2006.

OLIVEIRA, F.G.; QUEIROZ, L.P. *Prosopis in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB18991>. Acesso em: 18 set. 2023.

OLIVEIRA, G. K. F. *et al.* Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 192, n.0, p.

691-697, 2016.

OLIVEIRA, M.T. *et al.* Seasonal variability in physiological and anatomical traits contributes to invasion success of *Prosopis juliflora* in tropical dry forest. *Tree Physiology*, v. 37, n. 1, p. 326–337, 2017.

OLSEN, C. M. *et al.* Prevention of DNA damage in human skin by topical sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v. 33, n. 3, p. 135–142. 2017.

ORTIZ-RUIZ, C. V. *et al.* Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. *Journal of Dermatological Science*, v. 82, n. 2, p. 115–122, 2016.

PANICH, U. *et al.* Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells International*, 2016.

PARK, D.; KIM, H.; KIM, J. W. Microfluidic production of monodisperse emulsions for cosmetics. *Biomicrofluidics*, v. 15, n. 5, 2021.

PARK, S. *et al.* Isolation of tyrosinase and melanogenesis inhibitory flavonoids from *Juniperus chinensis* fruits. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 82, n. 12, p. 2041-2048, 2018.

PAUL, W.; SHARMA, C. The Anatomy and Functions of Skin. *Em Advances in Wound Healing Materials: Science and Skin Engineering*, p. 25–34, 2015.

PASIECZNIK, N. M. *et al.* The *Prosopis juliflora*–*Prosopis pallida* complex: A monograph. *Forest Ecology and Management*, v. 147, 2001.

PASIECZNIK N. M. *et al.* *Identifying Tropical Prosopis Species: A Field Guide*. v. 44, p. 1-30, 2004.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 45, n. 2, p. 108–111, 2005.

PIANOVSKI, A. R. *et al.* Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões múltiplas O/A/O com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*). *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 89, n. 2, p. 155-159, 2008.

PIETRO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. *Analytical biochemistry*, v. 269, p. 337-341, 1999.

PILLAIYAR, T. *et al.* Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 7395-7418, 2018.

PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões. *Cosmetic & Toiletries*, v. 10, n. 6, p. 44–56, 1998.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55–74, 2015.

PRASHAR, S. *et al.* Formulation, Characterization, and In Vitro Mineral Absorption of Ficus Palmata Fruit Extract Nanoemulsion. *Journal of the American Nutrition Association*, v. 41, n. 3, p. 291-300, 2022.

PROTA, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 75, p. 122-127, 1980.

PROSAPIO, V.; NORTON, I. Influence of osmotic dehydration pre-treatment on oven drying and freeze drying performance. *LWT - Food Science and Technology*, v. 80, p. 401–408, 2017.

PUROHIT, T. *et al.* Smad3-dependent regulation of type i collagen in human dermal fibroblasts: Impact on human skin connective tissue aging. *Journal of Dermatological Science*, v. 83, p. 80–83, 2016.

PYŠEK, P. *et al.* Scientists' warning on invasive alien species. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 95, n. 6, p. 1511-1534, 2020.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, 2015.

QAYYUM, A. *et al.* Efeitos Alelopáticos da Planta Invasiva Prosopis juliflora em Gramíneas do Planalto de Potohar, Paquistão. *Planta daninha*, v. 36, 2018.

QIN, Z.; BALIMUNKWE, R. M. ; QUAN, T. Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. *British Journal of Dermatology*, v. 177, n. 5, 1337-1348, 2017.

QU, L. *et al.* Simultaneous Determination of Six Isoflavones from Puerariae Lobatae Radix by CPE-HPLC and Effect of Puerarin on Tyrosinase Activity. *Molecules*, v. 25, n. 2, p. 344, 2020.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

RAUNIYAR, R. *et al.* Anti-tyrosinase activity of Stachytarpheta cayennensis in vitro. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, v. 3, p. 2319–8753, 2014.

Reports in Beauty & Personal Care Organic Skin Care Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Face Cream & Moisturizers, Face Cleanser, Face Serum, Body Wash), By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030. San Francisco: *Grand View Research*, 2022.

RINCÓN, F. *et al.* Physicochemical and rheological characterization of Prosopis juliflora seed gum aqueous dispersions. *Food Hydrocolloids*, v. 35, n. 0, p. 348-357,

2014.

ROSA, P.W. *et al.* Seasonal Phytochemical Variation and Antifungal Evaluation of Different Parts of *Epidendrum Mosenii*. *Natural Product Communications*, v. 3, n. 4, p. 535-538, 2008.

RODRIGUES, L. C. *et al.* Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do Sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. *Revista Árvore*, v. 37, n. 3, p. 451-457, 2013.

ROSS, T. *et al.* Prosopis: a global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. *Aob Plants*, v. 6, p. 10, 2014.

RZEPKA, Z. *et al.* From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, v. 70, n. 0, p. 695–708, 2016

SACHDEV, S. *et al.* Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*, v.10, p. 277, 2021.

SALARI, S. *et al.* In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potential of GreenSynthesized Silver Nanoparticles Using *Prosopis farcta* Fruit Extract. *Iranian journal of pharmaceutical research*, v. 18, n. 1 p. 430-455, 2019.

SALISBURY, D.; BRONAS, U. Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nursing Research*, v. 64, n. 1, p. 53–66, 2015.

SAMEC, D. *et al.* The role of polyphenols in abiotic stress response: the influence of molecular structure. *Plants* v. 10, n. 1, p. 118, 2021.

SANTOS, E. *et al.* Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. *International Journal of Molecular Science*, v. 14, n. 4, p. 8496–8516, 2013.

SATHIYA, M.; MUTHUCHELIAN, K. Anti-tumor potential of total alkaloid extract of *Prosopis juliflora* DC. leaves against Molt-4 cells in vitro. *African Journal of Biotechnology*. v. 10, n. 44, p. 8881-8888, 2011.

SCHMIDT, P. C; ORTEGA, G.G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 133, p. 17-26, 1983.

SCHAFRANSKI, K. *et al.* Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) utilizando planejamento experimental. *Química Nova*, v. 42, n. 7, p. 736–44, 2019.

SCHUCH, A. P. *et al.* Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 107, p. 110-124, 2017

SEO, G.Y. *et al.* Leathesia difformis Extract Inhibits  $\alpha$ -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Cells via Down-Regulation of CREB Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, p. 1–16, 2019.

SHACKLETON, R.T. Prosopis: A global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. *AoB Plants*, v. 6, p. 1-18, 2014.

SHACKLETON, R. T. *et al.* The role of invasive alien species in shaping local livelihoods and human well-being: A review. *Journal of environmental management*, v. 229, p. 145–157, 2019.

SHACKLETON, R.T.; LE MAITRE, D.C.; RICHARDSON, D.M. Stakeholder perceptions and practices regarding Prosopis (mesquite) invasions and management in South Africa. *AMBIO*, n. 44, p. 569–581, 2015.

SHAO, P. Recent advances in improving stability of food emulsion by plant polysaccharides. *Food research international*, v. 137, 2020.

SHARIEV, A. *et al.* Skin protective and regenerative effects of RM191A, a novel superoxide dismutase mimetic. *Redox Biology*, v. 38, 2021.

SHARIFI-RAD, J, *et al.* Prosopis plant chemical composition and pharmacological attributes: Targeting clinical studies from preclinical evidence. *Biomolecules*, v. 9, p. 777, 2019.

SHI, L. *et al.* Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental science and pollution research international*, v. 29, n. 54, p. 81112-81129, 2022.

SHIFERAW, H. *et al.* Water use of Prosopis juliflora and its impacts on catchment water budget and rural livelihoods in Afar Region, Ethiopia. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 2688, 2021.

SHOEMAKER, M.; COHEN, I.; CAMPBELL, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, n. 2–3, p. 381–384, 2004.

SIDANA, J.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, v. 130, p. 22-46, 2016.

SILVA, C.L. *et al.* Stratum corneum hydration: phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1768, n. 11, p. 2647-59, 2007.

SILVA, J. D. F. *et al.* Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Química Nova*, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SILVÉRIO, M.D.O.; CASTRO, C.F.S.; MIRANDA, A.R. Avaliação da atividade

antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 1, p. 59-65, 2013.

SINGH, S. *et al.* Changes in phytochemicals, anti-nutrients and antioxidant activity in leafy vegetables by microwave boiling with normal and 5% NaCl solution. *Food Chemistry*, v. 176, p. 244–253, 2015.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, v. 28, n. 4, p. 1057-1060, 1989.

SOTO-MADRID, D. *et al.* Dependence of the Ripeness Stage on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husk Extracts from Industrial By-Products. *Molecules*, v. 26, n. 10, p. 2878, 2021.

SPAGNOL, C.M. *Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP Araraquara, 2014.

STOCKERT, J. C. *et al.* A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, v. 120, p. 159–167, 2018.

SUBRAMANIAN, M.; CHINTALWAR, G. J.; CHATTOPADHYAY, S. Iron modulatory property of a polysaccharide from Indian medicinal plant *Ocimum sanctum*. *Free radical research*, v. 55, n. 5, p. 510–519, 2021.

TABOSA, I. M. *et al.* Isolamento biomonitorado de alcalóides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 1, p. 9-10, 2000.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, p. 108 – 109, 2004.

TADROS, T. Viscoelastic properties of sterically stabilised emulsions and their stability. *Advances in colloid and interface science*, v. 222, p. 692-708, 2015.

TING, Y. *et al.* Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *Journal of Functional Foods*, v. 7, p. 112–28, 2014.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*, v. 26, n. 1, p. 37-46, 2017.

TOBIN, P. C. Managing invasive species. *F1000Research*, v. 1, n. 7, p. 1686, 2018.

TOHMA, H. *et al.* RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia* L. species. *Antioxidants*, v. 5, p. 38, 2016.

VOSTÁLOVÁ, J. *et al.* Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay. *Journal of Photochemistry and*

*Photobiology B: Biology*, v. 178, n. 0, p. 530-536, 2018.

WAHAB, N.; AZIZUL, A.; IBRAHIM, N. Phytochemistry, cytotoxicity and antiviral activity of *Catharanthus roseus*. *Iranian journal of microbiology*, v. 12, n. 5, p. 460–465, 2020.

WANG, J. *et al.* Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.

WANG, X. Y. *et al.* Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, v. 186, p. 100–9, 2018a.

WANG, X. Y. *et al.* Isolation, purification and physicochemical properties of polysaccharide from fruiting body of *Hericium erinaceus* and its effect on colonic health of mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 1310–9, 2018b.

WILGEN, B. W. V. *et al.* Quantifying the social and economic benefits of the biological control of invasive alien plants in natural ecosystems. *Current opinion in insect science*, v. 38, 2020.

WINDER, A. J.; HARRIS, H. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, v. 198, p. 317–326, 1991.

WINK, M. Evolution of Secondary Plant Metabolism. *In eLS; John Wiley & Sons*, p. 1-11, 2016.

WU, Y. T. *et al.* Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis*. *International journal of biological Macromolecules*, v. 165, p. 2116–2125, 2020.

YAMASHITA, F. *et al.* Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 1, p. 92-94, 2003.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 1, p. 27–32, 1995.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls*, 2021.

ZAID, A.; AI, RR. Depigmentation and anti-aging treatment by natural molecules. *Current Pharmaceutical Design*, v. 25, n. 20, p. 2292-2312, 2019.

ZAIDI, K. U. *et al.* Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International*,

2014.

ZAGÓRSKA-DZIOK, M. *et al.* Evaluation of the Antioxidant, Cytoprotective and Antityrosinase Effects of Schisandra chinensis Extracts and Their Applicability in Skin Care Product. *Molecules*, v. 27, n. 24, p. 8877, 2022.

ZEITOUN, H. *et al.* Skin lightening effect of natural extracts coming from Senegal botanical biodiversity. *International Journal of Dermatology*, v. 59, n. 2, p.178-183, 2019.

ZEITOUN, H. *et al.* Antityrosinase Activity of Combretum micranthum, Euphorbia hirta and Anacardium occidentale Plants: Ultrasound Assisted Extraction Optimization and Profiling of Associated Predominant Metabolites. *Molecules*, v. 25, n. 11, p. 2684, 2020.

ZENG, J. P. *et al.* Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of uvb leads to premature senescence: A robust model of cellular photoaging. *Journal of Dermatological Science*, v. 73, p. 49–56, 2014.

ZHANG, X.; LIU, L.; LIN, C. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. *Food Hydrocolloids*, v. 39, n.0, p. 10-18, 2014.

ZHAO, H.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; WANG, S. C. Extraction, Purification and In Vitro Antioxidant Activity Evaluation of Phenolic Compounds in California Olive Pomace. *Foods*, v. 10, n. 11-12, p. 174, 2022.

ZHAO, S. *et al.* Isolation, Characterization and Bioactive Properties of Alkali-Extracted Polysaccharides from Enteromorpha prolifera. *Marine drugs*, v. 18, n. 11, p. 552, 2020.

ZILLES, J.C. *et al.* Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives: A review. *Experimental dermatology*, v. 31, n. 10, 1500-1521, 2022.

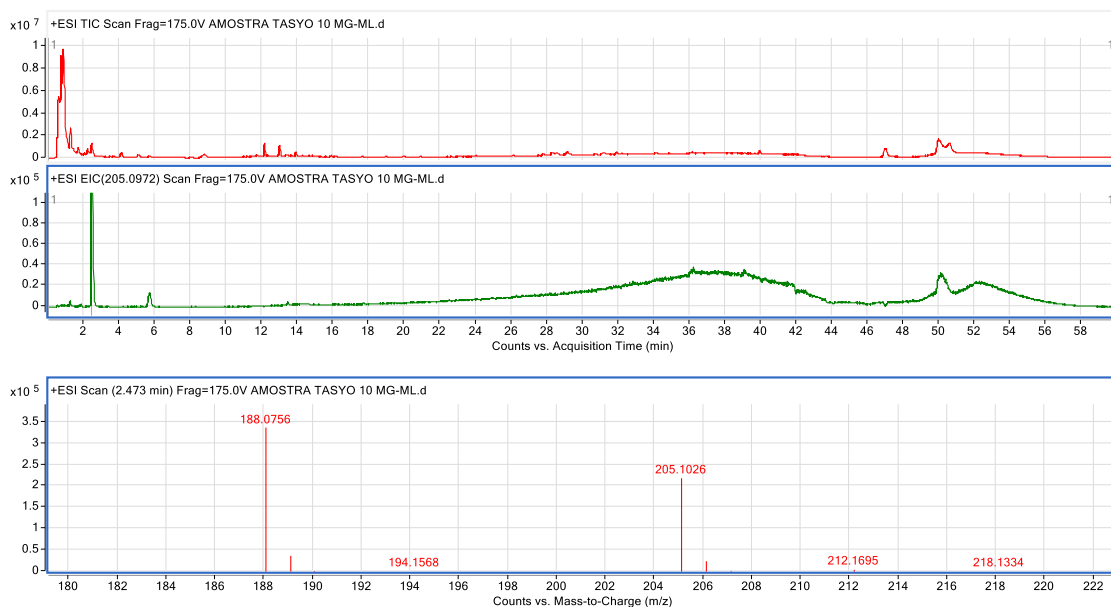
ZOLGHADRI, S. *et al.* A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 34, n. 1, p. 279-309, 2019.

ZUO, G. *et al.* Target guided isolation of potential tyrosinase inhibitors from Otholobium pubescens (Poir.) J.W. Grimes by ultrafiltration, high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC. *Industrial Crops and Products*, v. 134, p. 195-205, 2019.

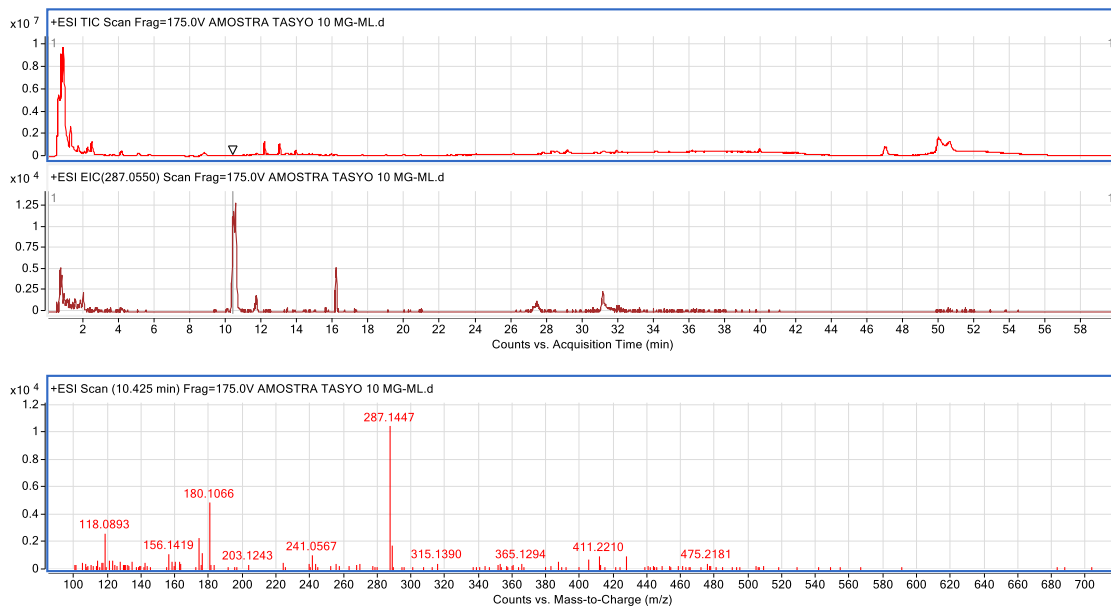
## APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatogramas e respectivos espectros de massa das amostras de *Prosopis juliflora* do modo positivo, referentes ao tópicó 5.2.2.

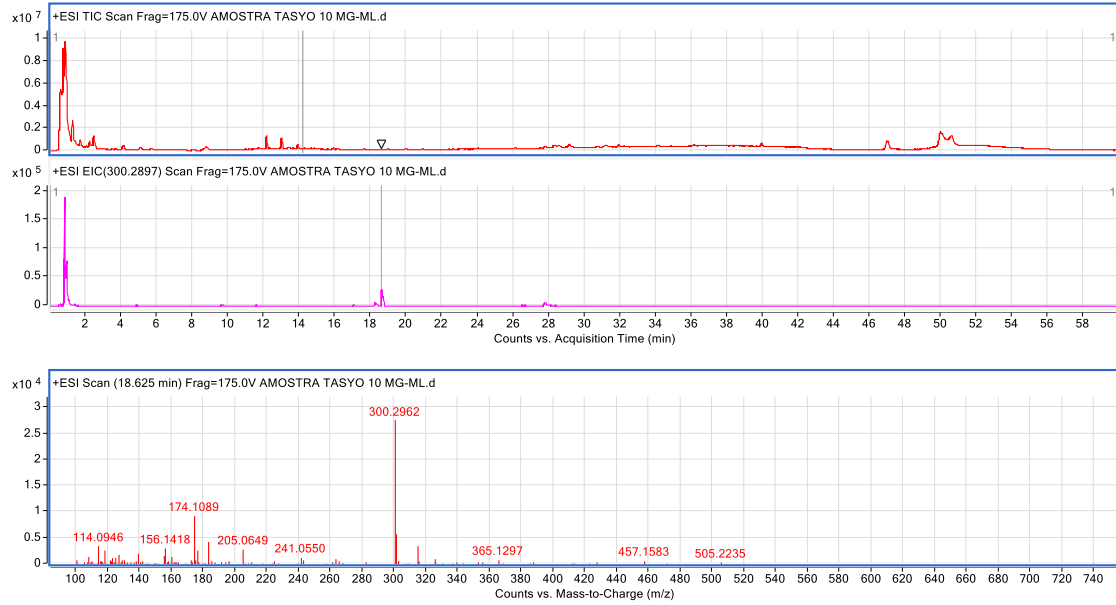
## Triptofano



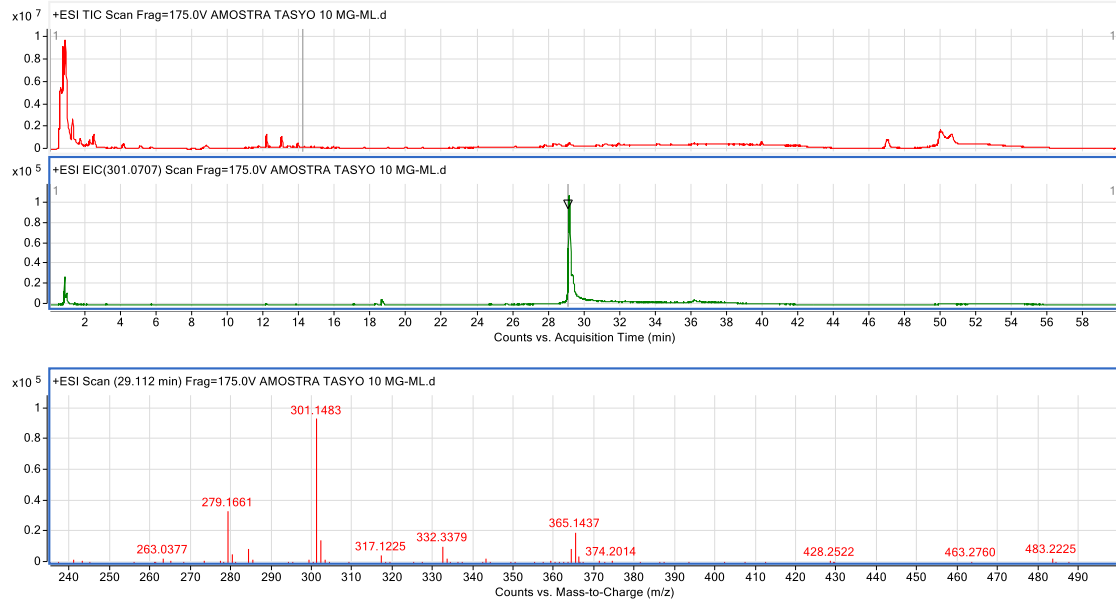
## Luteolina/ canferol



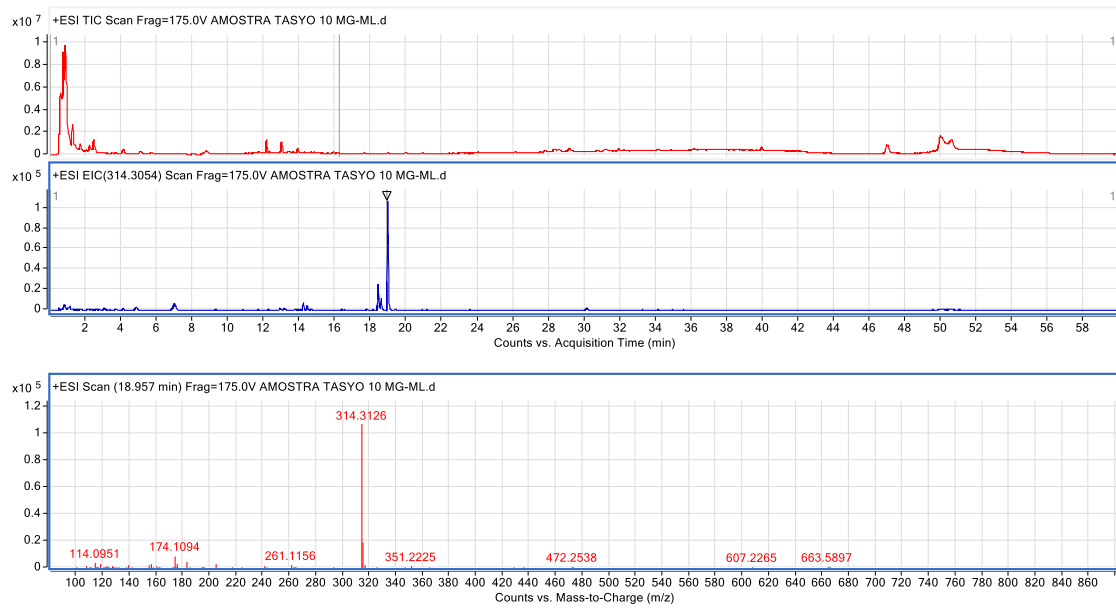
## Julifloridine



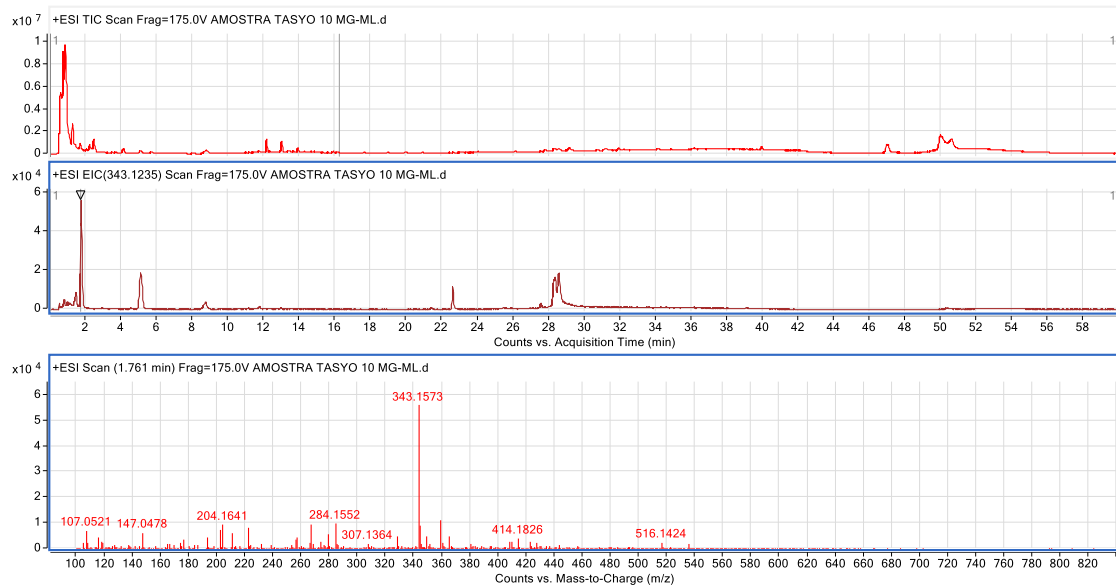
## Canferol 3-O-metil eter

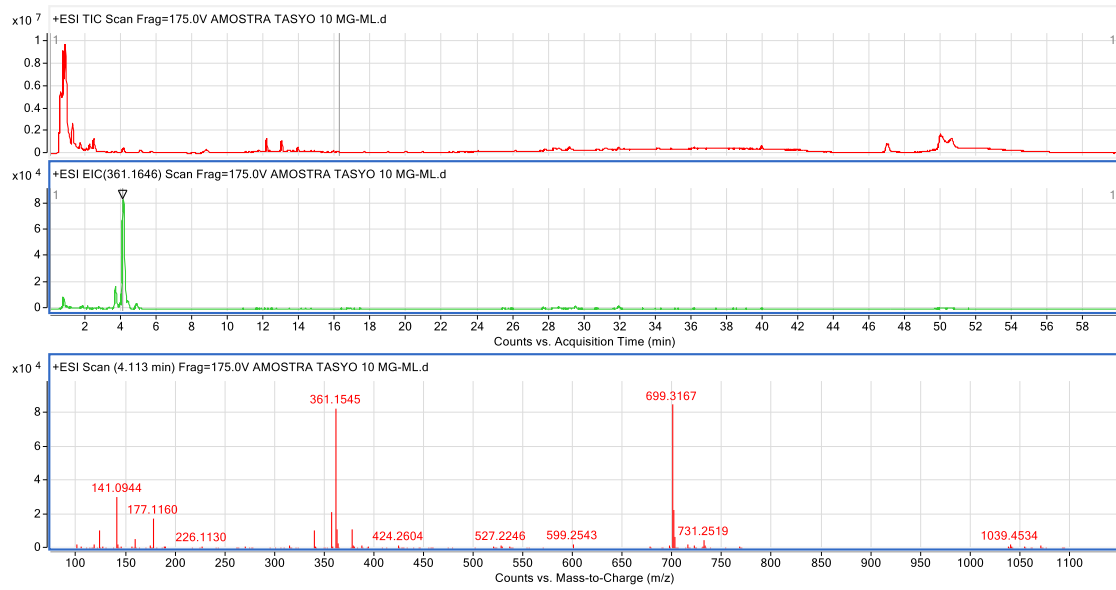
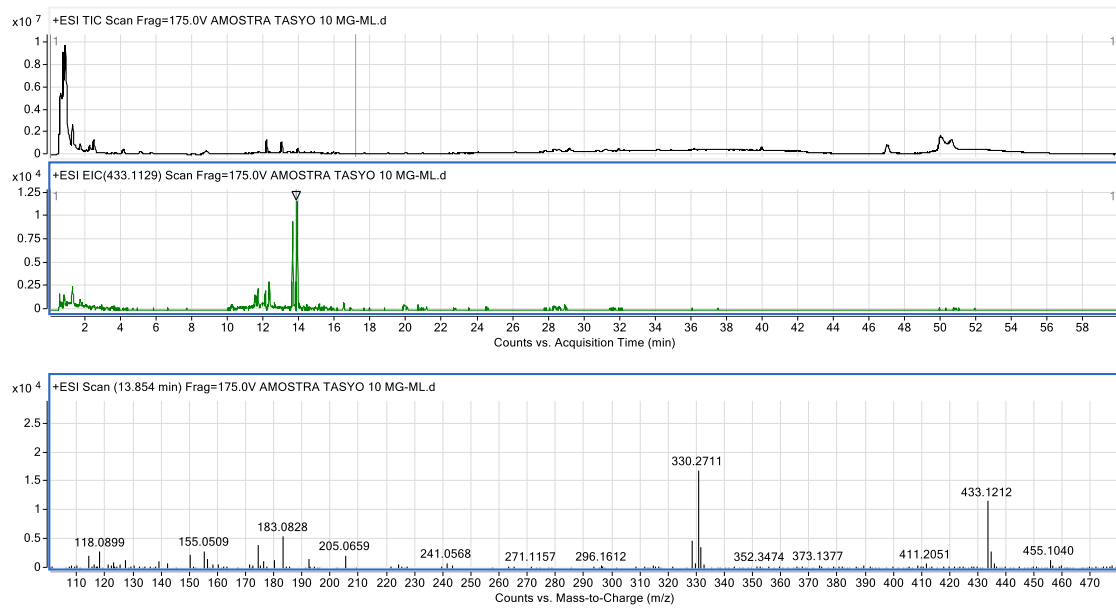


## N-metilulifloridina

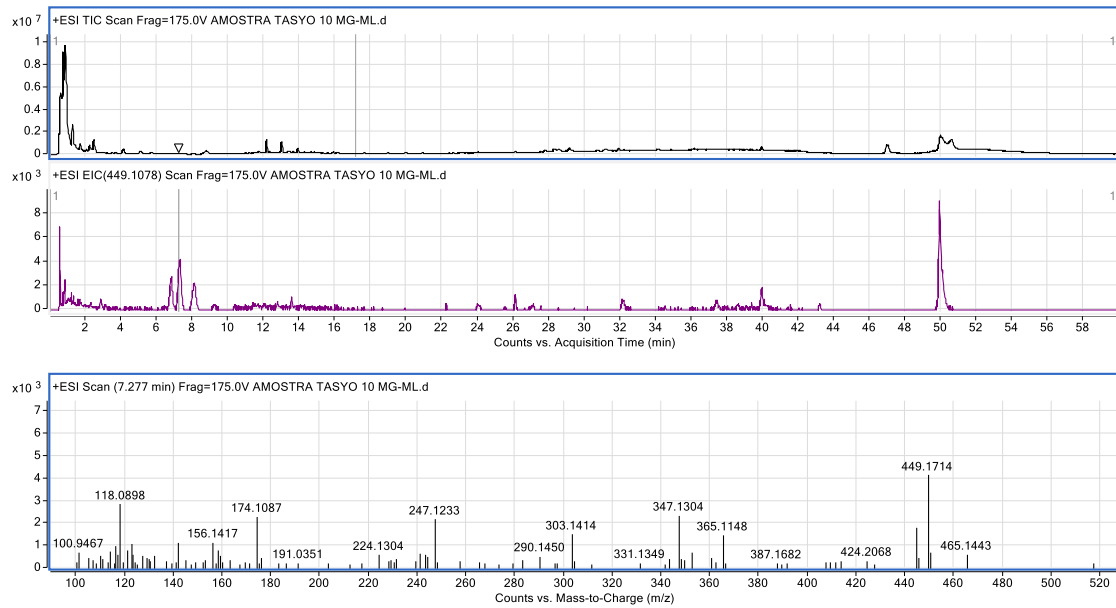


## Trealose

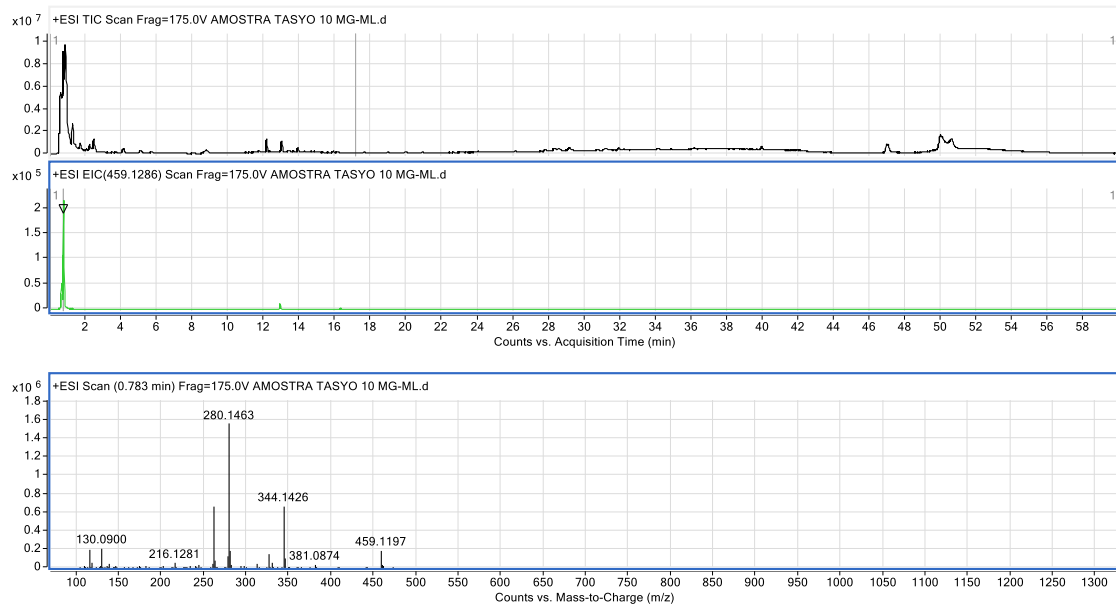


**(-)-lariciresinol****Genisteina 8-C-glicosídeo**

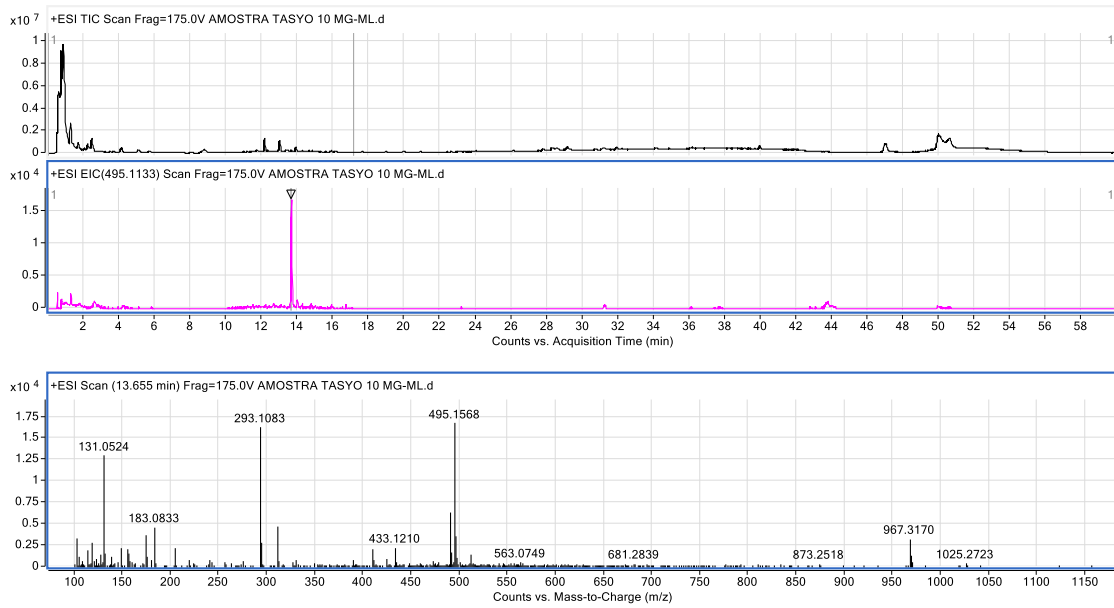
## Luteolina 7-O-glucoside



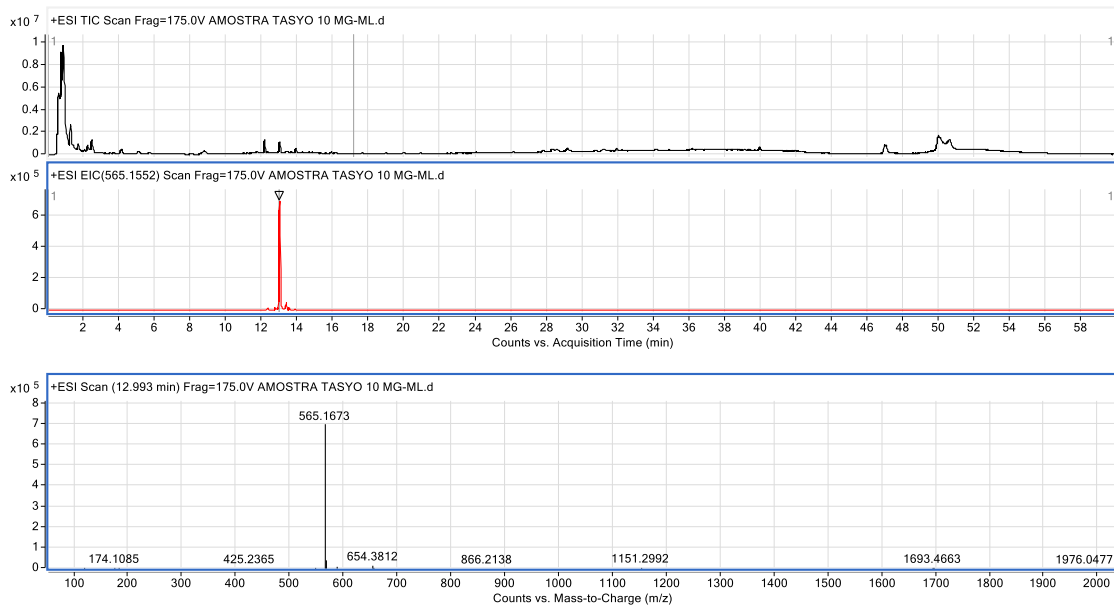
## Acetato de 5-(6-acetiloxi-3, 5, 7-trimetoxi-4-oxocromen-2-il)-2-metoxifenilo



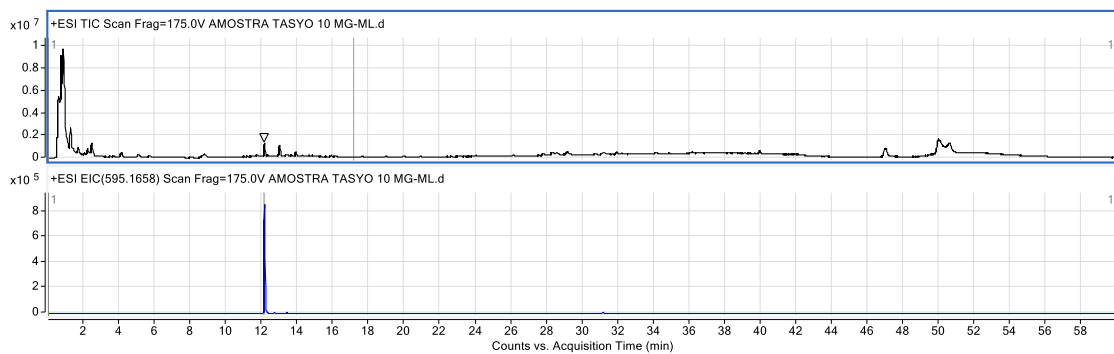
## Patulitrina

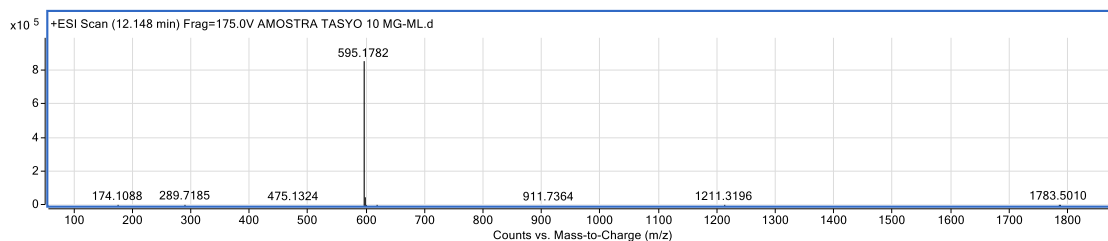


## Apigenina-6-C-glicosídeo-8-Carabinosídeo

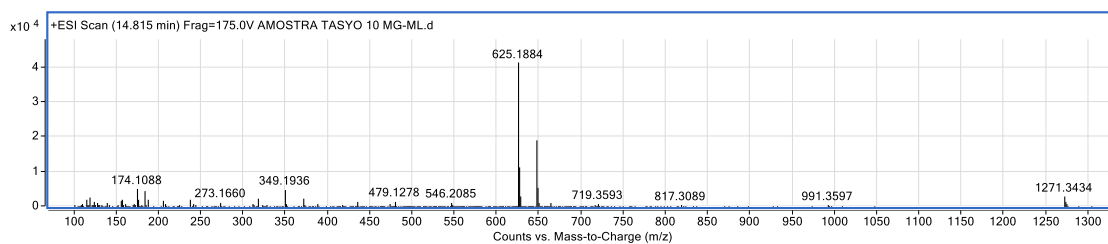
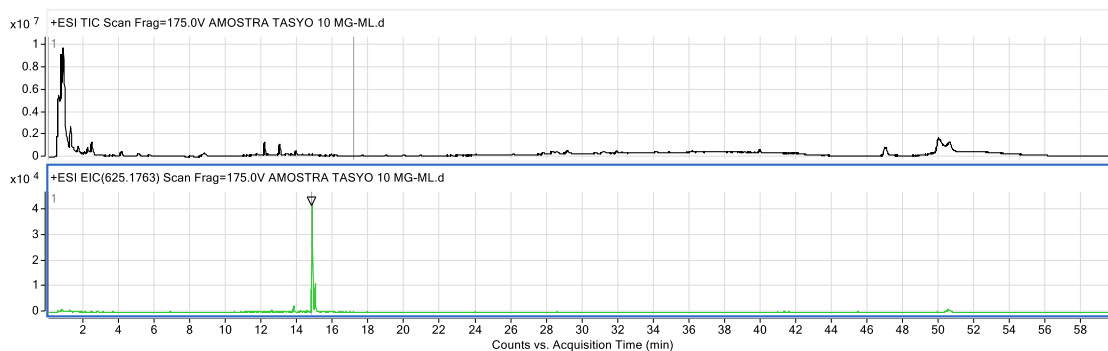


## Apigenina-6,8-di-C-glicosídeo/Saponarina

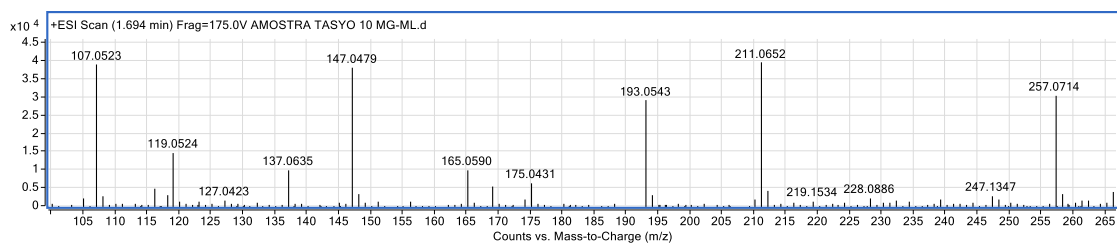
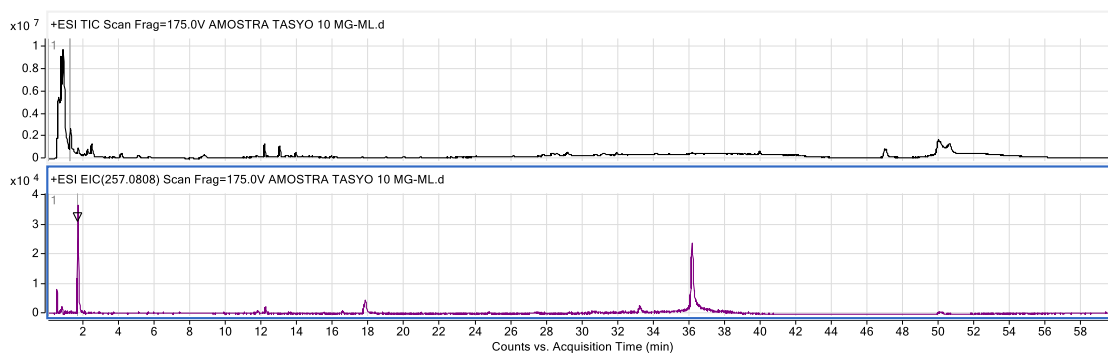




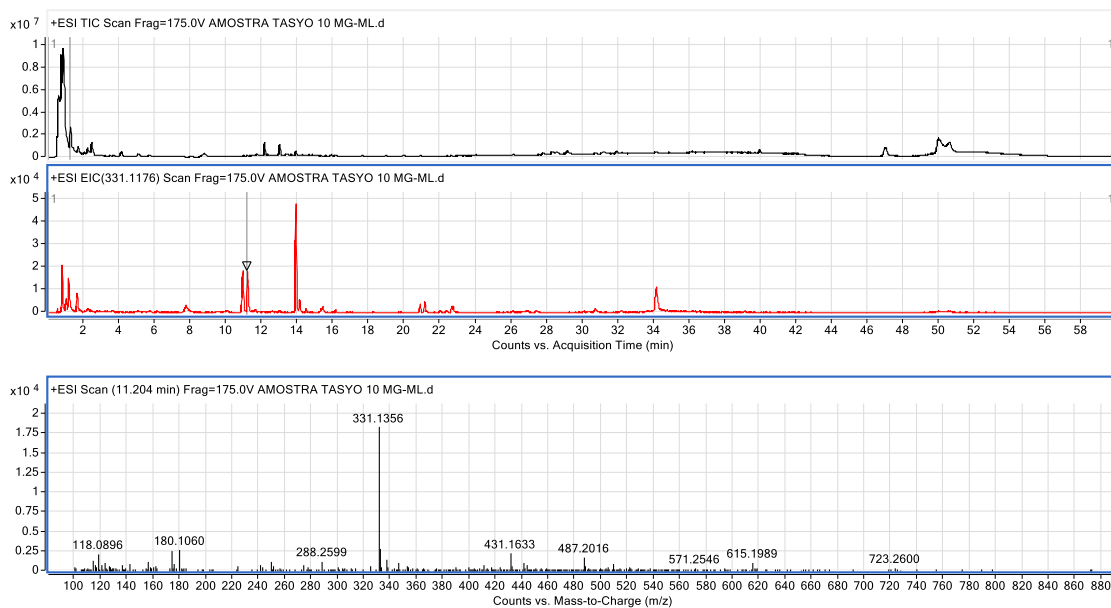
### Isorhamnetina -3-O-rutinosídeo (Narcisina)



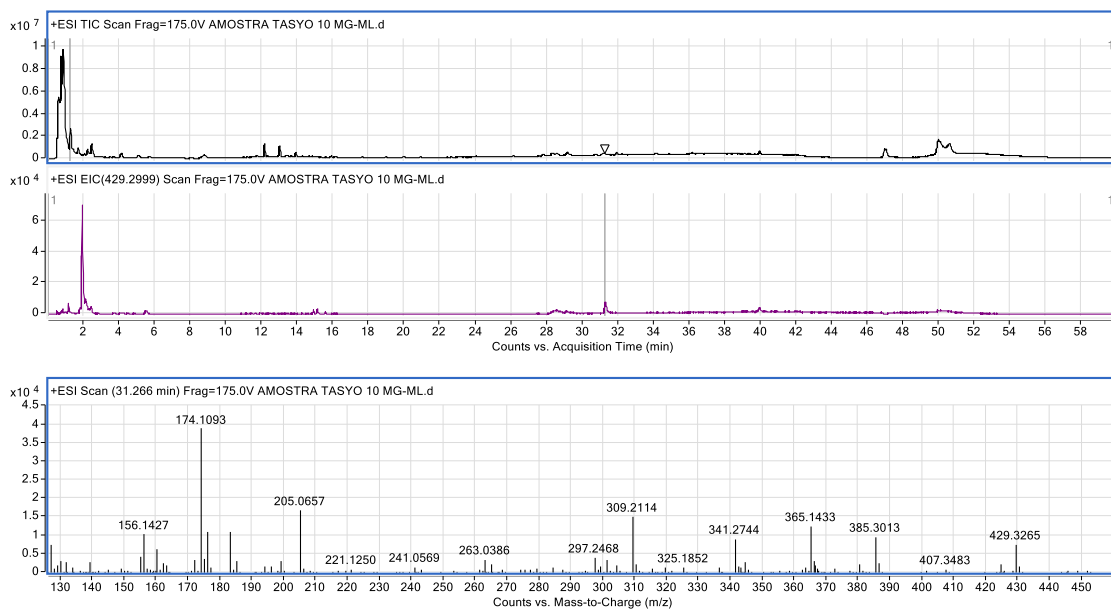
### 5,7- dihidroxiflavona



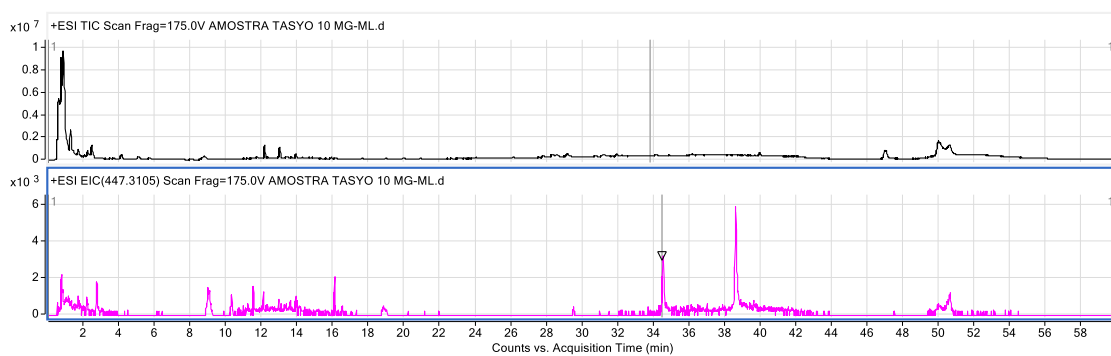
## 7-O-Metileucomol

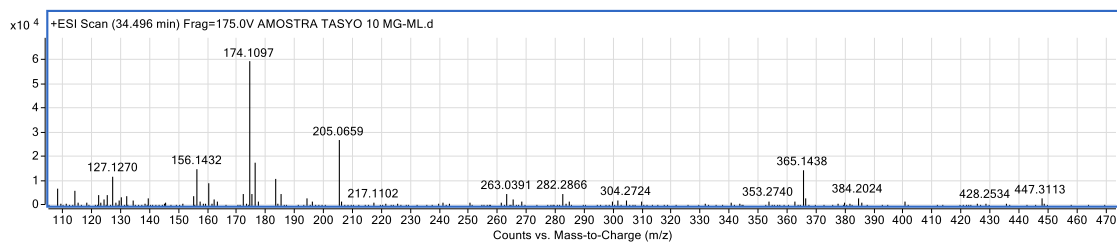


## Botogenina/ dehidrohecogenin

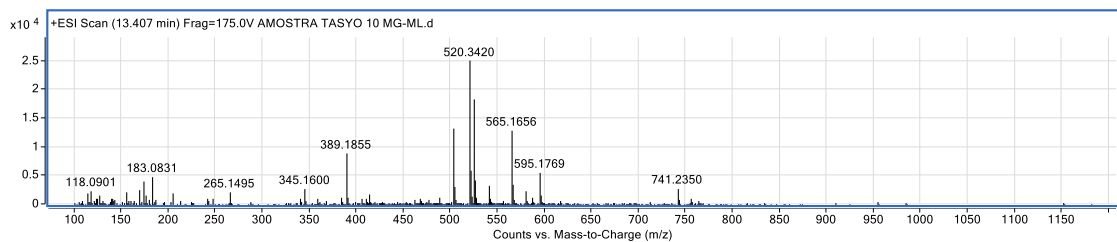
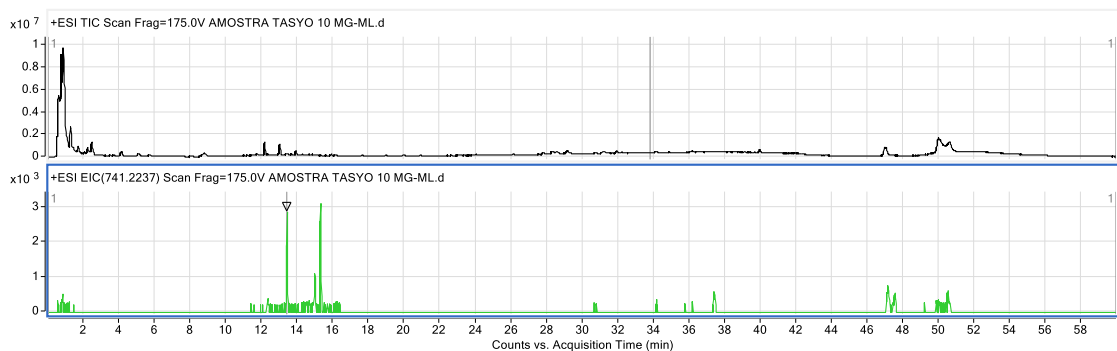


## Manogenina



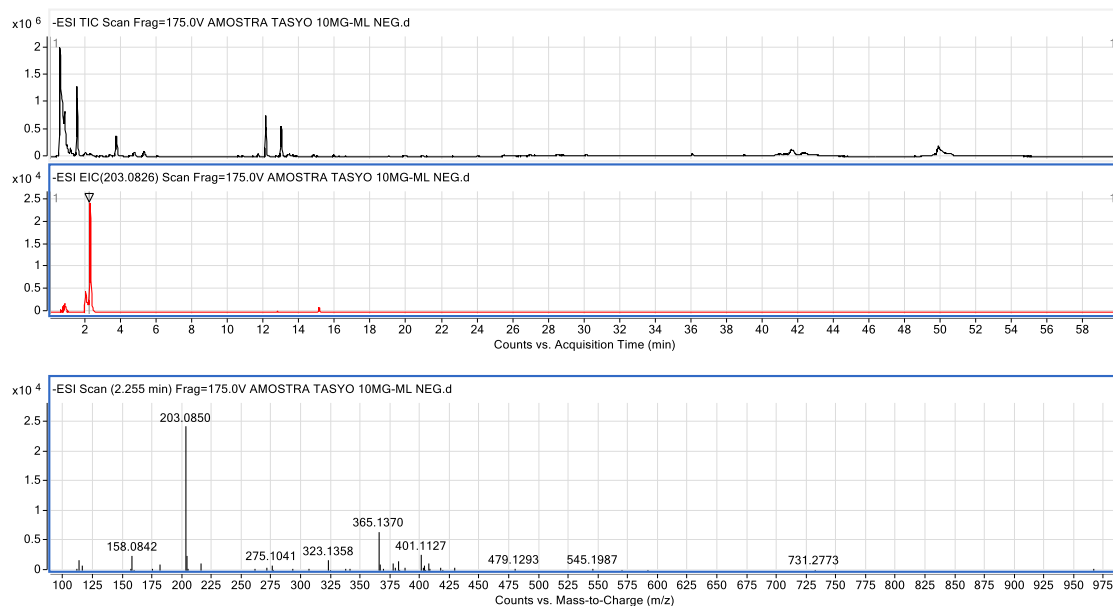


## Canferol 3-(2''-rhamnosylrutinosídeo)

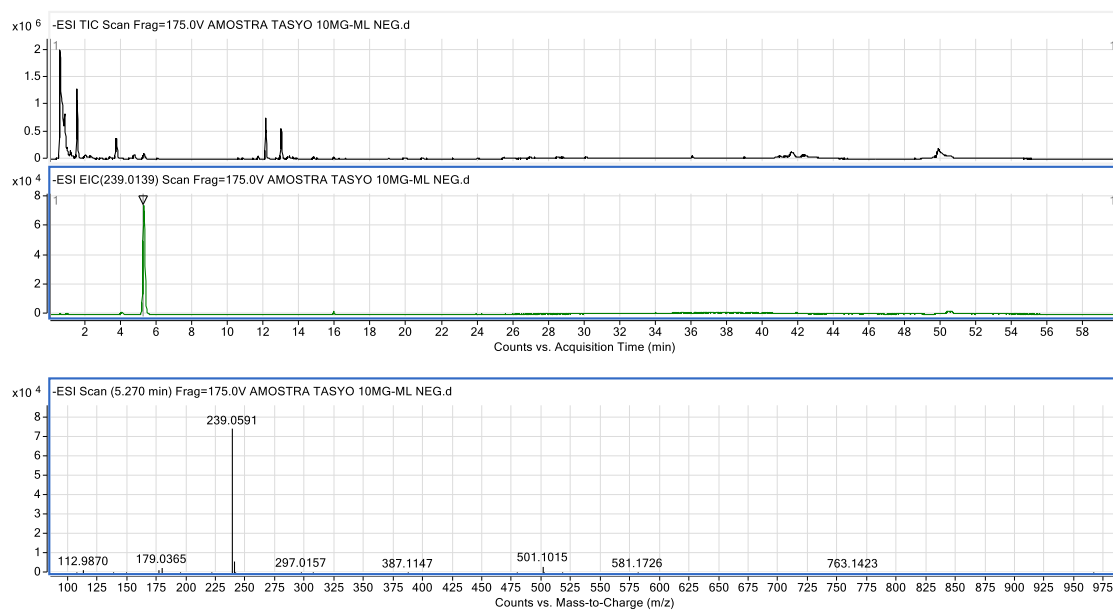


## APÊNDICE B – Cromatogramas e respectivos espectros de massa das amostras de *Prosopis juliflora* do modo negativo, referentes ao tópic 5.2.2.

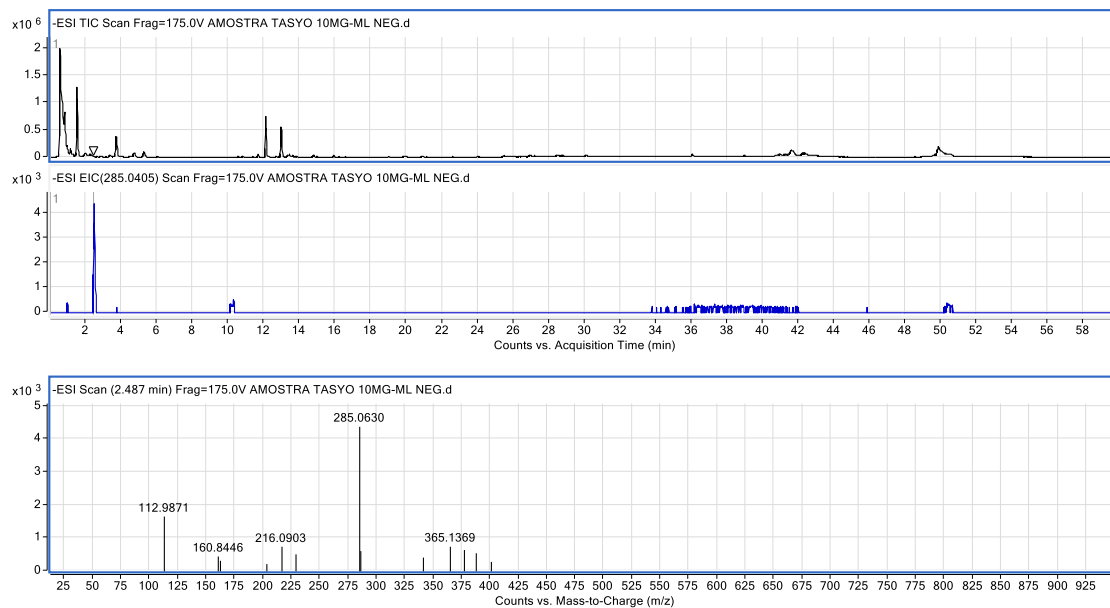
### Triptofano



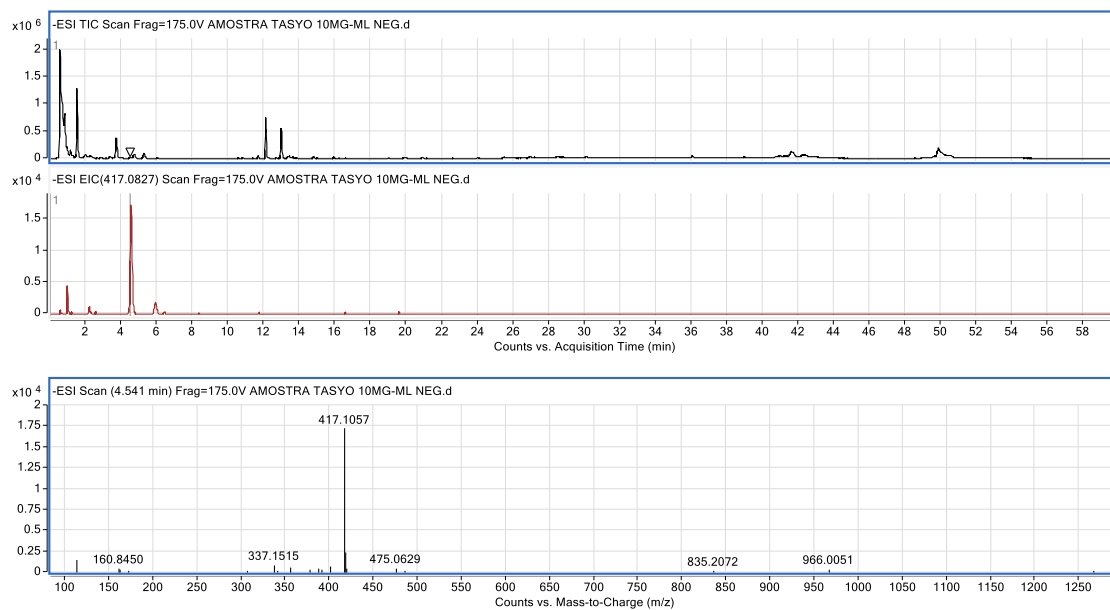
### 3',6-dimetilflavone



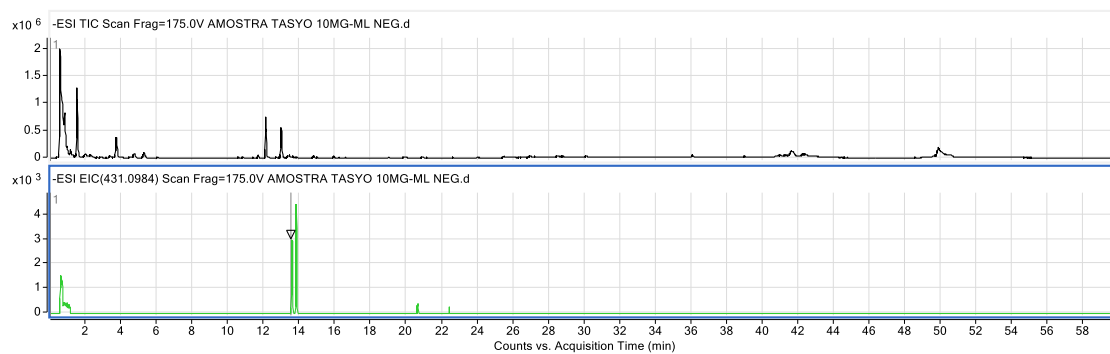
## Luteolina

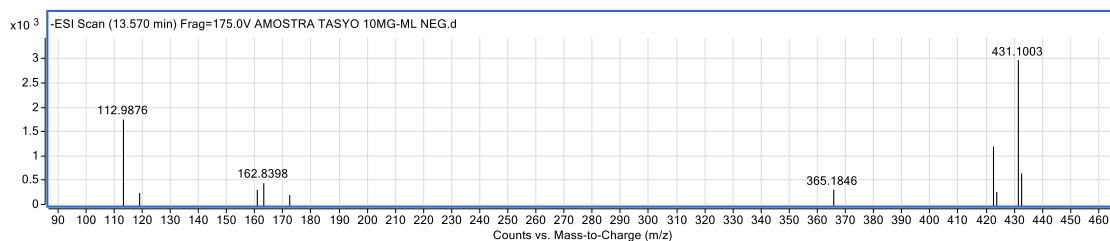


## Canferol 3-O-arabinoside

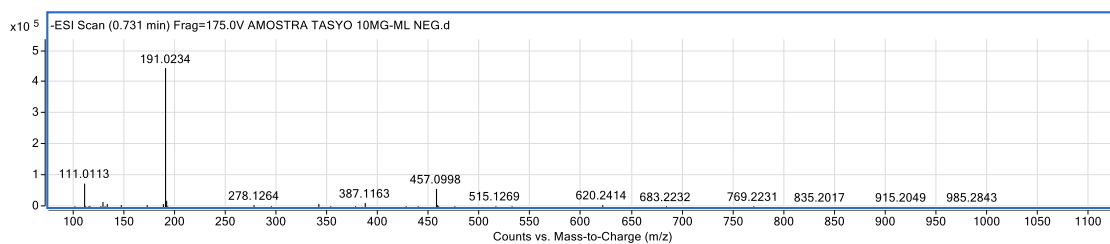
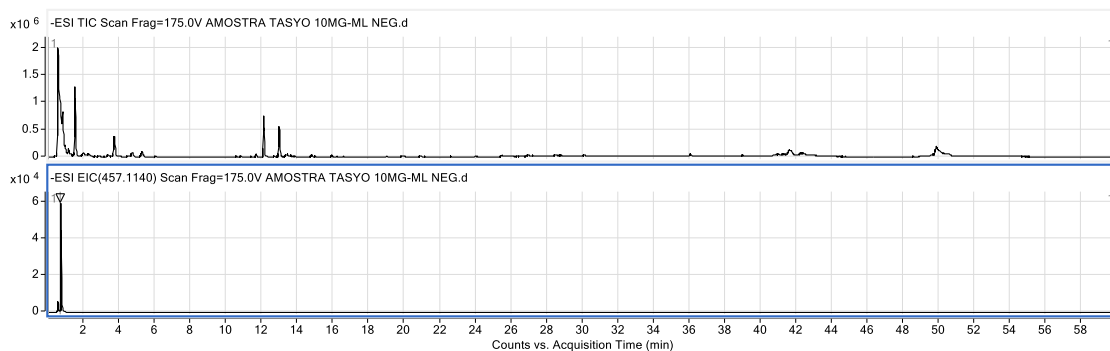


## Genisteina 8-C-glicosídeo

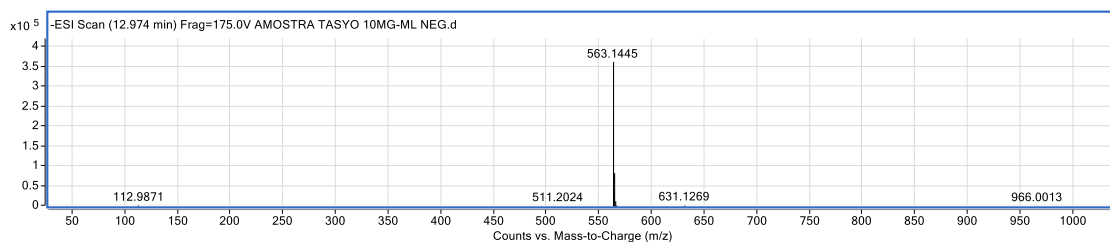
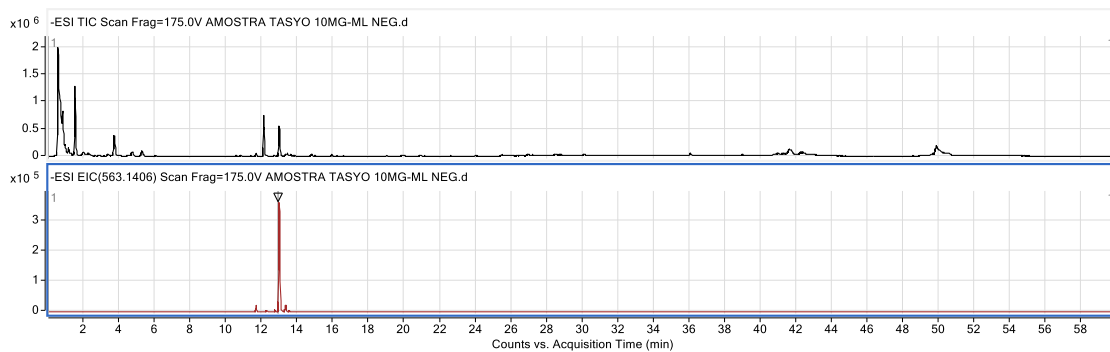




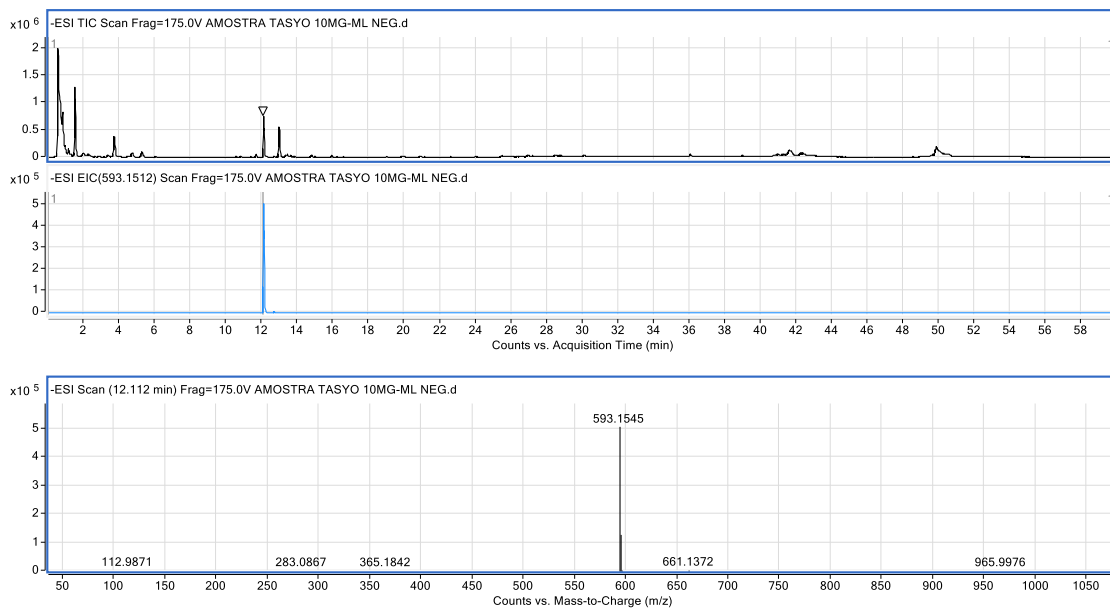
## Acetato de 5-(6-acetiloxi-3, 5, 7 -trimetoxi-4-oxocromen-2-il)-2-metoxifenilo



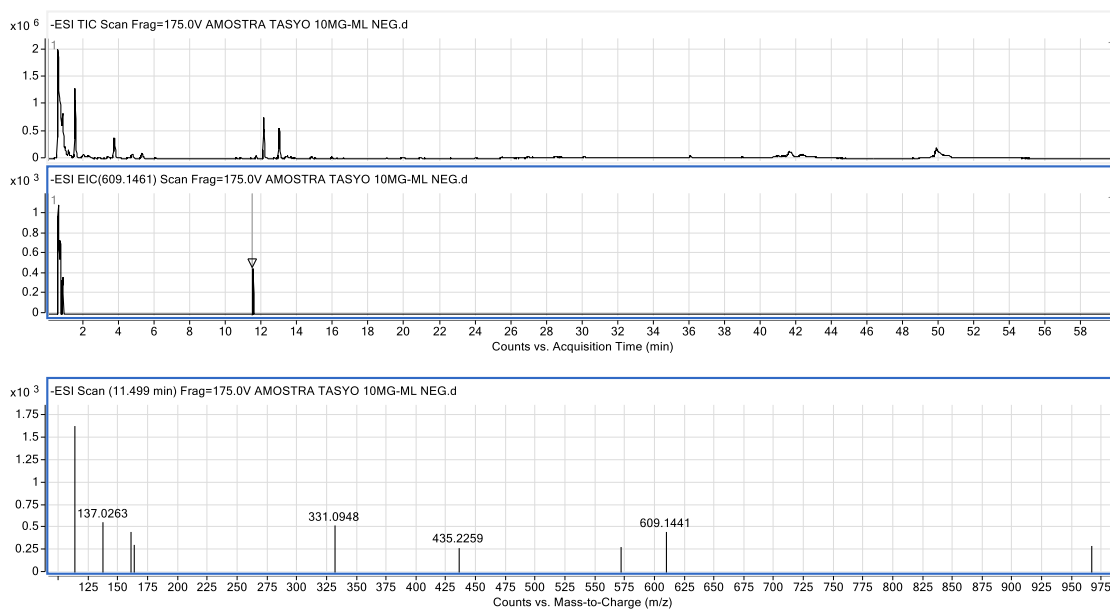
## Apigenina-6-C-glicosídeo-8-Carabinosídeo



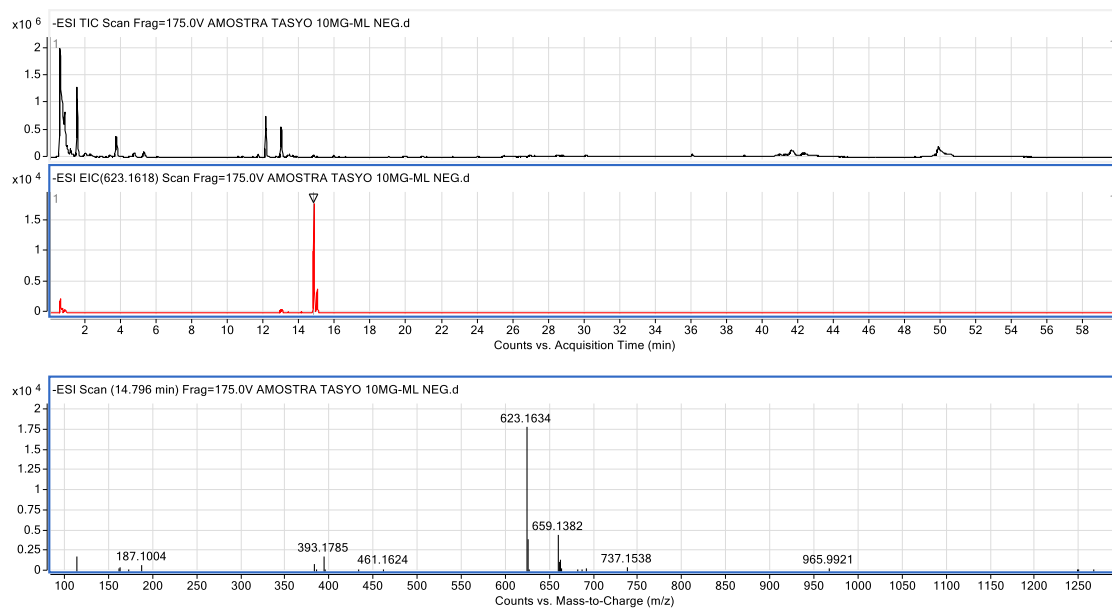
## Apigenina-6,8-di-C-glicosídeo



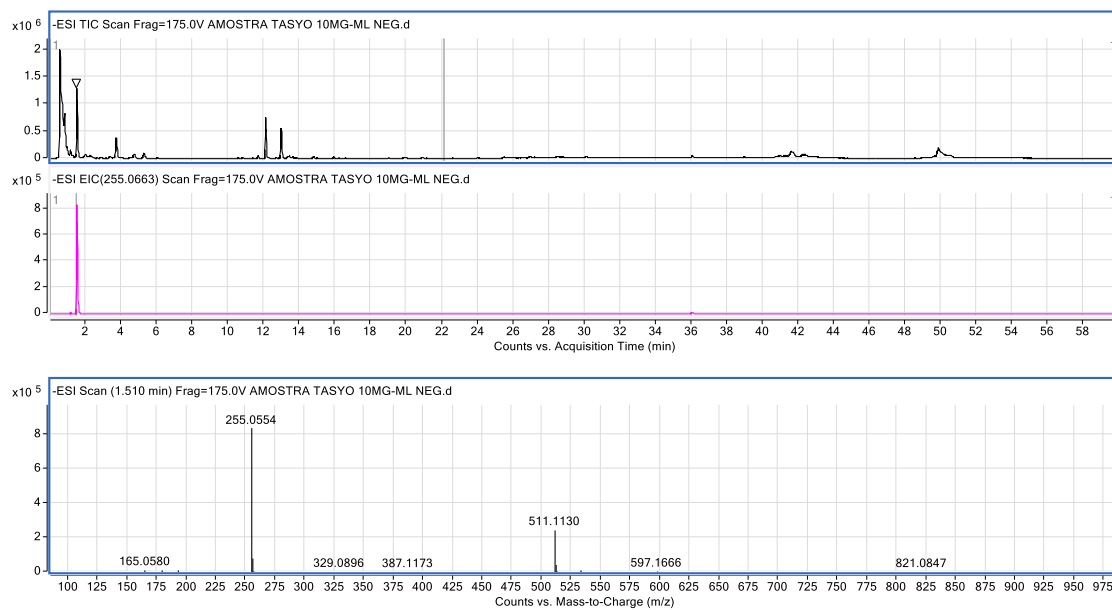
## Quercitina 3-O- rutinoside



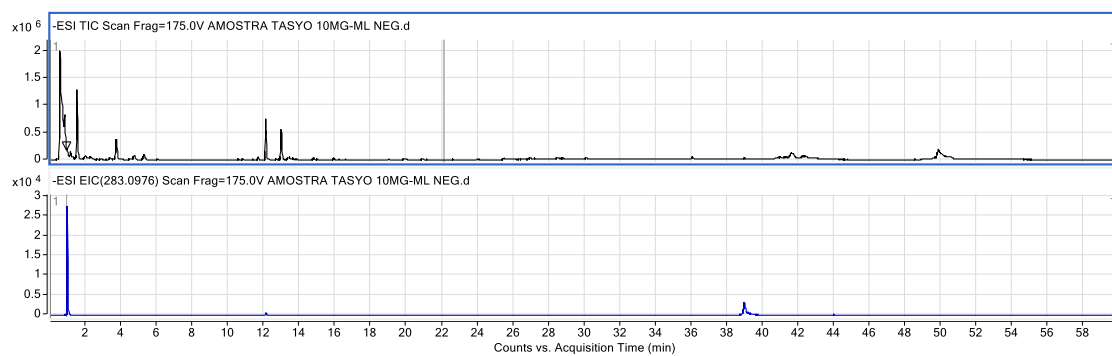
## Isorhamnetina -3-O-rutinosídeo (Narcisina)

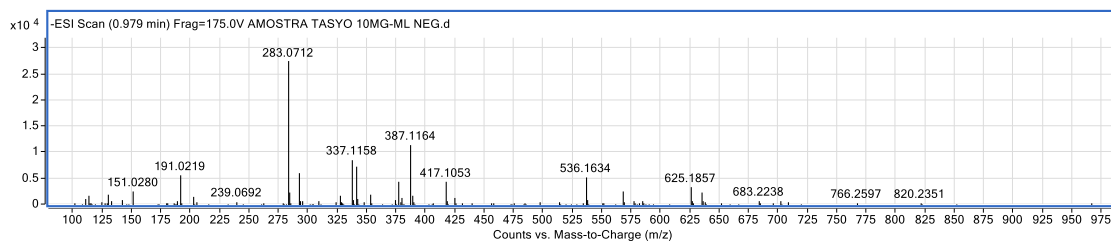


## 5,7- dihidroxiflavona

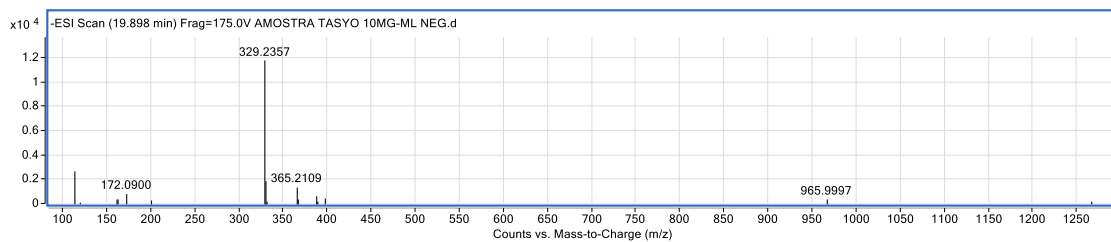
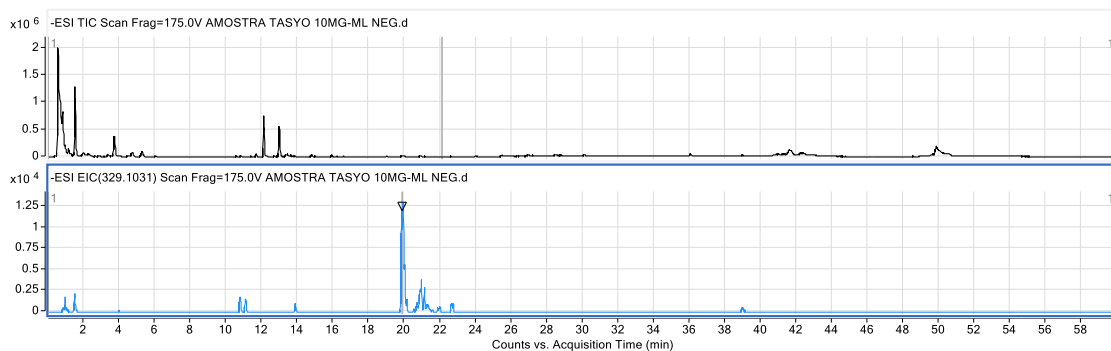


## dihidro-bonducelina

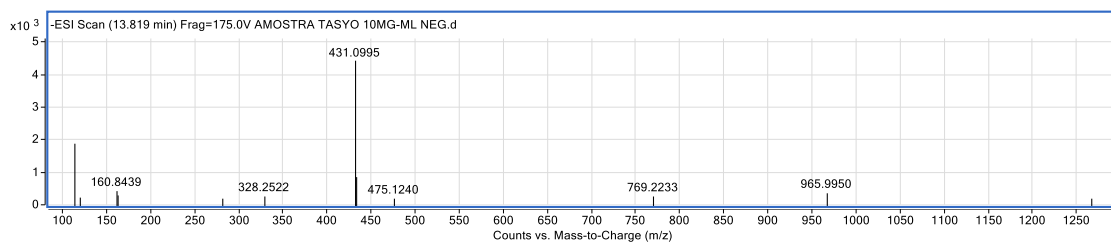
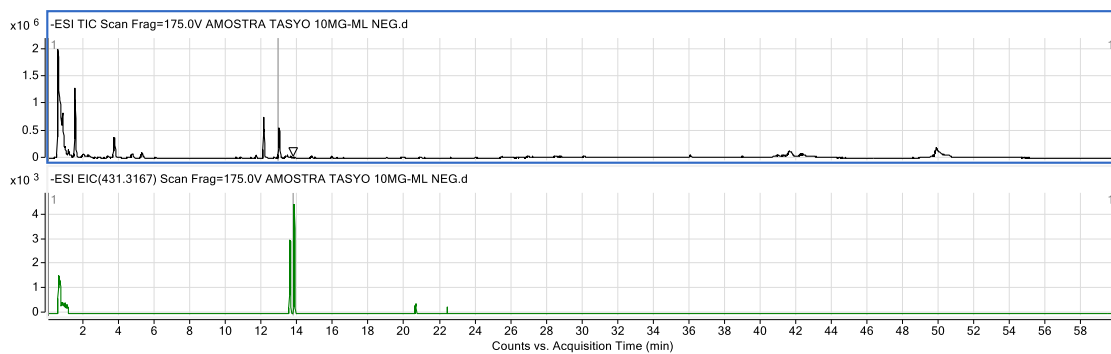




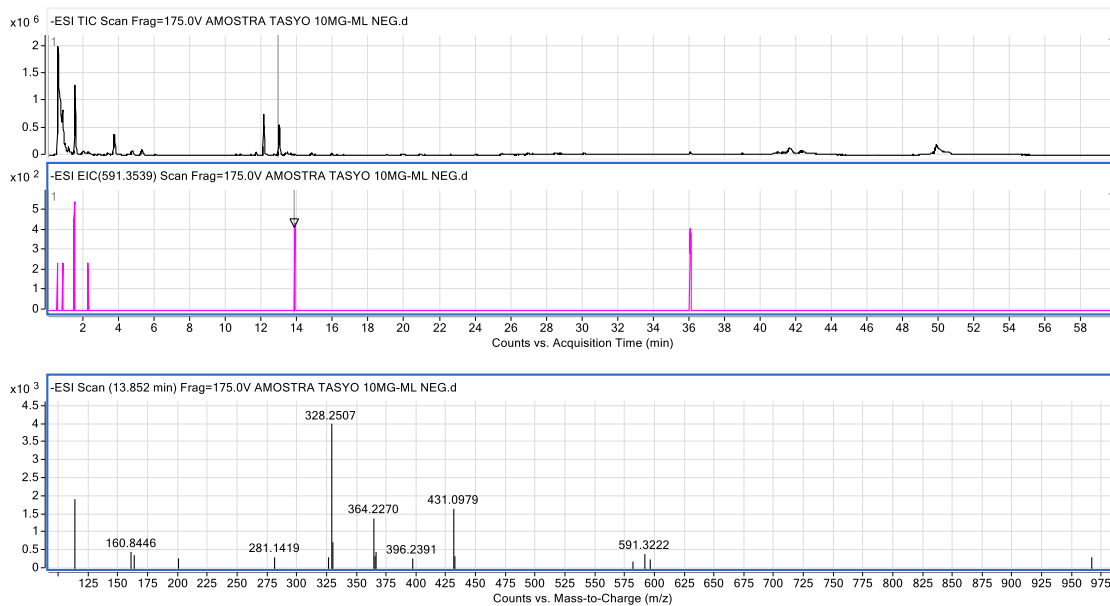
## 7-O-Methyleucomol



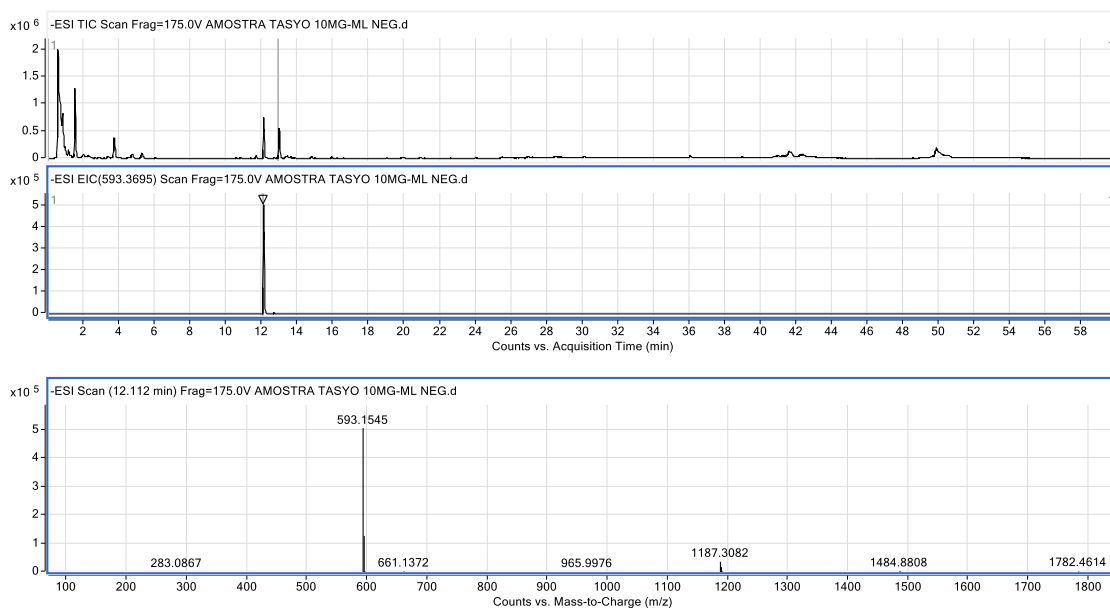
## 12-epi-rockogenina/Barbourgenina/Clorogenina/Gitogenina/Rockogenina/Ruizgenina



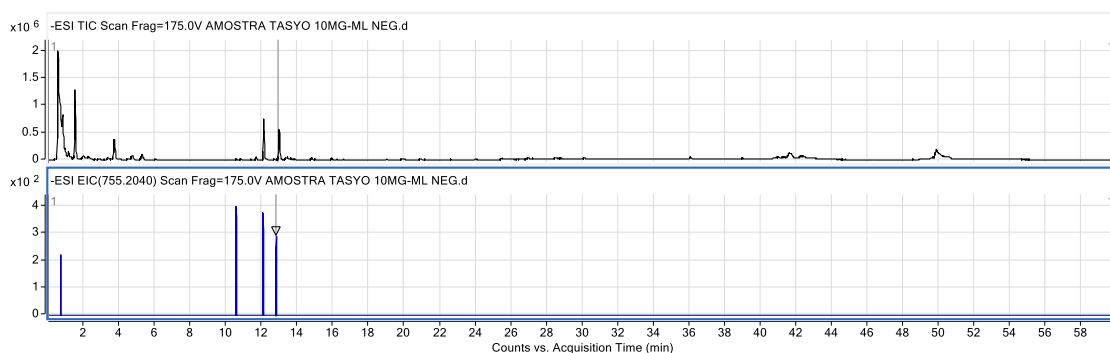
## Agavosídeo A

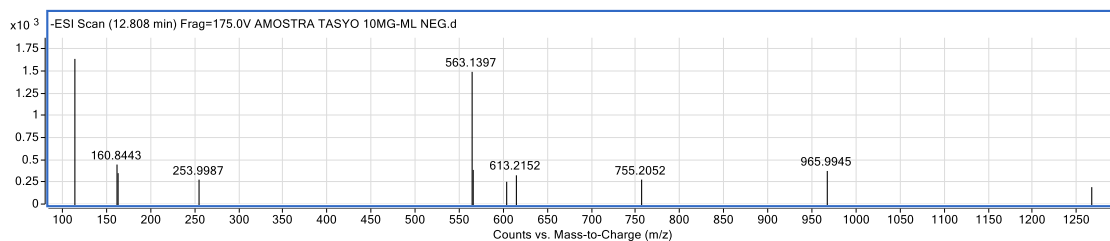


## Clorogenina 3-O-b-D-glucopiranosídeo/ Clorogenina 6-O-b-D- glucopiranosídeo

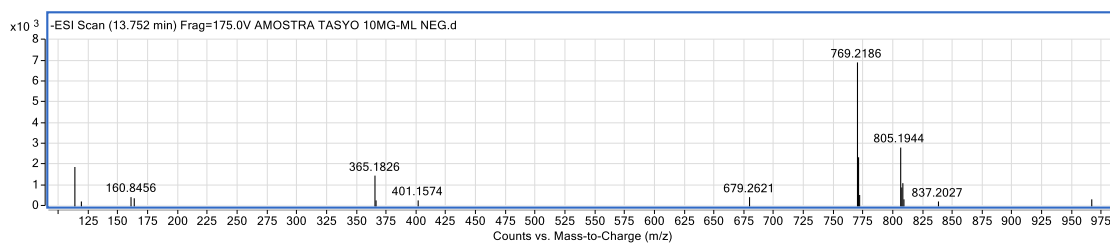
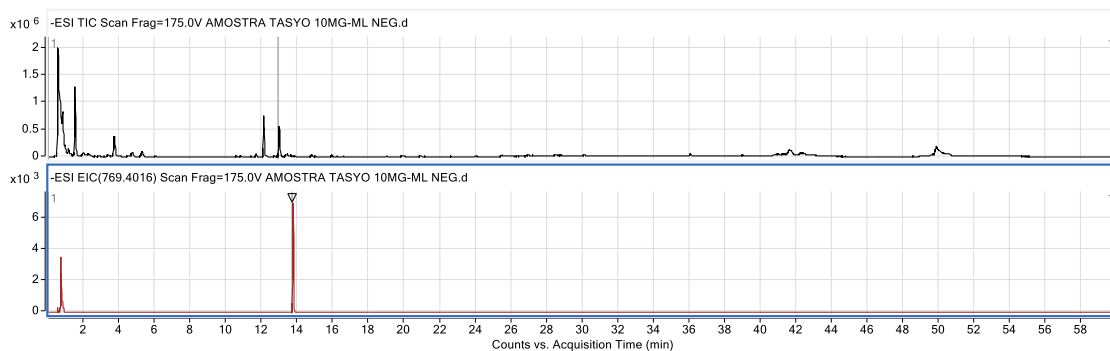


## Canferol 3-rutinosídeo-4'-glucosídeo





### (25R)-5a-Spirostan-3b,6a-diol-12-one 3,6-di-O-b-D-glucopiranosídeo



### Agamenosídeo H

