

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE FARMÁCIA**

ROBERTTA JUSSARA RODRIGUES SANTANA

**EXTRAÇÃO GUIADA DE FENÓLICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DAS
CASCAS DO FRUTO DE *Punica Granatum* PARA PRODUÇÃO DE
FORMULAÇÃO ANTI-IDADE**

ARACAJU – SE

2022

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE FARMÁCIA

EXTRAÇÃO GUIADA DE FENÓLICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DAS CASCAS
DO FRUTO DE *Punica Granatum* PARA PRODUÇÃO DE FORMULAÇÃO ANTI-
IDADE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de
Farmácia da Universidade
Tiradentes como pré-requisito
para obtenção de título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana
Cordeiro Cardoso

ARACAJU – SE

2022

Título: Extração guiada de fenólicos antioxidantes a partir das cascas do fruto de *Punica granatum* para produção de formulação anti-idade.

Resumo:

As cascas da romã são ricas em compostos fenólicos com ações antioxidantes e fotoprotetoras, além de serem consideradas resíduos para a indústria alimentícia, sendo consideradas interessantes devido critérios ligados às ações farmacológicas e critérios sustentáveis para a obtenção de extratos ativos. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de extrato com alto teor de compostos fenólicos de forma sustentável para produção de formulação cosmética. O processo extrativo preliminar determinou o tempo e o método de extração, em função do rendimento em massa e da concentração de ácido gálico (AG) e ácido elágico (AE) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em uma segunda etapa, foi executado o planejamento fatorial 2², estudando os fatores temperatura de extração e acidez da solução aquosa extratora. Os extratos obtidos nesta etapa foram fracionados com acetato de etila. Como variável resposta, foram avaliados o rendimento, o teor de fenólicos totais, a concentração de AG e AE por CLAE e atividade antioxidante pelo método do DPPH. Foi selecionado para o desenvolvimento de formulações cosméticas o extrato que apresentou melhor conjunto de características. Foram testadas diferentes bases cosméticas para incorporação dos extratos. A formulação selecionada foi submetida a testes de estabilidade preliminar. A maceração dinâmica em 60 minutos foi selecionada como condição extrativa para os testes do planejamento fatorial. No extrato bruto, houve influência dos fatores temperatura e acidez do solvente extrator para a variável resposta rendimento, porém estes não foram capazes de alterar significativamente o teor de fenólicos. Já para os extratos purificados, tanto o rendimento da extração quanto o teor de fenólicos totais apresentaram influência dos fatores estudados. Foi selecionado o extrato obtido em água destilada e temperatura ambiente pois apresentou performance extrativa sustentável e alto teor de fenólicos de interesse. O extrato bruto apresentou menor concentração de ácido gálico e elágico que o extrato purificado. No entanto, apresentou maior rendimento massa, gerando maior massa total de ativos, sendo isto confirmado por uma maior atividade antioxidante (IC₅₀ = 496,3 µg/mL). Este extrato também apresentou a melhor solubilização para incorporação na formulação, sendo a base Ômega Gold® selecionada, com pH médio 5.39, estabilidade física quando submetida à estresse mecânico e térmico, sendo estável em temperaturas ≤50°C. Conclui-se que o extrato bruto obtido em condições mais simples (temperatura ambiente, solvente água, método maceração dinâmica) apresentou melhor performance para produção da formulação fitocosmética anti-idade.

Palavras-chave: ácido elágico, ácido gálico, envelhecimento da pele, romã.

Abstract:

Pomegranate peels are rich in phenolic compounds with antioxidant and photoprotective actions, being considered interesting for obtaining active extracts. The objective of this study was to obtain the optimized extract in a sustainable way, for the production of cosmetic formulations. The preliminary extractive process determined the time and method of extraction, in a function of the mass yield and the concentration of gallic acid (GA) and ellagic acid (EA) by high performance liquid chromatography (HPLC). In a second step, a 2² factorial design was performed, studying the factors

extraction temperature and acidification of the extracting aqueous solution. The extracts obtained in this step were fractionated with ethyl acetate. As a response variable were evaluated yield, phenolic content, GA and EA concentration by HPLC and antioxidant activity by the DPPH method. The extract that presented the best set of characteristics was selected for the development of cosmetic formulations. Different cosmetic bases were tested for the incorporation of the extracts. The selected formulation was subjected to preliminary stability tests. Dynamic maceration in 60 minutes was selected as an extractive condition for the factorial design tests. In the gross extract, temperature and acidity of the extractor solvent influenced the yield response variable, but these were not able to significantly alter the phenolic content. As for the purified extracts, both the extraction yield and the total phenolic content were influenced by the studied factors. The extract obtained in distilled water and room temperature was selected because it presented sustainable extractive performance and high content of phenolics of interest. The gross extract showed a lower concentration of gallic and ellagic acid than the purified extract. However, it showed a higher mass yield, generating a greater total mass of actives, which is confirmed by a greater antioxidant activity (IC₅₀ = 496.3 µg/mL). This extract also showed the best solubilization for incorporation into the formulation, with the base Omega Gold® selected, with an average pH of 5.39, physical stability when subjected to mechanical and thermal stress, being stable at temperatures ≤50°C. It was concluded that the gross extract obtained under simpler conditions (room temperature, solvent, water, dynamic maceration method) showed better performance for the production of anti-aging phytocosmetic formulation.

Key-word: ellagic acid, gallic acid, pomegranate, skin aging.

1. Introdução:

A *Punica granatum* é uma espécie originária do Oriente Médio. Durante o processo imigratório, o cultivo desta árvore foi disseminado pelo leste europeu, Ásia, África do Sul e Américas (VILLIS et al., 2021). Pertencente à família Punicaceae, denominada romãzeira, é caracterizada por seu tamanho mediano (12 a 16 pés) e por seus galhos espinhosos, e seus frutos conhecidos popularmente como romã (SUN et al., 2021).

O fruto romã é reconhecido devido sua cor vermelha, sendo constituído por cascas (epicarpo), sementes (mesocarpo) e polpa (endocarpo). As cascas da romã possuem em sua composição fitoquímica compostos fenólicos, flavonoides, estilberos, lignanas, proantocianidinas, ácidos graxos, ácidos orgânicos, terpenos, terpenóides, vitaminas e minerais. As cascas são as partes dos frutos que apresentam maior riqueza fenólica, em termos de concentração de compostos fenólicos (TORREGROSA-GARCÍA et al., 2019) e por esta razão são objeto de inúmeros estudos para aplicação na área de saúde (KIM et al., 2021; BARATI BOLDAJI et al., 2019; GATES, BERNATH & KLEGERIS, 2022).

Os compostos fenólicos atribuem à romã atividades farmacológicas variadas, podendo ser utilizado para tratamento de doenças oxidativas (CHO & SONG, 2018; ALI et al., 2021; CHAN et al., 2021), inflamatórias (MICHICOTL-MENESES et al., 2021; ZHANG et al., 2021), infecciosas (VELOSO et al., 2020; TRABELSI et al., 2020; JAYAN et al., 2021) e endócrinas (AMMAR et al., 2020; AN et al., 2020). A romã é reconhecida também popularmente, devido suas atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica e hipoglicêmicas, além de ações despigmentantes e anticancerígena (BACCARIN & LEMOS-SENNA, 2017; FADDLADEEN & OJAIMI, 2019; MAHMOUDIEH et al., 2020).

Para a extração de tais compostos são utilizadas as cascas dos frutos de *Punica granatum*, devido esta parte apresentar riqueza de compostos bioativos e serem consideradas resíduo da produção de sucos pela indústria alimentícia (LEONTOPOULOS et al., 2022). Estes compostos bioativos presentes nas cascas podem ser extraídos utilizando solventes orgânicos ou aquosos, já que ambos possuem afinidade molecular com compostos fenólicos, classe fitoquímica a qual, o AG, AE e punicalagina, pertencem. As possibilidades do uso de diferentes solventes ou até mesmo a variação de concentração ou acidificação permite que os processos extrativos possam ser avaliados quanto aos fatores e parâmetros que podem melhorar a performance extrativa (FISCHER, CARLE & KAMMERER, 2011; PERŠURIĆ et al., 2020; CAMPOS et al., 2022).

Os estudos de otimização das condições de extração visando substâncias com atividade definida são denominados de extração guiada (LAMPAKIS, SKENDERIDIS & LEONTOPOULOS, 2021; SKENDERIDIS et al., 2021). Estratégias para melhorar a performance do processo extrativo de substâncias antioxidantes a partir das cascas dos frutos de *Punica granatum* usam diferentes metodologias para extração, sendo as mais comuns a maceração dinâmica (a frio ou quente), banho de ultrassom, fluído supercrítico (KUPNIK et al., 2022) e assistida por micro-ondas a vácuo (SKENDERIDIS et al., 2020). Porém, questões relacionadas a viabilidade de escalonamento em relação às limitações tecnológicas e custo operacional também devem ser levadas em consideração.

O extrato das cascas dos frutos de *Punica granatum* vêm sendo empregados em formulações cosméticas, com o intuito de prevenir o envelhecimento e seu dano

oxidativo (KANG et al., 2017; WANG et al., 2021). Essas atividades estão ligadas aos taninos hidrolisáveis como ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e punicalagina (MAGANGANA et al., 2020; ESPOSTO et al., 2021).

O envelhecimento cutâneo é um distúrbio que pode ser dividido em intrínseco e extrínseco, dependendo dos fatores que levaram ao seu desenvolvimento. O primeiro está relacionado ao envelhecimento natural que ocorre ao longo da vida, devido a senescência celular, e de forma lenta. Já o envelhecimento cutâneo extrínseco é causado pela exposição excessiva aos raios ultravioleta (UV) e de maneira secundária devido a poluição, fumaça, nutrição e uso de produtos cosméticos considerados tóxicos a longo prazo (TOBIN, 2017; KRUTMANN et al., 2017). O envelhecimento cutâneo é comum na região facial (cerca de 80% dos casos), sendo mais incidente em mulheres, devido a fatores hormonais relacionados ao ciclo menstrual (KWON et al., 2019; RAJANALA, MAYMONE & VASHI, 2019).

O principal mecanismo do envelhecimento cutâneo é o estresse oxidativo gerado pela produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), devido a ativação da via inflamatória do ácido araquidônico e à presença de fatores anti-inflamatórios (GU et al., 2020). A cascata inflamatória, que leva à produção de EROs, inicia-se com o recrutamento de células (leucócitos) e citocinas anti-inflamatórias (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos), em conjunto com interleucinas, fibrinopeptídeos e radicais livres. Estas séries de ações do organismo servem para tentar conter o dano ao tecido cutâneo, e ocasionam a oxidação da parede lipídica das células epiteliais afetadas, causada pela ativação da via do ácido araquidônico. O tratamento para o estresse oxidativo responsável pelo envelhecimento cutâneo extrínseco se dá pelo uso de substâncias antioxidantes sintéticas ou de origem vegetal (BAUMANN, 2018).

A utilização de extratos vegetais ricos em polifenóis em cosméticos antioxidantes tem sido descrita na literatura, devido ao potencial destas substâncias reduzir o estresse oxidativo sem causar efeitos tóxicos a longo prazo (DE LIMA CHERUBIM et al., 2020). Além disso, cosméticos contendo extratos vegetais apresentarem característica “ecofriendly”, que chamam atenção de muitos consumidores, e fazem com que a indústria se interesse cada vez mais por estes produtos, que apresentam conceito sustentável e eficácia contra o estresse oxidativo derivado do envelhecimento cutâneo (BUJAK et al., 2021).

Desse modo, o presente trabalho tem por objetivo, otimizar o processo extrativo de substâncias antioxidantes das cascas dos frutos de *Punica granatum* levando em consideração os critérios de eficiência antioxidante do extrato, custos financeiros e ambientais e facilidade de incorporação do extrato em formulação de base cosmética, visando o tratamento do estresse oxidativo causado pelo envelhecimento cutâneo extrínseco.

2. Metodologia:

2.1. Preparação da amostra vegetal:

2.1.1. Coleta dos frutos de *Punica granatum*

As amostras de casca do fruto *P. granatum* foram obtidas no mercado local de Aracaju (Sergipe, Brasil), onde adquiriu-se as amostras já secas, as quais foram utilizadas para a etapa de otimização de extração.

Amostras da casca do fruto de *P. granatum* também foram doadas (provenientes do município de Penedo/Alagoas, Brasil, 10°16'44"S, 36°33'52"W), as quais foram selecionadas, higienizadas e armazenadas sob refrigeração (-12°C a -18°C). A partir destas amostras foram conduzidos os experimentos relativos ao desenvolvimento da formulação. Os frutos frescos foram então descascados para secagem.

2.1.2. Preparação da biomassa a partir das cascas do fruto de *Punica granatum*:

A secagem do fruto decorreu de acordo com Hanafy et al. (2021), com modificações. As cascas foram dispostas em bandejas de alumínio, com distância de cerca de 2 cm de distância em si e então secas em estufa à 40°C \pm 2°C durante 4 dias.

As amostras da etapa de otimização da extração foram pulverizadas em moinho de facas (1SL-21, Solab Científica). As amostras de frutos secos foram pulverizadas em liquidificador industrial e armazenadas em ambiente com umidade controlada (dessecador contendo sílica).

As cascas pulverizadas passaram por separação granulométrica, utilizando tamis de 250 μ m de diâmetro.

2.1.3. Influência da umidade na biomassa:

A amostra das cascas de romã pulverizada (biomassa), foram submetidas a determinação da higroscopia utilizando o teor de umidade da amostra pulverizada seca, e assim poder-se-á nas etapas seguintes calcular o rendimento real dos extratos obtidos, além de ser utilizado para estabelecer as condições de armazenamento desta amostra.

A determinação da umidade da biomassa pulverizada sob condições de armazenamento em ambiente com alta e baixa umidade foi realizada a partir da pesagem das amostras já pulverizadas em balança de infravermelho (MOC63u, Shimadzu Corporation). As amostras de biomassa foram acondicionadas em ambiente com alta umidade relativa (70% UR \pm 5%) por 30 dias (MORERZELLE, 2012; TROIANI, 2020). Após a determinação de umidade, as amostras foram então armazenadas em condições de baixa umidade (sílica) por mais 30 dias. Ao final deste período, foram novamente submetidas a medida na balança de infravermelho. Todo o experimento foi realizado em temperatura ambiente. As medidas do teor de umidade (%) foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem (ANVISA, 2019).

2.2. Otimização do processo extrativo:

A otimização do processo extrativo ocorreu em várias etapas. Inicialmente foi selecionada a metodologia e o tempo de extração. Estes parâmetros foram avaliados utilizando como variável resposta o rendimento do processo extrativo (%).

Tais resultados serviram para definição das condições do planejamento fatorial, no qual foram analisados a influência da acidez no solvente extrator e temperatura de extração. Uma etapa posterior de purificação destas amostras foi realizada visando o enriquecimento do extrato em substâncias fenólicas. Nestas etapas, as variáveis respostas foram o rendimento do processo extrativo (%), teor de fenólicos, concentração de AG e AE e atividade antioxidante. Estas variáveis foram comparadas para escolha do extrato com melhor performance extrativa.

2.2.1. Determinação do método e tempo de extração

O processo extrativo utilizando os métodos de maceração dinâmica e banho ultrassônico foi realizado em diferentes tempos de extração (15, 30, 45 e 60 min) e na

temperatura de 50°C. Para tanto, 0,2% da biomassa (M_i , partículas <250 μm) foram colocadas em contato com a solução extratora (solução aquosa de ácido acético a 5%). As amostras foram filtradas e o sobrenadante congelado e submetido ao processo de liofilização para remoção do solvente (M_f). Todo procedimento foi realizado em triplicata e o rendimento do processo extrativo foi calculado pela equação 1:

$$R = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Na qual,

R= rendimento (%)

M_f = massa final após filtração e eliminação do solvente

M_i = massa da biomassa (base seca)

2.2.2. Avaliação da influência da temperatura e acidez do solvente extrator

A otimização do processo de extração das cascas do fruto de *P. granatum* foi realizada por meio de um planejamento fatorial 2^2 com repetições no ponto central. Os fatores estudados foram acidificação da solução extratora (% ácido) e temperatura de extração, tendo como variáveis respostas: o rendimento massa (%) (calculado conforme equação 1, item 2.2.1), teor de fenólicos totais (item 2.3.1), concentração de AG e AE (item 2.3.2) e atividade antioxidante (2.3.3). O método de extração utilizado foi o de maceração dinâmica com controle de temperatura e sistema condensador acoplado. A concentração do pó das cascas do fruto de *P. granatum* (partículas <250 μm) foi de 2 mg/mL (0,06 g para 30 mL de solvente), e o tempo de extração foi de 60 minutos. O planejamento fatorial foi realizado de acordo com os parâmetros descritos na tabela 1.

Tabela 1. Planejamento Fatorial 2^2

Experimentos	Acidificação da solução extratora (% ácido acético)	Temperatura (°C)
1	0	25
2	0	75
3	10	25
4	10	75
5	5	50

6	5	50
7	5	50

2.2.3. Fracionamento dos extratos aquosos de *P. granatum*

Os extratos aquosos oriundos dos testes do planejamento fatorial foram liofilizados, ressuspensos em água na concentração de 2 mg/mL e então fracionados três vezes com acetato de etila, em uma proporção 1:1 (v/v) e em temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) utilizando um funil de separação. Em seguida, os solventes de cada uma das frações (acetato de etila e água) foram eliminados em estufa à 50°C por 3 dias (BEN AHMED et al., 2017; HBIKA et al., 2022; CARDULLO et al., 2020). As amostras foram avaliadas quanto rendimento em massa (%) (equação 1, 2.2.1), fenólicos totais (item 2.3.1), além da caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência, para identificação e quantificação dos compostos majoritários de interesse (ácido gálico e ácido elágico) (item 2.3.2) e a sua atividade antioxidante (item 2.3.3).

2.3. Caracterização do extrato aquoso das cascas do fruto de *P. granatum*:

2.3.1. Determinação de Fenólicos totais

A metodologia utilizada para avaliação de teor fenólico dos extratos de *Punica granatum* foi realizada conforme descrito por Karim et al. (2021) com modificações. Para obtenção da curva de calibração (anexo 1) foram utilizadas soluções padrões de ácido gálico (AG) nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L em água destilada. Para o ensaio de fenólicos foram utilizados 0,25 mL de cada concentração de padrões ou das amostras (2 mg/mL), sendo adicionadas a 2,0 mL da solução de Folin-Ciocalteu (3%) e 2,5 mL de água destilada, seguido de agitação em vórtex (10 s) e repouso de 5 minutos. Passado este tempo, acrescentou-se 0,25 mL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 10%, seguido por agitação em vórtex e incubada por 60 minutos. A leitura das absorbâncias foi feita no comprimento de onda de 720 nm. Para obtenção do branco (ensaio sem amostra ou padrão), o qual foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizou-se 0,25 mL de água destilada em substituição da amostra/padrão.

O experimento foi feito em triplicata, e o resultado expresso em mg equivalentes de ácido gálico por g do extrato.

2.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As condições para realização da CLAE foram desenvolvidas para o presente trabalho, baseando-se em Meneses et al. (2020). Os extratos de *Punica granatum* obtidos no estudo de otimização da extração e posteriormente purificados, foram filtrados (membrana de PTFE, 0,22 µm) e diluídos em metanol na concentração de 50 mg/L.

A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex Hyperclone®, 150 x 4,6 mm, porosidade de 5 µm). O volume de injeção foi de 20 µL e a vazão da fase móvel foi de 1 mL/min. A fase móvel consistiu em um gradiente de (A) água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila (grau HPLC). O método analítico empregou um gradiente de variação da fase móvel (B) como sistema de eluição, começando com 20% por 2 min, 30% por 4 min, 50% por 6 min e 70% por 8 min, retornando às condições iniciais em 10 min. Os compostos foram identificados por meio de co-injeções de padrão comparando os tempos de retenção, área dos picos, analisados no comprimento de onda de 254 nm.

Os padrões utilizados foram: ácido gálico (400 mg/L) (C₇H₆O₅; Sigma-Aldrich®) e ácido elágico (100 mg/L) (C₁₄H₆O₈; Sigma-Aldrich®). Os padrões foram diluídos em metanol (grau HPLC). Para a análise quantitativa, as curvas de calibração de cada padrão foram preparadas utilizando cinco concentrações do padrão (75, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 e 0,01 mg/L) em triplicata.

2.3.3. Ensaio de eliminação de radicais DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Para a avaliação da atividade antioxidante foram selecionados os extratos bruto e purificado que apresentaram melhores performances reunindo o conjunto de características estudadas observando os critérios de viabilidade econômica (menor custo, alto rendimento) e ambiental (processo utilizando solvente sustentável e evitando a produção de resíduo tóxicos). Para a avaliação do maior rendimento de ativos foi utilizada a equação 2, que considera o percentual de rendimento em massa e a concentração dos metabólitos secundários.

$$\% \text{ total do ativo} = \text{rendimento massa (\%)} \times [\text{ácido gálico}] \text{ ou } [\text{ácido elágico}] \quad \text{eq. 2}$$

A atividade antioxidante do extrato de *P. granatum* foi realizada a partir do ensaio de sequestro do radical DPPH, de acordo com Pires et al., 2017. A solução de DPPH foi preparada na concentração de 32 µg/mL em metanol e homogeneizada em vórtex por 40 min.

As amostras do extrato das cascas do fruto de *Punica granatum* foram diluídas nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL. Para a obtenção da curva padrão, soluções de ácido gálico nas concentrações entre 0,5 – 2 µg/mL foram preparadas.

Para a determinação do percentual de sequestro do radical livre DPPH, um volume de 20 µL de cada concentração de padrão ou extrato foi misturado a 280 µL da solução de DPPH. Uma amostra “branco” homogeneizando 20 µL de metanol e 280 µL da solução de DPPH também foi realizada. As misturas foram incubadas por 30 min, em temperatura ambiente. A absorbância para leitura foi em 517 nm, sendo o equipamento zerado com metanol. O percentual de inibição foi determinado de acordo com a equação 3.

$$\%inibição = \frac{(Ab-Aa)}{Ab} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Em que,

- Ab = absorbância do branco;
- Aa = absorbância da amostra.

A concentração efetiva da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH (EC50) foi calculada por regressão não linear utilizando os valores de concentração da amostra em função do % inibição. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.4. Desenvolvimento das formulações cosméticas:

2.4.1. Teste de solubilidade do extrato

A metodologia utilizada para o estudo de solubilidade do extrato foi realizada de acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2008), com alterações. O experimento ocorreu em temperatura ambiente (25°C±5°C) e em triplicata, em que, 4 mg do extrato seco das cascas dos frutos de *P. granatum* foram dissolvidos em volumes crescentes de solventes (água deionizada,

propilenoglicol e etanol 70%). Os resultados foram expressos em mg dissolvida por mL do solvente (tabela 2).

Tabela 2 – Termo descritivo para classificação de solubilidade de massa (g) em mL de solvente, de acordo com a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira.

Termo descritivo	Volumes aproximados de solvente em mg por mL de substância
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Moderadamente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

2.4.2. Incorporação do extrato na formulação

A incorporação do extrato em diferentes bases cosméticas comerciais, comumente utilizadas em farmácias magistrais foi avaliada de acordo com o grau de solubilização do extrato, homogeneidade e características macroscópicas. As composições qualitativas das bases Bio Sérum®, HydraFresh® e Ômega Gold® (BIOTEC Dermocosméticos, AQUIA®), estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Composição das bases cosméticas.

	Hydra Fesh®	Ômega Gold®	Bio Sérum®
Composição	Hydrogenated Olive Oil Unsaponifiables	Glyceryl Stearate	EDTA Dissodium
	Hydrogenated Ethylhexyl Olivatate	PEG100 Stearate	Phenoxyethanol
	Phenoxyethanol/Glycol Stearate	Sodium Acrylates Copolymer	Polyquaternium-10
	Glycol Distearate	Hydrogenated Polyisobutene	Aqua
	Olus Oil	Phospholipids	Propylene Glycol
	Camelina Sativa Oil	Polyglyceryl-10 Stearate	Hydroxyethylcellulose
	Dissodium EDTA	Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil	Methy Gluceth-20
	Aqua	Phenoxyethanol	-
	Sodium Acrylates Copolymer	Hydrogenated Olive Oil Unsaponifiables	-
	Hydrogenated Polyisobutene	Hydrogenated Ethylhexyl Olivatate	-
	Phospholipids	Behenyl Alcohol	-
	Polyglyceryl-10 Stearate	Glyceryl Stearate	-
	Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil	Lecithin	-
	Vegetable Oil	Glycine Soja (Soybean) Sterols	-
	Olus Oil	EDTA Dissodium	-
	-	Aqua	-
	-	Diisopropyl Adipate	-
-	Cyclomethicone	-	

-	Dimethicone	-
-	Croospolymer	-
-	Olus Oil	-
-	Camelina Sativa Oil	-

Os extratos foram previamente solubilizados em quantidade suficiente (q.s.) de água destilada, propilenoglicol e etanol 70%. A incorporação deste material nas diferentes bases cosméticas gerou uma concentração final de 2% m/m e os aspectos macroscópicos foram analisados.

2.5. Estabilidade preliminar:

A formulação selecionada foi avaliada quanto às suas características físico-química (pH), estabilidade física (ensaio de centrifugação) e estabilidade térmica.

2.5.1. Determinação do pH

O pH da formulação selecionada foi determinado utilizando pHmetro. A formulação foi solubilizada em água (1:10) e submetida à medição. O experimento foi realizado em triplicata (KANLAYAYATTANAKUL et al., 2020).

2.5.2. Estabilidade física

O experimento ocorreu de acordo com Silva et al. (2019). Pesou-se 4 g de cada formulação e realizou-se a centrifugação (37,8 G), durante 30 min, em temperatura ambiente. O teste foi realizado em triplicata, os resultados avaliados macroscopicamente e pontuados de acordo com os escores apresentados no quadro 1.

Quadro 1 – Critérios e escores para avaliação de estabilidade de fases da formulação cosmética.

	Escore		
	0	1	2
Critérios	Formação de sedimento compactado (<i>caking</i>) Coalescência	Separação de fases Precipitação	Permanece estável ou apresentou pequenas alterações (separação de fase insignificante)

2.5.3. Estabilidade térmica

O teste de estresse térmico foi realizado de acordo com Batista et al. (2022) com modificações. Para isto, 2 g das amostras (formulação e base cosmética) foram submetidas a banho-maria na temperatura de 40°C por 30 minutos. Após este tempo, as amostras foram avaliadas e a temperatura foi alterada para 50°C, deixando-as por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido aumentando-se as temperaturas para 60 e 70°C. Os resultados foram analisados, macroscopicamente, analisando-se a presença de instabilidades no sistema da formulação (alteração de cor e consistência).

2.6. Análise de estatística:

Os dados foram submetidos a análise ao teste t (paramétrico) quando havia dois resultados a serem comparados. Quando os resultados se apresentaram com distribuição paramétrica, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. Foi adotado valor de $p \leq 0.05$ quando houvesse diferença estatística.

3. Resultados e Discussão:

3.1. Caracterização da matéria-prima:

3.1.1. Determinação do tamanho de partícula do pó das cascas de *P. granatum*

A biomassa obtida no processo de pulverização (com malha do moinho de 2.000 μm) das cascas dos frutos de *Punica granatum* foi de 64,0 g, sendo esta utilizada para o processo de otimização do extrato. Este pó passou pelo ensaio de granulometria, obtendo uma biomassa equivalente a 67,09% com partículas $\geq 250 \mu\text{m}$ e 32,91% com partículas $< 250 \mu\text{m}$. As cascas dos frutos de *P. granatum* coletados em Penedo foram pulverizados em liquidificador industrial, sendo utilizados para experimentos de desenvolvimento da formulação, apresentaram 70,02% com partículas $\geq 250 \mu\text{m}$ e 29,98% para partículas $< 250 \mu\text{m}$ (figura 1).

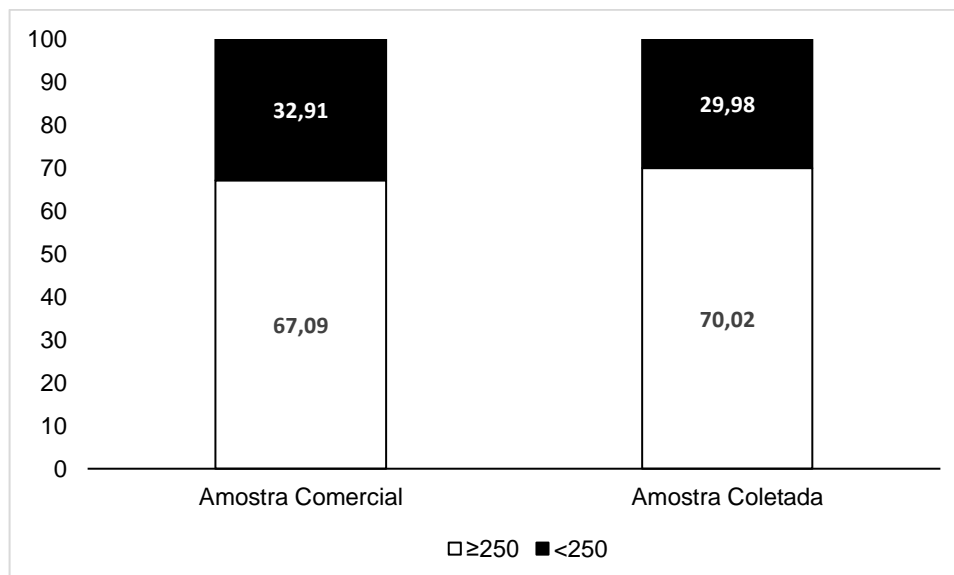


Figura 1 – Distribuição granulométrica do pó das cascas dos frutos de *P. granatum* de diferentes origens. Amostra Comercial (amostra adquirida seca, no mercado local de Aracaju/SE) e amostra coletada no município de Penedo/AL.

Os tamanhos de partícula escolhidos foram aqueles retidos em tamis com aberturas <250 µm. A escolha foi baseada na premissa de que quanto menor o tamanho de partícula maior a superfície de contato o que por sua vez melhora o tempo de extração e contribui para estabilidade, fazendo com o que a extração atinja o equilíbrio em menor tempo (SIMÕES et al., 2014). Este tamanho de partícula possibilita uma extração melhor, mais rápida e ainda auxilia no processo de obtenção de uma extração otimizada, já que irá interferir diretamente na cinética de extração. Foi possível observar que ambas as formas de pulverização (moinho e liquidificador industrial) apresentaram distribuição granulométrica equivalentes.

3.1.2. Determinação do teor de umidade (%)

As possíveis características higroscópicas da biomassa, ou seja, se esta possui capacidade de alterar sua umidade em função da umidade do meio em que se encontra foram avaliadas. Os resultados da determinação de umidade demonstraram que as cascas de *Punica granatum* pulverizadas possuíam $9,0 \pm 1,7\%$ de umidade logo após a pulverização do material. Após armazenamento em alta umidade por 30 dias, as amostras analisadas apresentaram teor de umidade de $10,0 \pm 0,7\%$ (figura 2). Estas mesmas amostras, posteriormente armazenadas em condições de baixa umidade (sílica) por mais 30 dias, mantiveram o teor de umidade apresentando $9,6 \pm 1,9\%$. Estes resultados demonstram um material com características não higroscópicas, pois não

houve diferença significativa no teor de umidade quando armazenados em ambientes com diferentes umidades relativas ($p=0,8$).

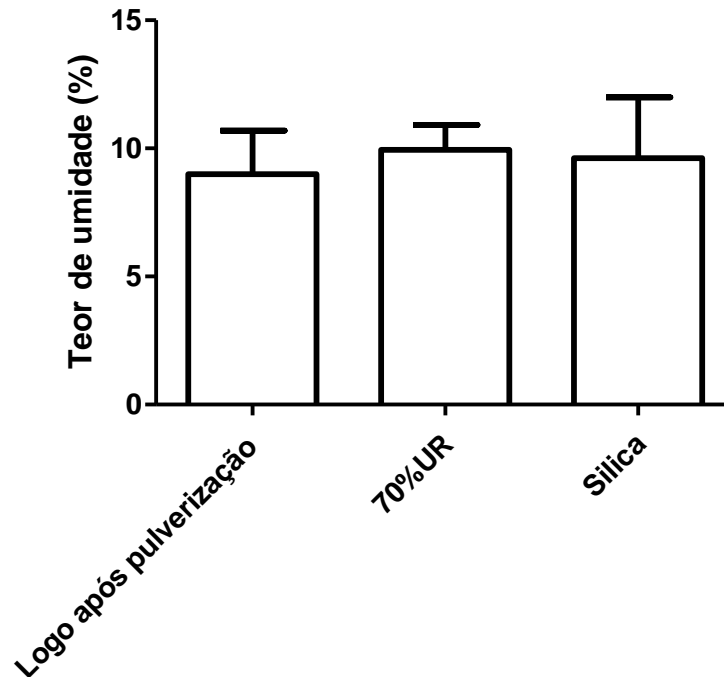


Figura 2 – Teor de umidade (%) da biomassa obtida a partir das cascas de *P. granatum* (Anova seguido de Tukey, $p=0,8$).

El Barnossi, Moussaid & Housseini (2020) demonstraram que o valor de umidade de amostras de material pulverizado a partir de cascas de romã foi de cerca de 7%, pouco menor do que encontrado nos resultados deste trabalho.

3.2. Determinação do método e tempo de extração

As curvas apresentadas na figura 3 comparam as cinéticas de extração das metodologias estudadas, onde definiu-se qual método apresenta melhor performance, em termos de rendimento (%).

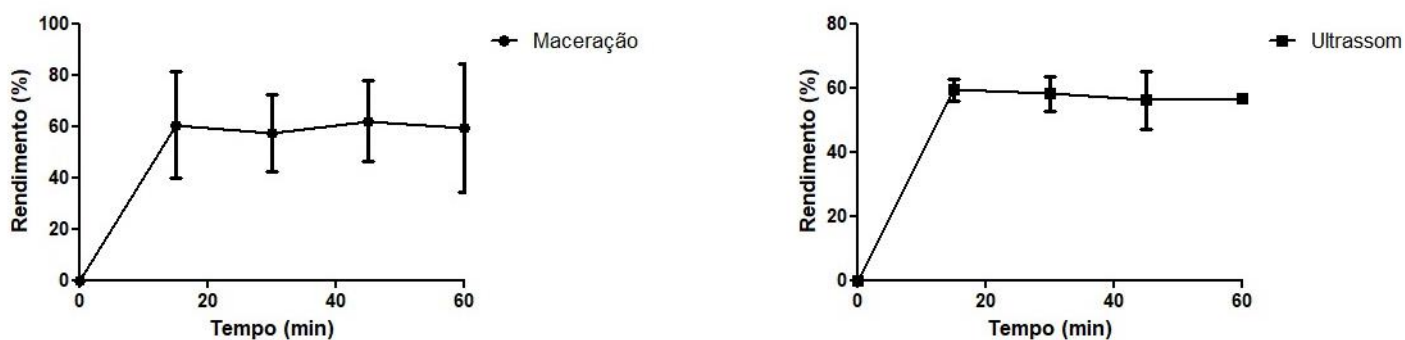


Figura 3 – Comparação de métodos (maceração dinâmica e banho de ultrassom) e tempo de extração das cascas dos frutos de *P. granatum*. Avaliação por meio de performance em rendimento.

Na figura 3 foi possível observar que não houve diferença significativa dos valores de rendimento entre os métodos extrativos estudados. Ambos os processos podem ser utilizados resultando em alta performance extrativa (rendimento > 60%). No entanto, o método de maceração dinâmica foi selecionado, pois pode-se obter um extrato com aparelhagem simples, acessível economicamente e passível de escalonamento industrial (SILVA & ARAGÃO, 2009; MOURA, RAFFIN & SANTOS, 2011; TOUR & TALELE, 2011; BRIGHENTI et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Em relação ao tempo extrativo, os dados apontam que a partir de 15 minutos, os valores de rendimento atingiram um patamar constante para as duas metodologias, permanecendo na faixa de 50 a 60% de rendimento. Com isso, o tempo de extração a partir de 15 minutos, com as condições extrativas utilizadas nestes experimentos, já foi suficiente para atingir o máximo de rendimento no sistema proposto.

Entretanto quando foi comparado o processo extrativo em relação a concentração dos ácidos gálico (figura 4A) e elágico (figura 4B) presente nos extratos obtidos em 15 e 60 minutos de extração, foi evidenciado que para a obtenção de maior concentração de ácido elágico, foi necessário um tempo maior de extração.

Em relação a extração de ácido gálico, o tempo não influenciou a concentração obtida, sendo o extrato obtido em 15 ou 60 minutos iguais entre si ($p > 0,05$). Para o ácido elágico, o tempo de extração influenciou significativamente ($p = 0,0001$), onde o extrato obtido em 60 minutos apresentou aumento da concentração de ácido elágico.

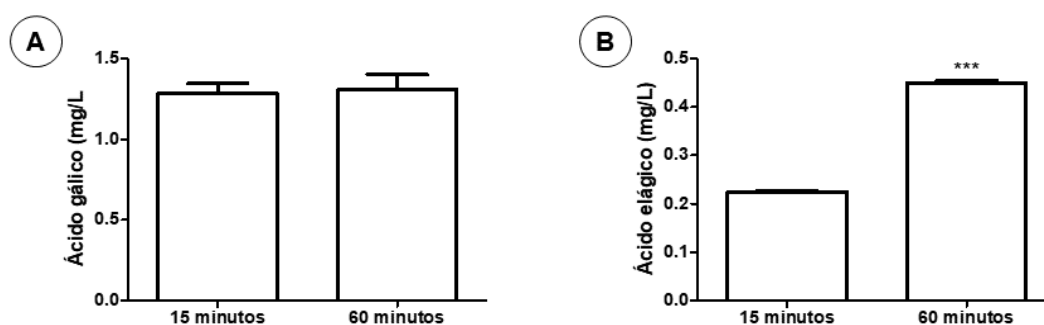


Figura 4 – Influência do tempo de extração em 15 e 60 minutos (A) na concentração de ácido gálico (mg/L) e (B) concentração de ácido elágico (mg/L), por quantificação cromatográfica. (A) Não houve diferença significativa e (B) Diferença significativa com $p=0,0001$. Teste t não paramétrico. As condições de extração foram: maceração dinâmica, à temperatura ambiente e na proporção de 1:500.

A presença de ácido gálico em quantidades constantes a partir de 15 minutos de extração, indica a facilidade de solubilização nas condições adotadas. Esta molécula é um dos compostos encontrados majoritariamente nas cascas de romã e ainda é reconhecido como precursor da via de biossíntese de outros taninos hidrolisáveis. Por esta razão é um composto que possui facilidade de ser arrastado pela solução extratora (HABASHI et al., 2019). O fato do ácido elágico se apresentar em maior quantidade nos extratos obtidos em 60 minutos pode ser explicado pelo estudo de Pretotos et al. (2021), que demonstraram que o rendimento em termos de riqueza fenólica é maior e se torna constante em 60 minutos de extração.

Assim, para os experimentos de otimização posteriores, diferentes condições foram utilizadas, selecionou-se o tempo de 60 minutos para garantir que em outras condições extrativas, o equilíbrio de transporte de massa também fosse atingido.

3.3. Avaliação da influência da temperatura e acidez do solvente extrator

Nesta etapa foram conduzidos por meio de planejamento fatorial, onde as condições escolhidas para método de extração e tempo foram definidas na etapa anterior (maceração dinâmica em 60 minutos). O solvente aquoso foi escolhido utilizando critérios de sustentabilidade e custo para obtenção dos ativos de interesse.

O extrato otimizado aqui produzido foi destinado para incorporação em formulações cosméticas. Deste modo, levando em consideração fatores farmacotécnicos, realizou-se a etapa de purificação, para eliminação de impurezas ou moléculas que dificultem a incorporação, sem que haja o comprometimento das substâncias ativas de interesse antioxidante (DA SILVA, 2016).

3.3.1. Extratos brutos

Os valores de rendimento obtidos nos experimentos seguindo planejamento fatorial, demonstraram que as extrações utilizando solução aquosa acidificada aumentaram o rendimento da extração (figura 5A). No gráfico de Pareto, (figura 5B) foi possível observar que ambos os fatores estudados (acidez do solvente e temperatura) possuem influência positiva significativa ($p < 0,05$), principalmente quando avaliados em sinergia.

As cascas dos frutos de *Punica granatum* possuem em sua composição fitoquímica taninos hidrolisáveis e condensados (MOGA et al., 2021). Taninos condensados são moléculas de alto peso molecular, as quais em meios aquosos se polimerizam dando origem aos polímeros de taninos. Soluções aquosas não são capazes de solubilizá-los inteiramente, o que por consequência infere no valor de rendimento das extrações tendo como solvente somente a água. As soluções acidificadas demonstraram maior rendimento (%). Esse resultado pode ser sustentado pelos dados apresentados por Doellinger et al. (2020), os quais indicam que soluções aquosas acidificadas, além de permitirem a formação dos polímeros, ainda são capazes de solubilizar com melhor eficiência essas moléculas.

A temperatura é o fator que pode favorecer a solubilização dos taninos hidrolisáveis (moléculas pequenas) contribuindo assim, para o aumento da extração destes metabólitos secundários. De acordo com Macedo (2015), o aumento do rendimento massa (%) é possível quando há aplicação de temperaturas altas, devido aos taninos hidrolisáveis serem moléculas hidrofílicas que sofrem hidrólise em temperaturas $\geq 60^{\circ}\text{C}$.

Os dados referentes ao teor de fenólicos totais nos extratos das cascas de romã (extratos brutos) demonstraram que a acidificação do solvente extrator não influenciou no teor de compostos fenólicos presentes na amostra (figura 5C). A análise estatística a partir do gráfico de Pareto demonstrou (figura 5D) que nenhum dos fatores estudados interferiu significativamente ($p > 0,05$) na concentração de fenólicos dos extratos.

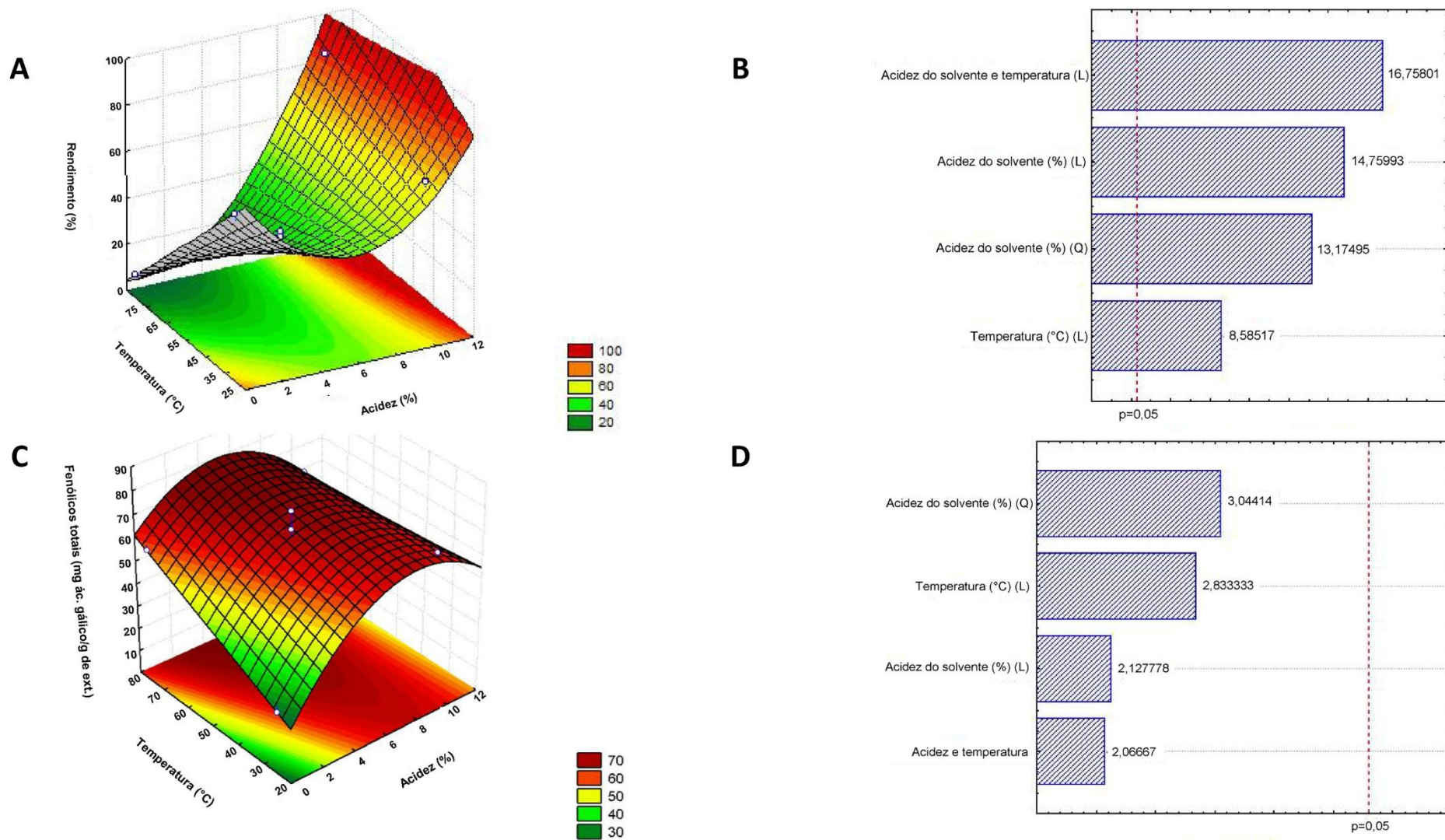


Figura 5 – Influência dos fatores de otimização (acidificação do solvente e temperatura de extração) sobre rendimento em massa (%) (A e B) e teor de fenólicos totais nos extratos brutos (C e D) na obtenção do extrato brutos. Gráficos de superfície de resposta (A e C); Gráfico de Pareto (B e D).

3.3.2. Extratos purificados

Os valores de rendimento da etapa de purificação dos extratos secos das cascas de romã, obtidos no planejamento fatorial, demonstraram-se reduzidos em cerca de 24 vezes na fração aquosa, quando calculados em relação a biomassa inicial ou a massa do extrato seco, e comparados aos extratos brutos.

Os resultados expressos no gráfico de superfície de resposta ilustrado na figura 6A indicam que a purificação de extratos obtidos a partir de soluções aquosas em condição de acidificação abaixo de 6% e em temperatura de até 60°C apresentaram maior rendimento. No gráfico de Pareto (figura 6B) foi possível observar que ambas as variáveis apresentaram influência significativa ($p < 0,05$), com destaque para a acidificação do solvente.

O estudo de Dalmagro & Gasparetto (2020) descreve que as frações acetato de etila tendem a apresentar maior rendimento em relação as outras frações. Isto pode ser explicado pela solubilização e dissociação de taninos condensados em solventes orgânicos, já que estes são compostos de estruturas contendo flavonoides (hidrofóbicas) e proantocianidinas. Com isso, o baixo rendimento apresentado na fração aquosa ocorre devido a retirada dessas moléculas com alto peso molecular (ALBUQUERQUE et al., 2017).

O fato da performance de rendimento massa (%) apresentarem-se maior em extrações com a temperatura de até 60°C, pode ser explicado por Wang et al. (2019), que descreveram que os taninos hidrolisáveis dissociados em soluções aquosas, após fracionamento (frações: acetato de etila e aquosa) tendem a ser mais estáveis em temperaturas menores que 70°C.

Em relação ao teor de fenólicos nos extratos das cascas de romã purificados, foi possível observar na análise do gráfico de superfície de resposta que solvente aquoso com acidificação entre 0 e 6% em todas as temperaturas (figura 6C) apresentaram maior concentração destas substâncias. À medida que a acidez aumenta, a temperatura também exerce influência. No gráfico de Pareto foi evidenciado os dois fatores (acidez do solvente e temperatura de extração), de maneira isolada ou em conjunto, influenciaram o teor de fenólicos (figura 6D). Os extratos purificados a partir de amostras obtidas com solução aquosa e solução aquosa acidificada com 5% de ácido acético apresentaram alto teor de fenólicos.

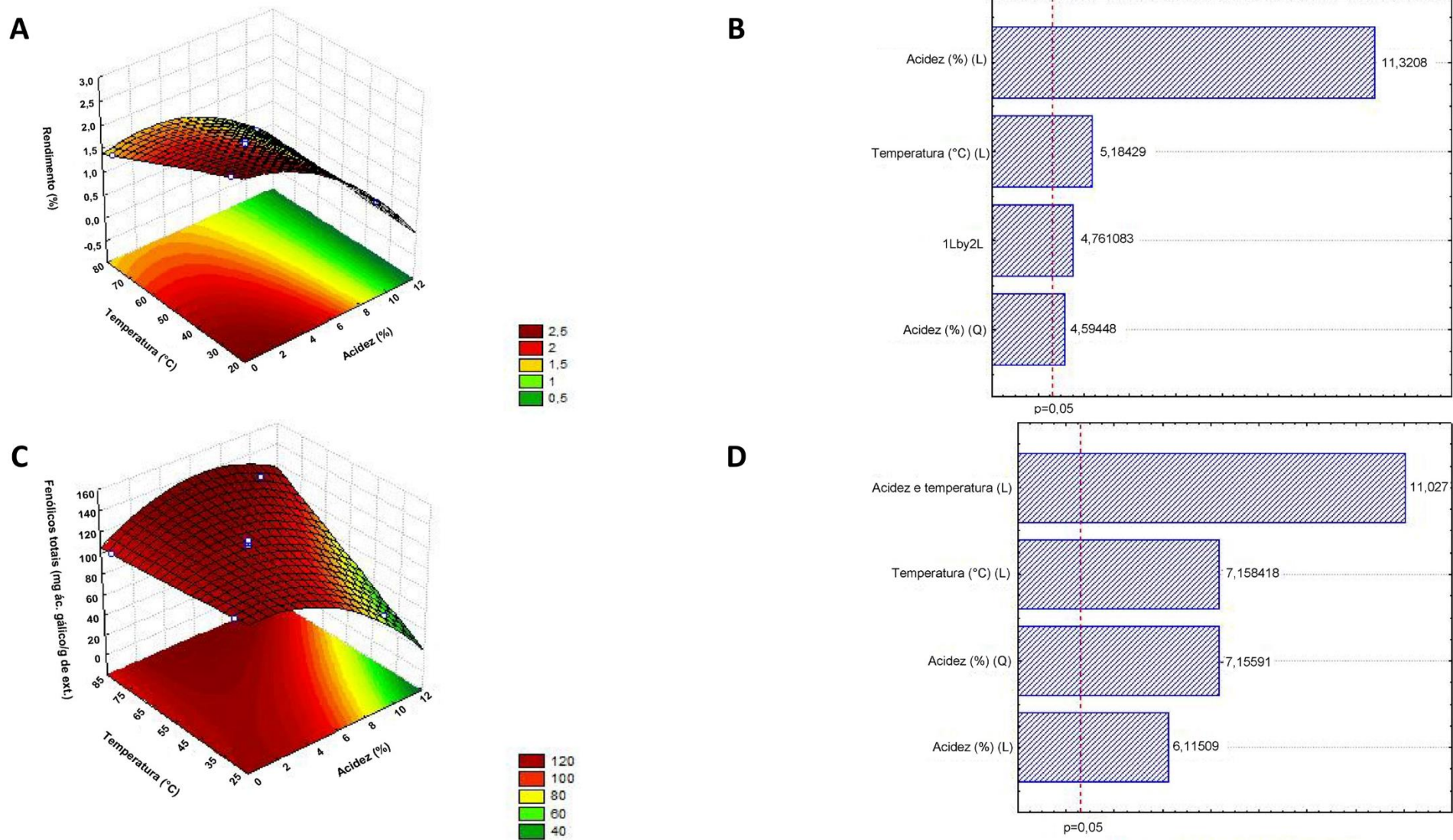


Figura 6 – Influência dos fatores de otimização (acidificação do solvente e temperatura de extração) sobre rendimento em massa (%) (A e B) e teor de fenólicos totais nos extratos brutos (C e D) dos extratos purificados. Gráficos de superfície de resposta (A e C); Gráfico de Pareto (B e D).

Diante dos resultados encontrados, o extrato bruto obtido utilizando água destilada como solvente apresentou melhor performance em termos de rendimento massa (%) e uma baixa performance para extração de fenólicos totais quando comparado com soluções acidificadas. No entanto, quando purificado, esta condição extrativa apresentou maior rendimento, apresentando ainda uma performance superior (120 mg equivalentes de AG/g do extrato) em termos de fenólicos totais, quando comparados aos outros extratos purificados. Além disso, o quantitativo de fenólico total aumentou em 6x quando comparado com o mesmo extrato na forma bruta. Em ambas as formas de extrato (bruto e purificado), o extrato obtido em menor acidez e temperatura, demonstrou maior rendimento.

3.4. Caracterização dos extratos das cascas de romã por CLAE

A quantificação de fenólicos totais nos extratos brutos e purificados, obtidos nas condições estabelecidas no planejamento fatorial, indicou que os extratos purificados apresentaram mais que 50 mg equivalentes a ácido gálico/g de extrato. Assim, todos os extratos purificados foram submetidos à CLAE. Já em relação aos extratos brutos foi verificado os fatores estudados (acidez do solvente e temperatura de extração) não possuíam influência para a performance na extração de fenólicos totais. Desta forma, foi selecionado apenas o extrato da condição 1 (menor acidez e menor temperatura) para ser avaliado pelo método cromatográfico.

Sendo assim, os extratos purificados foram comparados entre si em relação a concentração de ácido gálico (figura 7A e 7B). Os dados de superfície resposta em relação a quantificação de ácido gálico demonstraram que as melhores condições de extração são as de menor acidez do solvente e menor temperatura (figura 7A), confirmando com os dados preliminares obtidos na quantificação de fenólicos totais. Portanto, os fatores temperatura de extração e acidez do solvente extrator influenciaram significativamente na extração de ácido gálico (figura 7B).

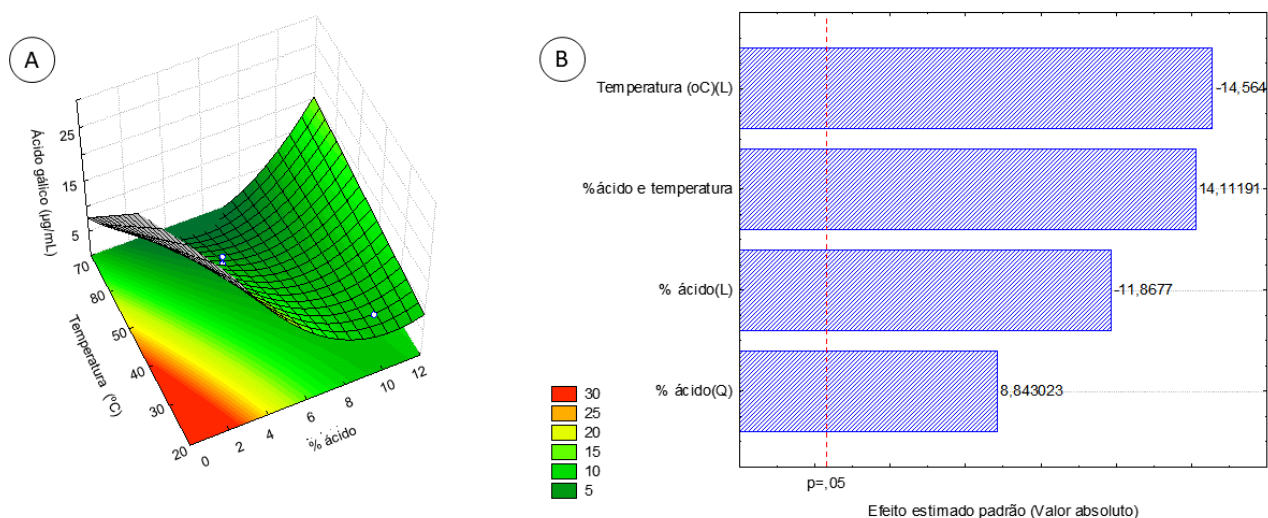


Figura 7 – Influência dos fatores de otimização (acidificação do solvente e temperatura de extração) sobre a concentração de ácido gálico (µg/mL) (A): Gráficos de superfície de resposta, (B); Gráfico de Pareto

Os perfis cromatográficos dos extratos purificados das cascas de romã estão apresentados na figura 8. Os picos foram identificados como ácidos gálico (tempo de retenção em 1,9 min) e elágico (3,3 min), por comparação com os respectivos padrões.

O pico do ácido elágico (3,011 mg/L) só foi identificado no cromatograma do extrato purificado 1, indicando que as condições de menor acidez e temperatura são as ideais para extração deste metabólito secundário. Por essa razão e em conjunto com os dados referentes a quantificação do ácido gálico entende-se que o extrato purificado como melhor performance extrativa de ácido gálico e elágico, foi o extrato obtido em condições de menor acidez e temperatura (extrato purificado 1).

Estes resultados corroboram o estudo de Doellinger et al. (2020), o qual descreve que os ácidos de interesse são degradados em altas temperaturas e que em meios com alto teor de íons H⁺ livres, impedem as ligações entre as moléculas do ácido gálico e/ou ácido elágico, para que haja o arraste deste para o solvente.

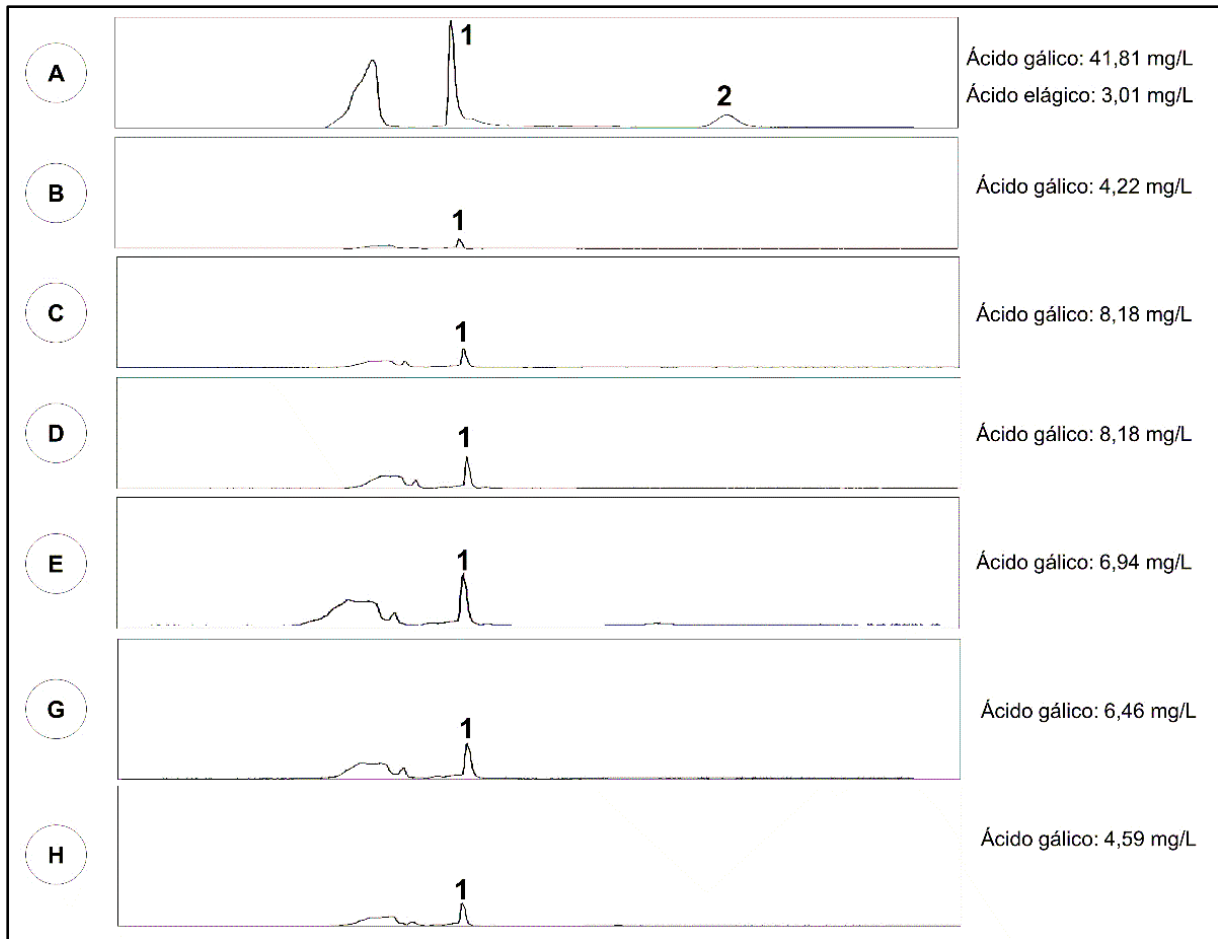


Figura 8 – Cromatogramas. (1) pico do ácido gálico. (2) pico do ácido elágico. (A) e (B) Cromatograma do extrato aquoso, obtidos em diferentes temperaturas 25°C e 75°C respectivamente. (C) e (D) Cromatogramas dos extratos obtidos com solvente aquoso acidificado com 10% de ácido acético, em diferentes temperaturas 25°C e 75°C respectivamente. (E), (F) e (G) Cromatogramas dos extratos obtidos com solvente aquoso acidificado com 5% de ácido acético, em 50°C (repetição no ponto central). Método de extração: maceração dinâmica, tempo de extração: 60 minutos e concentração de biomassa 2 mg/mL. Os picos foram obtidos no comprimento de onda de 254 nm.

O cromatograma do extrato bruto obtido na condição 1 (figura 9) apresentou 2 picos correspondentes aos ácidos gálico e elágico.

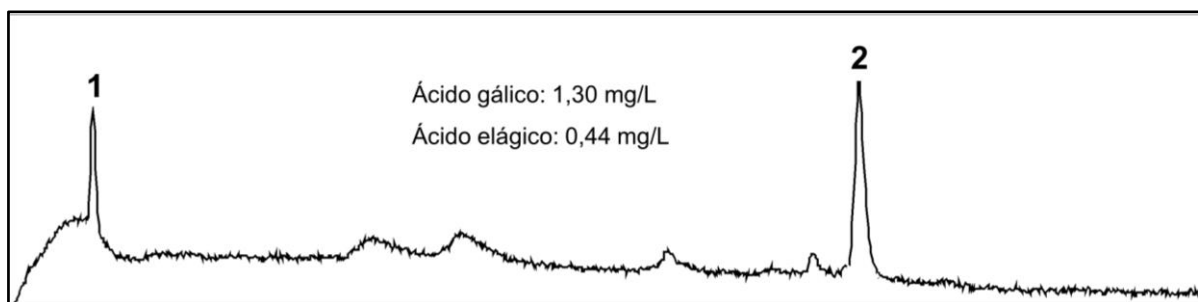


Figura 9 – Cromatograma do extrato aquoso bruto das cascas dos frutos de *Punica granatum*. (1) pico do ácido gálico. (2) pico do ácido elágico. Extratos obtidos com água destilada, em temperatura ambiente, por maceração dinâmica no tempo de 60 minutos, e concentração de biomassa de 2 mg/mL. Os picos foram obtidos no comprimento de onda de 254 nm.

A comparação deste resultado com aqueles obtidos com o extrato purificado 1 demonstrou que houve diferença significativa entre os extratos bruto e purificado tanto na concentração de ácido gálico quanto na do ácido elágico (figura 10A).



Figura 10 – Influência da purificação na concentração de ácidos gálico e elágico. (A) Concentração de ácido gálico (mg/L). (B) Concentração de ácido elágico (mg/L). Diferença significativa ($p=0,0001$).

O processo de purificação do extrato aquoso das cascas dos frutos de *Punica granatum* com acetato de etila permitiu a retirada de moléculas de alta massa molar, como taninos condensáveis (proantocianidinas), conseguindo assim concentrar os taninos hidrolisáveis majoritários (ácido gálico e elágico). Assim, como o acetato de etila e outros solventes orgânicos são capazes de dissociar e causar lise nas moléculas de proantocianidinas. Por esta razão, tem-se a diminuição deste composto nestes solventes (KUPNIK et al., 2022), em relação aos extratos aquosos. O meio aquoso é capaz de extrair tais moléculas e permite que se condensem, ligando-se a outras moléculas presentes no extrato (taninos hidrolisáveis, por exemplo). Assim, tem-se a diminuição da concentração de taninos hidrolisáveis (ácido gálico e elágico) em extratos aquosos não purificados (BIAO et al., 2018).

A quantidade de ácido gálico apresentou-se superior à de ácido elágico em ambos os extratos (bruto e purificado). No estudo de Mostafa et al. (2021), os autores descrevem que é comum extratos aquosos de espécies vegetais que possuem ácidos gálico e elágico em sua composição fitoquímica, o ácido gálico se apresentar em maior concentração que o elágico.

Para escolha do extrato mais adequado em termos de viabilidade econômica (menor custo, alto rendimento) e ambiental (processo utilizando solvente sustentável e não produção de resíduo) foram comparados os extratos bruto e purificado obtidos na condição 1 do planejamento fatorial (temperatura ambiente e água como solvente

extrator). Na figura 11 A e B foram comparados os resultados obtidos do rendimento total de ativos (ácido gálico e elágico, respectivamente).

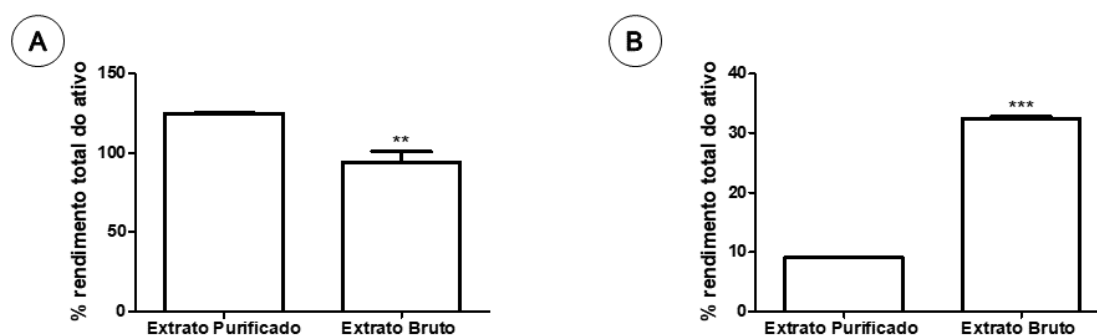


Figura 11 – Rendimento total do ativo no extrato bruto e purificado. (A) % total do ativo em ácido gálico, ($p=0,0014$). (B) % total do ativo em ácido elágico, ($p<0,0001$). Teste-t.

O extrato bruto apresentou menor rendimento de ácido gálico que o extrato purificado. Entretanto teve um maior rendimento de ácido elágico. Este resultado torna o extrato bruto mais adequado economicamente e ambientalmente. O processo de obtenção do extrato bruto evita o uso de solvente orgânico (acetato de etila) e ocorre com uma etapa a menos, sendo mais fácil e rápido sua produção.

Em relação à atividade antioxidante, as curvas do sequestro de DPPH em função da concentração dos extratos brutos e purificados estão apresentados na figura 12.

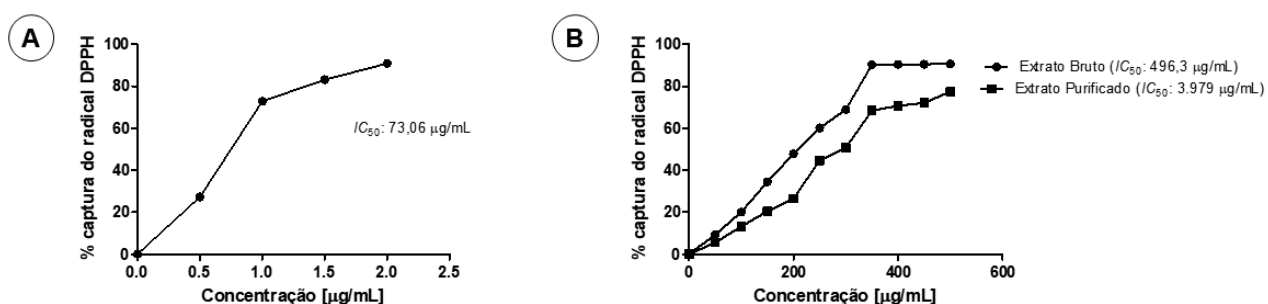


Figura 12 – Captura de radical DPPH (%) em relação a concentração da amostra. (A) Curva da molécula padrão (ácido gálico), EC_{50} : 73,06 µg/mL. (B) Comparação da atividade antioxidante dos extratos bruto (EC_{50} : 496,3 µg/mL) e purificados (EC_{50} : 3.979 µg/mL).

A molécula de ácido gálico (Figura 12A) possui alta capacidade antioxidante, apresentando EC_{50} (captura da metade dos radicais DPPH presentes no meio) de 73,06 µg/mL. O extrato bruto apresentou uma EC_{50} de 496,3 µg/mL, enquanto o extrato purificado 3.979 µg/mL.

Os resultados apontam que o extrato bruto possui maior atividade antioxidante, apesar de apresentar menor quantitativo de ácidos gálico e elágico. As substâncias antioxidantes podem ser classificadas em primárias, sinérgicas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos. Os extratos vegetais brutos podem apresentar muitas substâncias com variada ação antioxidante, as quais por sua vez, atuam em sinergia, resultando em uma maior atividade antioxidante quando comparado aos extratos purificados. Este efeito sinérgico pode ser perdido no processo de purificação, pela eliminação de moléculas não identificadas, com alto potencial antioxidante (BELOTI, 2019).

Além disso, ao se levar em consideração os custos financeiros e ambientais para realização do processo de isolamento de ativos, é mais viável a utilização de extratos com uma atividade antioxidante maior.

As substâncias encontradas no extrato das cascas dos frutos de *Punica granatum*, são reconhecidas por seu potencial antioxidante e quelante (DERAKHSHAN et al., 2018), e fotoprotetor (AFAQ & KATIYAR, 2011), sendo elas ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogênico, punicalagina A e B, e punicalina (KARRAY et al., 2020). Estas substâncias, se presentes em um extrato mesmo que em baixas concentrações atuam em conjunto através de mecanismos diferentes, resultando em uma ótima ação antioxidante quando comparadas com outros extratos vegetais (MARTÍNEZ et al., 2019; HAFANY et al., 2021; EL-BELTAGI et al., 2022).

Além dos taninos hidrolisáveis citados acima, que possuem atividade antioxidante, outra classe de substância presente são as proantocianidinas. Estas moléculas têm atividade antioxidante modulada que age por meio de mecanismos regulatórios de danos ao DNA e na redução do estresse oxidativo por meio da captura de radicais livres (RAUF et al., 2019). Estas moléculas não são encontradas no extrato purificado, o que pode explicar a redução da atividade antioxidante do extrato purificado em relação ao extrato bruto.

Em resumo o extrato bruto torna-se mais viável não só por conta da sua atividade antioxidante, mas também pelo seu custo-benefício de produção.

3.5. Desenvolvimento da formulação:

O resultado dos ensaios de solubilidade dos extratos das cascas dos frutos de *Punica granatum* purificado e bruto estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 - Solubilidade do extrato bruto em diferentes solventes.

Solvente	Extrato purificado	Extrato bruto
Água destilada	Solúvel	Muito solúvel
Propileno glicol	Insolúvel	Muito solúvel
Etanol 70%	Solúvel	Muito solúvel

Os dados demonstraram que dos solventes testados, somente a água destilada e o etanol 70% foram capazes de solubilizar o extrato purificado. Em contrapartida, todos os solventes (água destilada, propilenoglicol e etanol) foram capazes de solubilizar facilmente o extrato bruto.

A avaliação macroscópica das bases após incorporação do extrato solubilizado em água destilada e etanol 70% foi realizada por meio de escores, apresentados no quadro 3.

Quadro 3 – Avaliação macroscópica das formulações após incorporação dos extratos purificado e bruto em diferentes bases cosméticas.

Bases cosméticas	Extrato purificado		Extrato bruto	
	Etanol 70%	Água destilada	Etanol 70%	Água destilada
Hydra Fresh®	1	1	1	1
Ômega Gold®	0	0	2	2
Bio Sérum®	0	0	0	0

Legenda: (0) baixo escore (houve desestruturação da formulação – caaking ou coalescência). (1) médio escore (houve incorporação, porém macroscopicamente apresentou sutis imperfeições ou precipitação). (2) alta escore (houve incorporação sem presença de imperfeições).

Pode-se observar as imagens das formulações após incorporação extrato purificado e bruto na figura 13.

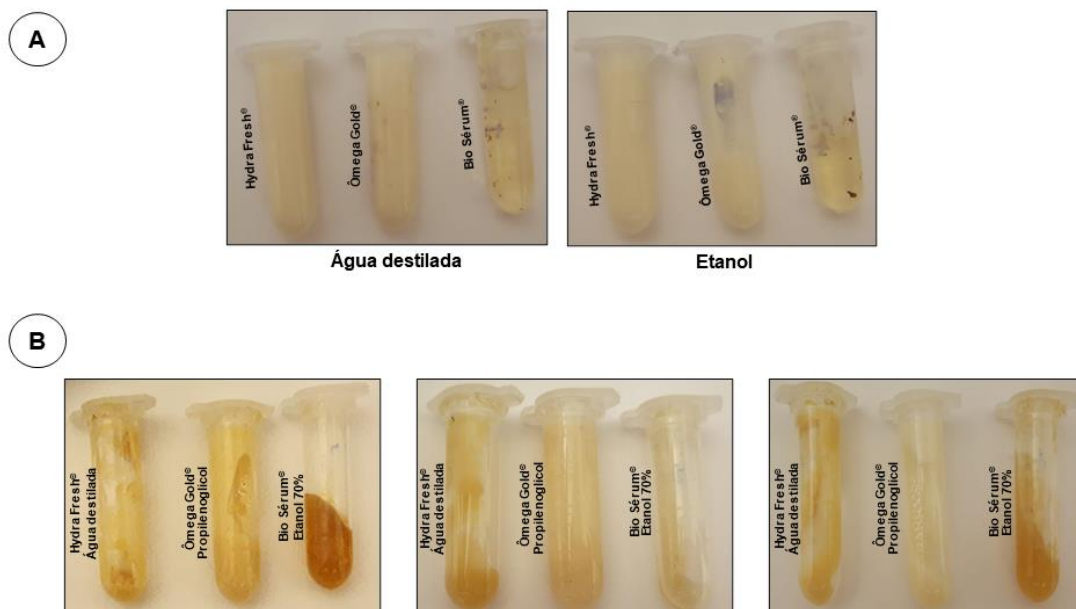


Figura 13 – Imagens das formulações contendo o extrato purificado (A) e bruto (B) utilizando água destilada e etanol como agente solubilizante.

Em relação a incorporação o extrato que melhor se incorporou nas bases cosméticas testadas foi o extrato bruto, tendo escores 2 (ótima incorporação) na base Ômega Gold®.

O solvente que melhor solubilizou tanto o extrato purificado quanto o extrato bruto e que apresentou compatibilidade com a base cosmética foi o etanol 70%. O extrato purificado apresentou incorporação escore 1 (sem presença de caaking, porém apresentou precipitação) na base Hydra Fresh®, no entanto foi necessário aumentar a proporção da base cosmética para que houvesse a incorporação. Já para o extrato bruto, observou-se incorporação escore 2 (permaneceu estável após incorporação) na base cosmética Ômega Gold®, e incorporação escore 1 na base Hydra Fresh® e Bio Sérum®. Portanto foi selecionado o etanol 70% como agente solubilizante e a Ômega Gold® como base cosmética.

O extrato bruto apresentou melhor solubilização e incorporação quando comparado com o extrato purificado. Sendo assim, o extrato bruto foi selecionado para compor a formulação anti-idade proposta no presente trabalho.

3.6. Formulação Cosmética:

A formulação cosmética obtida foi composta do extrato bruto, que apresentou melhor rendimento total do ativo, alta atividade antioxidante e ótima incorporação nas

formulações. Sendo assim, os ingredientes da formulação foram: base cosmética (Ômega Gold), extrato bruto das cascas dos frutos de *Punica granatum* tendo o etanol 70% em quantidade suficiente (q.s.) como solvente.

As características macroscópicas da formulação estão representadas pela imagem na figura 14. Obteve-se uma formulação cosmética de coloração amarela, com aspecto cremoso, sem presença de grumos, possuindo odor característico da base Ômega Gold e sensorial agradável.



Figura 14 – Formulação cosmética anti-idade. Composição: Ômega Gold® (base cosmética), extrato bruto das cascas dos frutos de *Punica granatum* (ativo) e etanol 70% (solvente – q.s.).

3.7. Avaliação da formulação cosmética:

3.7.1. Avaliação do pH:

Uma formulação controle (base sem a presença de extrato) apresentou pH médio de 6,27. Já a formulação contendo o extrato apresentou pH médio de 5,39. A incorporação de moléculas ácidas presentes no extrato foi capaz de diminuir o pH da formulação. O pH da formulação encontra-se dentro da faixa ideal de pH em cosméticos. Formulações com pH maiores, tendendo a alcalinidade, favorecem a permeação cutânea até camadas mais profundas da pele (REBELLO et al., 2019). Além disso, de acordo com o parecer técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 7 de 28 de setembro de 2001, é permitido pela legislação que cosméticos contendo substâncias ácidas possam variar o pH entre ≤ 3.0 ou ≥ 5.0 .

3.7.2. Estabilidade física:

O teste de centrífuga é preconizado no Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2008), e é utilizado para avaliar a estabilidade em condições de estresse físico, avaliando a mobilidade dos componentes e partículas presentes no sistema da formulação.

A formulação controle (base cosmética Ômega Gold®) e formulação contendo o extrato apresentaram escore 2 (sem separação de fases). A base cosmética foi utilizada como controle para verificar se o extrato incorporado, em situação de estresse no sistema emulsionado, seria capaz de influenciar na separação (figura 15).

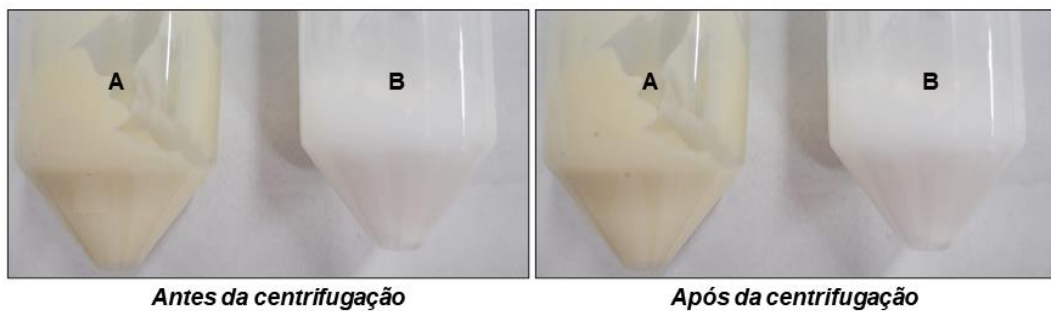


Figura 15 – Aparência macroscópicas das formulações após ensaio de estresse físico (centrífuga) (A) Formulação cosmética contendo extrato das cascas dos frutos de *Punica granatum*. (B) Base Cosmética (controle).

Diante dos resultados, pode-se afirmar que a formulação obtida se mantém estável em condições de estresse físico, indicando que a mesma pode ser transportada sem que haja alterações por instabilidade.

3.7.3. Teste de estresse térmico:

O teste de estresse térmico demonstrou que em 40°C e 50°C tanto a base cosmética (controle) quanto a formulação não apresentaram instabilidades em seu sistema. No entanto, em 60°C e 70°C, o sistema apresentou instabilidades no sistema, onde tanto a base cosmética, quanto a formulação obtida, com diminuição da consistência e alteração de coloração, sugerindo possível oxidação (figura 16).

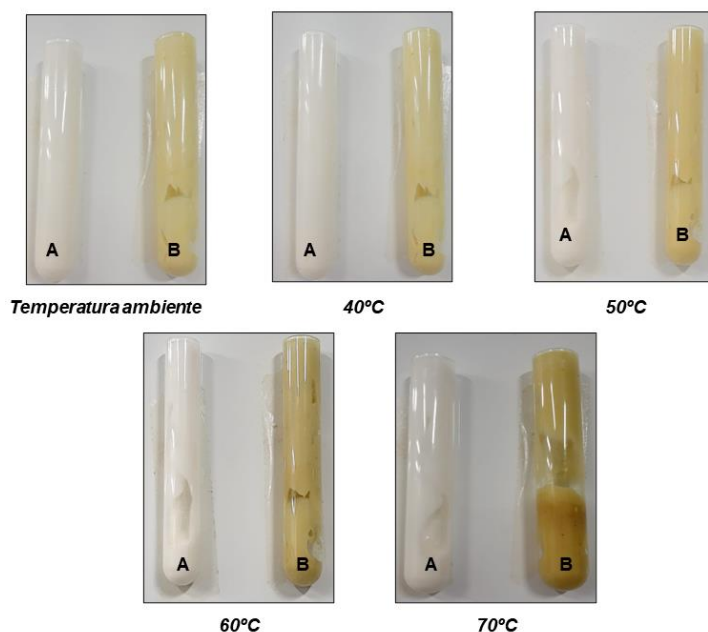


Figura 16 – Aparência das formulações após teste do estresse térmico. Imagens das amostras após serem submetidas às temperaturas de 60°C e 70°C por 30 minutos. (A) base cosmética (controle). (B) Formulação cosmética contendo extrato das cascas dos frutos de *Punica granatum*.

Os resultados indicam que as formulações são estáveis se armazenadas em temperatura de até 50°C, não sendo necessárias condições especiais de armazenagem, estando de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº 48, 25 de outubro de 2013.

4. Conclusão:

Conclui-se que o processo de extração de substâncias antioxidantes facilmente incorporadas em bases cosméticas comerciais, a partir das cascas dos frutos de *Punica granatum* deve utilizar partículas de biomassa menor que 250 µm, sendo executado por maceração dinâmica em 60 min a temperatura ambiente utilizando água destilada como solvente extrator. Estas condições permitiram a obtenção de um extrato de forma sustentável, com alto rendimento em massa, riqueza fenólica, atividade antioxidante e sem necessidade de etapa de purificação.

5. Referências Bibliográficas:

AFAQ, F.; KATIYAR, S. K. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 14, p. 1200-1215, 2011.

ALBUQUERQUE, E. R.; GOSSLER, S. C.; PIOVEZAN, M.; DE CONTO, L. C.; Extração e Determinação de Flavonóides, Taninos Condensados e Totais da casca do pinhão (*Araucaria angustifolia*). **Instituto Federal de Santa Catarina**, 2017.

ALI, H.; JAHAN, A.; SAMRANA, S.; ALI, A.; ALI, S.; KABIR, N.; ALI, A.; ULLAH, R.; MOTHANA, R. A.; MURTAZA, B. N.; KALIM, M. Hepatoprotective potential of pomegranate in curbing the incidence of acute liver injury by alleviating oxidative stress and inflammatory response. **Frontiers in Pharmacology**, p. 2838, 2021.

AMMAR, A.; TRABELSI, K.; BRAGAZZI, N. L.; BOUKHRIS, O.; BOUAZIZ, M.; AYADI, F.; EL ABED, K.; DRISS, T.; SOUISSI, N.; CHTOUROU, H.; BAILEY, S. J.; HOEKELMANN, A. Effects of natural polyphenol-rich pomegranate juice on the acute and delayed response of Homocysteine and steroidal hormones following weightlifting exercises: a double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2020.

AN, X.; ZHANG, Y.; CAO, Y.; CHEN, J.; QIN, H.; YANG, L. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1516, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, Volume 1: 6ª Edição. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>>. Acesso em: 15 de novembro de 2022.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2008.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Estabilidade em Produtos Cosméticos. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Parecer Técnico nº 7, de 28 de setembro de 2001. 2001. Disponível: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/pareceres/parecer-tecnico-no-7-de-28-de-setembro-de-2001-atualizado-em-16-2-2006>>. Acesso em: 13 de novembro de 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) – Nº 48, de 25 de outubro de 2013. 2013. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0048_25_10_2013.html>. Acesso em: 13 de novembro de 2022.

BACCARIN, T.; LEMOS-SENNA, E. Potential application of nanoemulsions for skin delivery of pomegranate peel polyphenols. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3307-3314, 2017.

BARATI BOLDAJI, R.; AKHLAGHI, M.; SAGHEB, M. M.; ESMAEILINEZHAD, Z. Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: A randomized crossover trial. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 2, p. 846-854, 2019.

BATISTA, C. M.; DE QUEIROZ, L. A.; ALVES, Â. V.; REIS, E. C.; SANTOS, F. A.; CASTRO, T. N.; LIMA, B. S.; ARAÚJO, A. A. S.; GODOY, C. A. P.; SEVERINO, P.; CANO, A.; SANTINI, A.; CAPASSO, R.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C.; SOUTO, E. B. Photoprotection and skin irritation effect of hydrogels containing hydroalcoholic extract of red propolis: A natural pathway against skin cancer. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08893, 2022.

BAUMANN, L. How to use oral and topical cosmeceuticals to prevent and treat skin aging. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 26, n. 4, p. 407-413, 2018.

BELOTI, G. M. **Caracterização in vitro de compostos bioativos de partes aéreas da cana-de-açúcar e sua capacidade antioxidante**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BEN AHMED, Z.; YOUSFI, M.; VIAENE, J.; DEJAEGHER, B.; DEMEYER, K.; MANGELINGS, D.; VANDER HEYDEN, Y. Seasonal, gender and regional variations

in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1185-1194, 2017.

BIAO, L.; TAN, S.; MENG, Q.; GAO, J.; ZHANG, X.; LIU, Z.; FU, Y. Green synthesis, characterization and application of proanthocyanidins-functionalized gold nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 53, 2018.

BRIGHENTI, V.; GROOTHUIS, S. F.; PRENCIPE, F. P.; AMIR, R.; BENVENUTI, S.; PELLATI, F. Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography a**, v. 1480, p. 20-31, 2017.

BUJAK, T.; ZAGÓRSKA-DZIÓK, M.; ZIEMLEWSKA, A.; NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z.; WASILEWSKI, T.; HORDYJEWICZ-BARAN, Z. Antioxidant and cytoprotective properties of plant extract from dry flowers as functional dyes for cosmetic products. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2809, 2021.

CAMPOS, L.; SEIXAS, L.; HENRIQUES, M. H.; PERES, A. M.; VELOSO, A. C. Pomegranate peels and seeds as a source of phenolic compounds: Effect of cultivar, by-product, and extraction solvent. **International journal of food science**, v. 2022, 2022.

CARDULLO, N.; MUCCILLI, V.; CUNSOLO, V.; TRINGALI, C. Mass spectrometry and 1H-NMR study of *Schinopsis lorentzii* (Quebracho) tannins as a source of hypoglycemic and antioxidant principles. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3257, 2020.

CHAN, L. P.; TSENG, Y. P.; LIU, C.; LIANG, C. H. Fermented pomegranate extracts protect against oxidative stress and aging of skin. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 21, n. 5, p. 2236-2245, 2022.

CHO, Y. E.; SONG, B. J. Pomegranate prevents binge alcohol-induced gut leakiness and hepatic inflammation by suppressing oxidative and nitrative stress. **Redox biology**, v. 18, p. 266-278, 2018.

DALMAGRO, A. P.; GASPARETTO, A. *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl: constituição fitoquímica preliminar e efeito antibacteriano. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 532-544, 2020.

DE LIMA CHERUBIM, D. J.; BUZANELLO MARTINS, C. V.; OLIVEIRA FARIÑA, L.; DA SILVA DE LUCCA, R. A. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 19, n. 1, p. 33-37, 2020.

DERAKHSHAN, Z.; FERRANTE, M.; TADI, M.; ANSARI, F.; HEYDARI, A.; HOSSEINI, M. S.; CONTI, G. O.; SADARABAD, E. K. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food and chemical toxicology**, v. 114, p. 108-111, 2018.

DOELLINGER, J.; SCHNEIDER, A.; HOELLER, M.; LASCH, P. Sample preparation by easy extraction and digestion (SPEED)-a universal, rapid, and detergent-free protocol for proteomics based on acid extraction. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 19, n. 1, p. 209-222, 2020.

EL BARNOSSI, A.; MOUSSAID, F.; HOUSSEINI, A. I. Antifungal activity of *Bacillus* sp. gn-A11-18 isolated from decomposing solid green household waste in water and soil against *Candida albicans* and *Aspergillus Niger*. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, p. 02003, 2020.

EL-BELTAGI, H. S.; ESHAK, N. S.; MOHAMED, H. I.; BENDARY, E. S.; DANIAL, A. W. Physical Characteristics, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* or *Citrus sinensis* Peel Extracts and Their Applications to Improve Cake Quality. **Plants**, v. 11, n. 13, p. 1740, 2022.

ESPOSTO, S.; VENEZIANI, G.; TATICCHI, A.; URBANI, S.; SELVAGGINI, R.; SORDINI, B.; DAIDONE, L.; GIRONI, G.; SERVILI, M. Chemical composition, antioxidant activity, and sensory characterization of commercial pomegranate juices. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1381, 2021.

FADDLADDEEN, K. A.; OJAIMI, A. A. Protective effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract against diabetic changes in adult male rat liver: histological study. **Journal of microscopy and ultrastructure**, v. 7, n. 4, p. 165, 2019.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821, 2011.

GATES, E. J.; BERNATH, A. K.; KLEGERIS, A. Modifying the diet and gut microbiota to prevent and manage neurodegenerative diseases. **Reviews in the Neurosciences**, 2022.

GU, Y.; HAN, J.; JIANG, C.; ZHANG, Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing research reviews**, v. 59, p. 101036, 2020.

HABASHI, R.; HACHAM, Y.; DHAKAREY, R.; MATITYAHU, I.; HOLLAND, D.; TIAN, L.; AMIR, R. Elucidating the role of shikimate dehydrogenase in controlling the production of anthocyanins and hydrolysable tannins in the outer peels of pomegranate. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2019.

HANAFY, S. M.; ABD EL-SHAFFA, Y. M.; SALEH, W. D.; FATHY, H. M. Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2021.

HANAFY, S. M.; ABD EL-SHAFFA, Y. M.; SALEH, W. D.; FATHY, H. M. Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2021.

HBKA, A.; DAOUDI, N. E.; BOUYANZER, A.; BOUHRIM, M.; MOHTI, H.; LOUKILI, E. H.; MECHCHATE, H.; AL-SALAH, R.; NASR, F. A.; BNOUHAM, M.; ZAID, A. *Artemisia absinthium* L. Aqueous and Ethyl Acetate Extracts: Antioxidant Effect and Potential Activity In Vitro and In Vivo against Pancreatic α -Amylase and Intestinal α -Glucosidase. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 481, 2022.

JAYAN, L.; PRIYADHARSINI, N.; RAMYA, R.; RAJKUMAR, K. Evaluation of antifungal activity of mint, pomegranate and coriander on fluconazole-resistant *Candida glabrata*. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 24, n. 3, p. 517, 2020.

KANG, S. J.; CHOI, B. R.; KIM, S. H.; YI, H. Y.; PARK, H. R.; SONG, C. H.; KU, S. K.; LEE, Y. J. Beneficial effects of dried pomegranate juice concentrated powder on ultraviolet B-induced skin photoaging in hairless mice. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 2, p. 1023-1036, 2017.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; CHONGNATIVISIT, W.; CHAIKUL, P.; LOURITH, N. Phenolic-rich Pomegranate Peel Extract: In Vitro, Cellular, and In Vivo Activities for Skin Hyperpigmentation Treatment. *Planta Medica*, v. 86, n° 11, p. 749-759; 2020.

KARIM, S.; ALKREATHY, H. M.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Effects of Methanolic Extract Based-Gel from Saudi Pomegranate Peels With Enhanced Healing Potential on Excision Wounds in Diabetic Rats. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, n° 704503; 2021.

KARRAY, A.; KRAYEM, N.; SAAD, H. B.; SAYARI, A. *Spirulina platensis*, *Punica granatum* peel, and moringa leaves extracts in cosmetic formulations: an integrated

approach of in vitro biological activities and acceptability studies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 7, p. 8802-8811, 2021.

KIM, D. H.; SIM, Y.; HWANG, J. H.; KWUN, I. S.; LIM, J. H.; KIM, J.; KIM, J. I.; BAEK, M. C.; AKBAR, M.; SEO, W.; KIM, D. K.; SONG, B. J.; CHO, Y. E. Ellagic acid prevents binge alcohol-induced leaky gut and liver injury through inhibiting gut dysbiosis and oxidative stress. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1386, 2021.

KRUTMANN, J.; BOULOC, A.; SORE, G.; BERNARD, B. A.; PASSERON, T. The skin aging exposome. **Journal of dermatological science**, v. 85, n. 3, p. 152-161, 2017.

KUPNIK, K.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; POSTRUŽNIK, V.; KOTNIK, P.; KUČUK, N.; KNEZ, Ž.; MAREVCI, M. K. Supercritical Fluid and Conventional Extractions of High Value-Added Compounds from Pomegranate Peels Waste: Production, Quantification and Antimicrobial Activity of Bioactive Constituents. **Plants**, v. 11, n. 7, p. 928, 2022.

KWON, S.-H.; NA, J. I.; CHOI, J. Y.; PARK, K. C. Melasma: updates and perspectives. **Experimental dermatology**, v. 28, n° 6, p. 704-708, 2019.

LAMPAKIS, D.; SKENDERIDIS, P.; LEONTOPOULOS, S. Technologies and extraction methods of polyphenolic compounds derived from pomegranate (*Punica granatum*) peels. A mini review. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 236, 2021.

LEONTOPOULOS, S.; SKENDERIDIS, P.; PETROTOS, K.; MITSAGGA, C.; GIAVASIS, I. Preliminary Studies on Suppression of Important Plant Pathogens by Using Pomegranate and Avocado Residual Peel and Seed Extracts. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 283, 2022. MACEDO, Gabriela Braun de. **Estabilidade e tratamento de taninos condensados**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS.

MAGANGANA, T. P.; MAKUNGA, N. P.; FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel waste: A review. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4690, 2020.

MAHMOUDIEH, M.; KELEIDARI, B.; ESFAHANI, F. N.; ZOLFAGHARI, B.; MELALI, H.; JAZI, A. H. D.; MEHDINEZHAD, N.; MOKHTARI, M. The effect of *Punica granatum L.* flower extract on post-surgical peritoneal adhesions in a rat model. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 246, p. 113-116, 2020.

MARTÍNEZ, L.; CASTILLO, J.; ROS, G.; NIETO, G. Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary, pomegranate and olive extracts in fish patties. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 86, 2019.

MENESES, J. O.; DA SILVA, I. C. A.; DA CUNHA, A. F. S.; DOS SANTOS CUNHA, F.; DIAS, J. A. R.; ABE, H. A.; PAIXÃO, P. E. G.; SOUSA, N. C.; DO COUTO, M. V. S.; LIMA, B. S.; CARVALHO NETO, A. G.; ARAÚJO, A. A. S.; COSTA, L. P.; DOS SANTOS, F. J.; CARDOSO, J. C.; DINIZ, L. E. C. & FUJIMOTO, R. Y. Protective effect of *Terminalia catappa* leaf extracts against Saprolegniosis on angelfish eggs. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 2, p. 377-387, 2022.

MICHICOTL-MENESES, M. M.; THOMPSON-BONILLA, M. D. R.; REYES-LÓPEZ, C. A.; GARCÍA-PÉREZ, B. E.; LÓPEZ-TENORIO, I. I.; ORDAZ-PICHARDO, C.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Inflammation markers in adipose tissue and cardiovascular risk reduction by pomegranate juice in obesity induced by a hypercaloric diet in Wistar rats. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2577, 2021.

MOGA, M. A.; DIMIENESCU, O. G.; BĂLAN, A.; DIMA, L.; TOMA, S. I.; BÎGIU, N. F.; BLIDARU, A. Pharmacological and therapeutic properties of *Punica granatum* phytochemicals: Possible roles in breast cancer. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1054, 2021.

MORZELLE, Maressa Caldeira. **Resíduos de romã (*Punica granatum*) na prevenção da doença de Alzheimer**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MOSTAFA, Y. S.; ALAMRI, S. A.; ALRUMMAN, S. A.; HASHEM, M.; BAKA, Z. A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pomegranate and Orange Peel Extracts and Their Antifungal Activity against *Alternaria solani*, the Causal Agent of Early Blight Disease of Tomato. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2363, 2021.

MOURA, T. F. A. L.; RAFFIN, F. N.; SANTOS, A. L. R. Evaluation of a preservative system in a gel containing hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 532-536, 2011.

PERŠURIĆ, Ž.; SAFTIĆ MARTINOVIĆ, L., MALENICA, M., GOBIN, I., PEDISIĆ, S., DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; KRALJEVIĆ PAVELIĆ, S. Assessment of the biological activity and phenolic composition of ethanol extracts of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5916, 2020.

PETROTOS, K.; GIAVASIS, I.; GERASOPOULOS, K.; MITSAGGA, C.; PAPAIOANNOU, C.; GKOUTSIDIS, P. Optimization of the Vacuum Microwave Assisted Extraction of the Natural Polyphenols and Flavonoids from the Raw Solid Waste of the Pomegranate Juice Producing Industry at Industrial Scale. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1033, 2021.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 12, p. 1-6, 2017.

RAJANALA, S.; MAYMONE, M. BC; VASHI, N. A. Melasma pathogenesis: a review of the latest research, pathological findings, and investigational therapies. **Dermatology Online Journal**, v. 25, n. 10, 2019.

RAUF, A.; IMRAN, M.; ABU-IZNEID, T.; PATEL, S.; PAN, X.; NAZ, S.; SILVAH, A. S.; SAEEDI, F.; SULERIA, H. A. R. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108999, 2019.

REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. Editora Senac São Paulo, 2019.

SILVA, A. M. R.; FERREIRA, N. L.; OLIVEIRA, A. E.; BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and dynamic maceration over content of tagitinin C obtained from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray leaves using factorial design. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, p. 270, 2017.

SILVA, F. V. F.; SANTOS, M. C.; NEIVA, L. D. B.; OLIVEIRA, M. A. C.; DE SOUSA LEAL, B.; DOS SANTOS MOREIRA, F. A.; DOS SANTOS, P. N.; CAVALCANTE, G. L.; SOUSA, J. P. S.; NETO, M. P. L. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaífera officinalis* L. (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 30, p. e974-e974, 2019.

SILVA, G. F. **Pesquisa e desenvolvimento de cosméticos a partir de ativos vegetais da Amazônia**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Amazonas. Manaus, Amazonas.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona Vahl* por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 776-780, 2009.

SIMÕES, L. S.; TEXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H.; JUNQUEIRA, M. S. Estudo da extração dos componentes do abacaxi em função do teor alcoólico e do tamanho da partícula para a produção de licor de abacaxi. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.16, n.3, p.239-246, 2014.

SKENDERIDIS, P.; LEONTOPOULOS, S.; PETROTOS, K.; GIAVASIS, I. Optimization of vacuum Microwave-Assisted Extraction of pomegranate fruits peels by the evaluation of extracts' phenolic content and antioxidant activity. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1655, 2020.

SKENDERIDIS, P.; LEONTOPOULOS, S.; PETROTOS, K.; MITSAGGA, C.; GIAVASIS, I. The In Vitro and In Vivo Synergistic Antimicrobial Activity Assessment of Vacuum Microwave Assisted Aqueous Extracts from Pomegranate and Avocado Fruit Peels and Avocado Seeds Based on a Mixtures Design Model. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1757, 2021.

SUN, R.; ZHANG, J.; CHEN, L.; ZHANG, N.; WANG, X.; CHEN, W. *Punica granatum* Extract Inhibits Bladder Cancer Cell Viability, Invasion and Migration through Down-Regulation of HOXD10 Signalling Pathway. In: **Doklady Biochemistry and Biophysics**. Pleiades Publishing, p. 130-136, 2021.

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

TORREGROSA-GARCÍA, A.; ÁVILA-GANDÍA, V.; LUQUE-RUBIA, A. J.; ABELLÁN-RUIZ, M. S.; QUEROL-CALDERÓN, M.; LÓPEZ-ROMÁN, F. J. Pomegranate extract improves maximal performance of trained cyclists after an exhausting endurance trial: A randomised controlled trial. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 721, 2019.

TOUR, N. S.; TALELE, G. S. Gastric antiulcer and antiinflammatory activities of *Calotropis procera* stem bark. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 1118-1126, 2011.

TRABELSI, A.; EL KAIBI, M. A.; ABBASSI, A.; HORCHANI, A.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of *Punica granatum* (pomegranate) leaves. **Scientifica**, v. 2020, 2020.

TROIANI, Caetano Afonso Lanzoni. **Influência das variáveis de processo na secagem de cascas de manga em secador de cilindro rotativo (drum dryer) e avaliação do ingrediente funcional obtido**. 2020. Tese de Doutorado. ITAL.

VELOSO, D. J.; ABRÃO, F.; MARTINS, C. H.; BRONZATO, J. D.; GOMES, B. P.; HIGINO, J. S.; SAMPAIO, F. C. Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. **Archives of oral biology**, v. 110, p. 104585, 2020.

VILLIS, P. C. M.; DE MACEDO, A. T.; FURTADO, H. L.; FONTENELLE, P. H.; GONÇALVES, I. S.; MENDES, T. L.; MOTTA, B. L. A.; MARINHO, P. L. L.; PINHEIRO, A. J. M. C. R.; LIMA-NETO, L. G.; MONTEIRO, C. A.; DA SILVA, L. C. N.; FERREIRA, G. F.; HOLANDA, R. A.; SANTOS, J. R. A. A Study of the Disruptive Effect of the Acetate Fraction of *Punica granatum* Extract on *Cryptococcus* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 568258, 2021.

WANG, C. C.; Chen, H. F.; Wu, J. Y.; Chen, L. G. Stability of principal hydrolysable tannins from *Trapa taiwanensis* Hulls. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 365, 2019.

WANG, X.; HERAUD, S.; THEPOT, A.; DOS SANTOS, M.; LUO, Z. The whitening properties of the mixture composed of pomegranate, osmanthus and olive and the protective effects against ultraviolet deleterious effects. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 14, p. 561, 2021.

ZHANG, Y. Z.; AISKER, G.; DONG, H.; HALEMAHEBAI, G.; ZHANG, Y.; TIAN, L. Urolithin A suppresses glucolipototoxicity-induced ER stress and TXNIP/NLRP3/IL-1 β inflammation signal in pancreatic β cells by regulating AMPK and autophagy. **Phytomedicine**, v. 93, p. 153741, 2021.

Anexo 1

- Curva de calibração do ácido gálico – Determinação de Fenólicos Totais:

Para a determinação dos fenólicos totais dos extratos das cascas dos frutos de *P. granatum*, foi obtida uma curva de calibração utilizando o padrão analítico de ácido gálico, a qual com sua respectiva equação da reta e o coeficiente de determinação esta apresentada na figura abaixo.

