

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Extratos naturais para a regulação da tirosinase

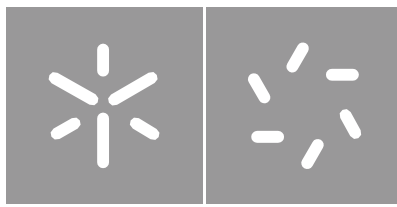
Cátia Soraia Monteiro Ferreira

Extratos naturais para a regulação da tirosinase

Cátia Soraia Monteiro Ferreira

UMinho | 2023

Outubro de 2023



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Cátia Soraia Monteiro Ferreira

Extratos naturais para a regulação da tirosinase

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação da

Doutora Carla Manuela Pereira Marinho da Silva

e da

Professora Doutora Susana Paula Graça da Costa

Outubro de 2023

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

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

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

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-

SemDerivações CC BY-NC-ND

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

Agradecimentos

Ao terminar mais uma das etapas da minha vida, queria exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, me ajudaram ao longo do meu percurso académico.

Agradecer aos meus avós e aos meus pais que ao longo destes 2 anos, assim como ao longo de toda a minha vida, foram o meu suporte, e todos os dias me encorajaram a ser mais e melhor. Obrigada pela motivação diária e por toda a força que me transmitem.

Ao João, pelo companheirismo e apoio incansável, o meu sincero obrigada por ter estado sempre presente, por ser casa, e por todos os dias me fazer acreditar que os limites foram feitos para serem quebrados.

Aos meus amigos, que são e serão sempre um apoio essencial.

Às minhas orientadoras, Doutora Carla Silva e Doutora Susana Costa, muito obrigada pela oportunidade excelente de desenvolver este projeto, pela partilha de conhecimento, pela dedicação, pelo incentivo, pelas ferramentas que me permitiram desenvolver este trabalho e pela disponibilidade.

Gostaria também de agradecer ao Doutor Artur Ribeiro, por toda a ajuda e disponibilidade no decorrer do projeto.

Agradecer a todos os colegas do laboratório LBBN pela ajuda e partilha de conhecimento, e pelo excelente ambiente proporcionado. Um agradecimento muito especial às minhas colegas Cláudia, Tatiana e Catarina, por ao longo destes meses tornarem os dias mais fáceis.

Aos meus professores que ao longo destes dois anos me deram as ferramentas e conhecimento necessários para poder desenvolver o projeto.

Estou muito grata, sem vocês a conclusão deste capítulo não teria sido possível.

A todos, um enorme obrigada!

Declaração de integridade

Declaro ter realizado este trabalho académico com integridade. Confirmo que não recorri a plágio ou qualquer forma de uso indevido de informação ou falsificação de resultados ao longo do processo que conduziu à sua elaboração.

Declaro ainda que tomei pleno conhecimento do Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

As doenças pigmentares, como vitiligo e melasma, são condições médicas que afetam a coloração da pele, cabelo e olhos devido a um desequilíbrio na produção ou distribuição de pigmentos, como a melanina. Tendo em conta esta problemática, no presente trabalho foi estudado o papel de extratos de fontes naturais, na regulação da ação da tirosinase, sendo esta fundamental no processo de síntese da melanina, pela conversão do aminoácido tirosina em melanina. Devido à sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade, os extratos provenientes de fontes naturais (no caso o tomilho, a cortiça, a lavanda, o eucalipto e o cacau) representam uma excelente alternativa para substituir compostos sintéticos na indústria de cosméticos.

Existe uma necessidade permanente de desenvolver técnicas ecológicas e eficazes para substituir os solventes e métodos tradicionais. Para a extração foram usados tanto solventes eutéticos (SE) como solventes hidroetanólicos (HE), e aplicaram-se dois métodos de extração: i) extração assistida por pás e ii) extração assistida por misturadora planetária. O maior rendimento de extração foi obtido para o extrato tomilho usando SE 1:1 (Glicerol: Ácido Láctico), pás, 90 min (0,74 g de extrato/g de material inicial). Os melhores resultados e termos de teor em fenólicos e flavonoides foram obtidos para o extrato de cortiça (1,76-362,09 mg EAG/g de extrato, com HE) e em teor em flavonoides (4,28-1448,16 mg EQ/g de extrato, com HE), respetivamente. Dos extratos testados, relativamente atividade antioxidante, no ensaio de DPPH e no ensaio ABTS o melhor foi o da cortiça extraída com HE (EC_{50} de 0,346-0,578 mg/mL e EC_{50} de 28,840-42,958 mg/mL, respetivamente), e no ensaio do FRAP o melhor foi o da lavanda extraída com HE (ET de 2,617-9,964 mg/mL). Além disso, investigou-se o potencial quanto ao fator de proteção solar (FPS) dos extratos e os resultados revelaram mais uma vez o extrato de cortiça como o mais promissor (FPS 0,032-10,427). Foi avaliada a capacidade de inibição da tirosinase por parte dos extratos obtidos, tendo o tomilho revelado a maior capacidade de inibição da enzima (34,4-46%). Neste trabalho foram produzidas nanopartículas de quitosano com extrato das cinco fontes naturais encapsuladas. As nanopartículas revelaram uma morfologia esférica com diâmetro médio de 195nm e carga superficial de 37mVs. O perfil de libertação do extrato foi avaliado tendo-se obtido 42% de libertação para o extrato de eucalipto e 26% para o extrato de cacau, tendo estes dois extratos obtido as maiores percentagens de libertação. Os extratos provenientes de fontes naturais evidenciam propriedades promissoras que demonstram que poderão ser integrados em formulações cosméticas para tratar doenças pigmentares.

Palavras-chave: Compostos bioativos; doenças pigmentares; extratos naturais; nanopartículas tirosinase

Abstract

Pigmentary diseases such as vitiligo and melasma are medical conditions that affect the coloring of the skin, hair and eyes due to an imbalance in the production or distribution of pigments such as melanin. In view of this problem, this study investigated the role of extracts from natural sources in regulating the action of tyrosinase, which is fundamental in the process of melanin synthesis, by converting the amino acid tyrosine into melanin. Due to their biodegradability and lack of toxicity, extracts from natural sources (in this case thyme, cork, lavender, eucalyptus and cocoa) represent an excellent alternative for replacing synthetic compounds in the cosmetics industry.

There is an ongoing need to develop environmentally friendly and effective techniques to replace traditional solvents and methods. Both eutectic solvents (ES) and hydroethanolic solvents (HE) were used for extraction, and two extraction methods were applied: i) paddle-assisted extraction and ii) planetary mixer-assisted extraction. The highest extraction yield was obtained for the thyme extract using SE 1:1 (Glycerol: Lactic Acid), paddles, 90 min (0.74 g of extract/g of initial material). The best results in terms of phenolic and flavonoid content were obtained for the cork extract (1.76-362.09 mg GAE/g extract, with HE) and flavonoid content (4.28-1448.16 mg QE/g extract, with HE), respectively. Of the extracts tested, in terms of antioxidant activity, the best in the DPPH test and ABTS test was cork extracted with HE (EC_{50} of 0.346-0.578 mg/mL and EC_{50} of 28.840-42.958 mg/mL, respectively), and the best in the FRAP test was lavender extracted with HE (ET of 2.617-9.964 mg/mL). In addition, the extracts sun protection factor (SPF) potential was investigated and the results once again revealed the cork extract as the most promising (SPF 0.032-10.427). The tyrosinase inhibition capacity of the extracts obtained was assessed, with thyme showing the greatest capacity to inhibit the enzyme (34.4-46%). In this work, chitosan nanoparticles were produced with extracts from the five natural sources encapsulated. The nanoparticles showed a spherical morphology with an average diameter of 195nm and a surface charge of 37mV. The release profile of the extract was evaluated, with 42% release for the eucalyptus extract and 26% for the cocoa extract, with these two extracts having the highest release percentages. Extracts from natural sources show promising properties which demonstrate that they could be integrated into cosmetic formulations to treat pigmentary disorders.

Keywords: Bioactive compounds; pigmentary diseases; natural extracts; nanoparticles; tyrosinase

Índice

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de integridade	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice de símbolos e abreviaturas	x
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xvi
1. Estado de arte.....	1
1.1 Melanina.....	1
1.1.1 Melanogénese	3
1.1.2 Hiperpigmentação e hipopigmentação	5
1.2 Cosméticos para o controlo da hiper- ou hipopigmentação	7
1.3 Fontes Naturais	9
1.3.1 Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	10
1.3.2 Cacau (<i>Theobroma cacao</i>).....	11
1.3.3 Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)	12
1.3.4 Cortiça (<i>Quercus suber L.</i>).....	13
1.3.5 Eucalipto (<i>Corymbia citriodora</i>)	14
1.4 Extração de compostos bioativos de fontes naturais.....	15
1.5 A enzima tirosinase.....	16
1.5.1. O papel da tirosinase na regulação da melanogénese	16
1.6. Caracterização dos extratos	19
1.6.1. Conteúdo em fenólicos.....	19
1.6.2 Conteúdo em flavonoides	20

1.6.3 Atividade antioxidante.....	21
1.6.4 Proteção Solar	21
1.6.6 Inibição da atividade da tirosinase	24
1.7 Nanopartículas	25
2. Motivação e objetivo do trabalho	29
3. Materiais e métodos.....	30
3.1. Materiais.....	30
3.2. Métodos.....	31
3.2.1. Caracterização dos solventes de extração	31
3.2.1.1. Polaridade.....	31
3.2.1.2. Medição do pH	32
3.2.1.3. Viscosidade	32
3.2.1.4. Densidade.....	32
3.2.1.5. Índice de refração	32
3.2.1.6. Condutividade.....	32
3.2.2. Extração de compostos bioativos de fontes naturais.....	33
3.2.3 Caracterização dos extratos	34
3.2.3.1 Espectros UV-Visível dos extratos das diferentes fontes naturais.....	34
3.2.3.2 Determinação do teor em fenólicos dos extratos	35
3.2.3.3 Determinação do teor de flavonoides total dos extratos	36
3.2.3.4. Determinação da atividade antioxidante dos extratos.....	37
3.2.3.5 Determinação do fator de proteção Solar (FPS)	40
3.2.3.6 Inibição da tirosinase pelos diferentes extratos	41
3.2.4 Produção de nanopartículas de quitosano com extratos encapsulados	42
3.2.4.1. Caracterização das nanopartículas	43
3.2.5. Avaliação do perfil da liberação controlada dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano.....	43

4. Resultados e Discussão	45
4.1 Caracterização dos solventes	45
4.2 Extração de compostos bioativos de fontes naturais	46
4.3 Caracterização dos extratos	49
4.4.2 Espectros UV-Visível dos extratos naturais	49
4.4.3. Determinação do teor fenólico total dos extratos	53
4.4.4 Determinação do teor de flavonoides total dos extratos	56
4.4.5 Determinação da atividade antioxidante dos extratos	59
4.4.5.1 Ensaio de atividade de eliminação do radical DPPH	59
4.4.5.2. Ensaio de atividade de eliminação do radical ABTS	65
4.4.5.3 Ensaio do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)	69
4.4.6. Determinação do fator de proteção solar (FPS)	73
4.4.1 Inibição da tirosinase na presença dos extratos naturais	75
4.5. Produção de nanopartículas de quitosano com extratos encapsulados	79
4.5.1. Caracterização físico-química das nanopartículas	79
4.6. Avaliação do perfil de liberação dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano	83
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	85
6. Referências Bibliográficas	88

Índice de símbolos e abreviaturas

ABTS	ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
DHI	5,6-di-hidroxi-indole
DHICA	ácido 5,6-di-hidroindol-2-carboxílico
DOPA	3,4-di-hidroxifenilalanina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAE	extração assistida por enzima
EAG	equivalentes ácido gálico
E_{NR}	polaridade
ET	equivalentes trolox
FPS	fator de proteção solar
FRAP	poder antioxidante redutor do ferro
HE	solvente hidroetanólico
kDa	kiloDalton
MAE	extração assistida por micro-ondas
MED	dose mínima de eritema
MITF	microftalmia
mV	millivolts
<i>n</i>	índice de refração
PDI	índice de polidispersão
PFE	extração por fluido pressurizado
ROS	espécies reativas de oxigénio
SC-CO₂	extração de CO ₂ supercrítico
SE	solvente eutético
SEM	microscopia eletrónica de varrimento
STEM	microscopia eletrónica de transmissão de varrimento
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
TPP	tripolifosfato
TYR	enzima tirosinase
UAE	extração assistida por ultrassom
UV-vis	ultravioleta-visível

η	viscosidade
ρ	densidade
σ	condutividade elétrica

Índice de Figuras

Figura 1. Imagem ilustrativa da representação dos melanócitos e queratinócitos (Imagem adaptada de Bento-Lopes et al., 2023).	2
Figura 2. Esquema referente à melanogénese catalisada por TRP, TRP-1 e TRP-2 (Niu & Aisa, 2017)..	5
Figura 3. Síntese de melanina (Janádia & Fernandes, 2019).	5
Figura 4. Discromias: a) e b) padrão de hipopigmentação Lesões hipopigmentadas mostradas sob luz normal e sob luz UV, observadas em áreas de pele previamente afetadas pela psoríase após 6 meses de terapia sistêmica. Exame com lâmpada de Wood da pele hipopigmentada mostrando bordas bem definidas das lesões; c) e d) padrões de hiperpigmentação. c) Padrão de hiperpigmentação lentiginosa que ocorre em áreas previamente afetadas pela psoríase. d) Padrão hiperpigmentado homogêneo ocorrendo em áreas previamente afetadas por psoríase (Amico et al., 2020); e) leucomelanodermias, membros inferiores (parte dorsal) evidenciando múltiplas máculas hiperpigmentadas com hipopigmentação periférica (Abideen et al., 2021).	6
Figura 5. Produtos existentes no mercado com função clareadora da pele: a) Sérum Antimanchas da Isdin; b) Gel Hiperpigmentações, Xerose, Fotoenvelhecimento da Retincare; c) Creme Espuma de Limpeza da Uriage; d) Creme Intensivo Anti-Manchas da Uriage.	8
Figura 6. a) Estrutura química do carvacrol e b) Estrutura química do timol (Vaezi, 2023).	10
Figura 7. a) Estrutura química da Epicatequina (Daussin et al., 2021), b) Estrutura química da catequina e c) Estrutura química da teobromina (Cadoná et al., 2022).	11
Figura 8. Estruturas químicas do a) linalol (Merckle et al., 2021); b) acetato de linalilo (Karabörklü & Ayvaz, 2023); c) 1,8-cineol (Pries et al., 2023); d) terpinen-4-ol (Karabörklü & Ayvaz, 2023); e) cânfora (Karabörklü & Ayvaz, 2023).	12
Figura 9. Estruturas químicas do a) ácido elágico; b) flavonoides; c) cumarinas.	13
Figura 10. Estruturas químicas do a) 1,8-cineol; b) α -pineno; c) β -pineno; d) terpineol.	14
Figura 11. Sítio ativo da estrutura tridimensional cristalina da tirosinase do cogumelo (Zou et al., 2017).	16
Figura 12. Modelos estruturais para reações catalisadas pela tirosinase (Vaezi, 2023).	17
Figura 13. a) O lado ativo da oxi-tirosinase (Tyr oxi); b) As reações do ciclo catalítico da tirosinase (Tyr); M, D e Q são produtos monofenolase, difenolase e quinona, respetivamente (Vaezi, 2023).	18
Figura 14. Estruturas químicas do a) Timol; b) Fenol; c) Resorcinol; d) Hidroquinona; e) Pirocatecol; f) Ácido salicílico; g) 2-Naftol (Alara et al., 2021).	19

Figura 15. Estrutura química dos flavonoides, esqueleto do fenilbenzopirano (Rosa et al., 2019).	20
Figura 16. Estruturas químicas de a) Flavonas; b) Isoflavonas; c) Flavonóis; d) Flavanonas; e) Dihidroflavonóis; f) Proantocianidinas; g) Flavan-3-ols; h) Antocianidinas (Rosa et al., 2019).	21
Figura 17. Ilustração esquemática da pele com as três vias de penetração possíveis para substâncias aplicadas topicamente (1 = intercelular, 2 = folicular e 3 = intracelular) (Yukuyama et al., 2016).	28
Figura 18. Fontes naturais usadas: a) Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>), b) Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>), c) Eucalipto (<i>Corymbia citriodora</i>), d) Cortiça (<i>Quercus suber</i> L.) e e) Cacau (<i>Theobroma cacao</i>) (as imagens foram obtidas através do site PlantNet).	30
Figura 19. Condições utilizadas nos diferentes métodos de extração.	33
Figura 20. Equipamento utilizado para as extrações: pás (esquerda) e misturadora planetária (direita).	34
Figura 21. Esquema ilustrativo do procedimento para traçar os espectros UV-vis (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	35
Figura 22. Esquema do procedimento usado para a determinação do teor de fenólico total segundo o ensaio de Folin-Ciocalteu (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	36
Figura 23. Esquema da determinação do teor de flavonóides total após o ensaio com cloreto de alumínio (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	37
Figura 24. Esquema da determinação da atividade antioxidante após o ensaio de atividade de eliminação do radical DPPH (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	38
Figura 25. Esquema da determinação da atividade antioxidante após o ensaio de atividade de eliminação do radical ABTS (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	39
Figura 26. Esquema da determinação da atividade antioxidante após o ensaio do poder antioxidante redutor do ferro (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	40
Figura 27. Esquema da determinação do fator de proteção solar (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	41
Figura 28. Esquema ilustrativo do procedimento da medição da inibição da tirosinase pelos extratos (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	42
Figura 29. Produção de nanopartículas (as imagens foram obtidas através do software BioRender). ..	43
Figura 30. Esquema ilustrativo da libertação controlada dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano (as imagens foram obtidas através do software BioRender).	44
Figura 31. Rendimentos obtidos após extração da lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau com diferentes solventes: extração hidroetanólica a) HE 1 e b) HE 2 e extração com solventes eutéticos c)	

SE 1 d) SE 2 e) SE 3.	47
Figura 32. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Lavanda HE (50 EtOH:50 H ₂ O); b) Lavanda HE (20 EtOH:80 H ₂ O); c) Lavanda SE (50 EtOH:50 H ₂ O); d) Lavanda SE (20 EtOH:80 H ₂ O).....	50
Figura 33. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Cacau HE (50 EtOH:50 H ₂ O); b) Cacau HE (20 EtOH:80 H ₂ O); c) Cacau SE (50 EtOH:50 H ₂ O); d) Cacau SE (20 EtOH:80 H ₂ O).	50
Figura 34. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Tomilho HE (50 EtOH:50 H ₂ O); b) Tomilho HE (20 EtOH:80 H ₂ O); c) Tomilho SE (50 EtOH:50 H ₂ O); d) Tomilho SE (20 EtOH:80 H ₂ O).....	51
Figura 35. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Eucalipto HE (50 EtOH:50 H ₂ O); b) Eucalipto HE (20 EtOH:80 H ₂ O); c) Eucalipto SE (50 EtOH:50 H ₂ O); d) Eucalipto SE (20 EtOH:80 H ₂ O).....	51
Figura 36. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Cortiça HE (50 EtOH:50 H ₂ O); b) Cortiça HE (20 EtOH:80 H ₂ O); c) Cortiça SE (50 EtOH:50 H ₂ O); d) Cortiça SE (20 EtOH:80 H ₂ O).	52
Figura 37. Conteúdo fenólico total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3. Os valores apresentados resultam da média de 2 ensaios.	53
Figura 38. Conteúdo flavonoide total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3. Os valores apresentados resultam da média de 3 ensaios.	57
Figura 39. Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Maciel et al., 2018).....	60
Figura 40. Reação entre DPPH • e antioxidante para formar DPPH (Gulcin & Alwasel, 2023).....	61
Figura 41. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de DPPH.....	62
Figura 42. Formação de um radical ABTS estável a partir de ABTS com persulfato de potássio (Gulcin & Alwasel, 2023).	66
Figura 43. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de ABTS.....	67
Figura 44. Formação do complexo (Fe 2+ –TPTZ) a partir do complexo (Fe 3+ –TPTZ) por antioxidante (Gulcin & Alwasel, 2023).	70
Figura 45. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de FRAP.....	70
Figura 46. Determinação do fator de proteção solar do extrato de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau. Os valores apresentados resultam da média de 2 ensaios.....	73
Figura 47. Inibição da tirosinase pelo extrato de lavanda obtido com diferentes solventes e diferentes	

métodos de extração.	75
Figura 48. Inibição da tirosinase pelo extrato de cacau obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.	76
Figura 49. Inibição da tirosinase pelo extrato de tomilho obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.	76
Figura 50. Inibição da tirosinase pelo extrato de eucalipto obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.	77
Figura 51. Inibição da tirosinase pelo extrato de cortiça obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.	77
Figura 52. Tamanho, carga e PDI de nanopartículas de quitosano encapsulando extrato de: a) vazias, b) cacau, c) eucalipto, d) lavanda, e) tomilho e f) cortiça.	79
Figura 53. Ilustração de uma nanopartícula de quitosano com o extrato encapsulado.	80
Figura 54. a) Partículas de quitosano (controlo); b) e c) Partículas de quitosano com extrato de cacau encapsulado; d) e e) Partículas de quitosano com extrato de eucalipto encapsulado.	82

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição dos solventes eutéticos utilizados no presente estudo.....	30
Tabela 2. Composição dos solventes hidroetanólicos utilizados no presente estudo.	31
Tabela 3. Valores EE (λ) $\times$ I (λ) de cada um dos comprimentos de onda utilizados para determinar o FPS.	41
Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos solventes de extração: polaridade (E_{NR}), pH, viscosidade (η), densidade (ρ), índice de refração (n) e condutividade (σ).	45
Tabela 5. Rendimentos obtidos após extração da lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau com diferentes solventes: extração hidroetanólica a) HE 1 e b) HE 2 e extração com solventes eutéticos c) SE 1 d) SE 2 e) SE 3, apresentando os maiores rendimentos de cada solvente.....	48
Tabela 6. Valores de comprimento de onda máximo para os diversos extratos e solventes.	52
Tabela 7. Conteúdo fenólico total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3, apresentando o maior teor fenólico de acordo com o método e solvente.	54
Tabela 8. Conteúdo flavonoides total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3, apresentando o maior teor flavonoide, de acordo com o método e solvente.	58
Tabela 9. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de DPPH com o valor da maior atividade antioxidante associada a cada método e solvente.....	62
Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de ABTS, com o valor da maior atividade antioxidante associada a cada método e solvente.....	68
Tabela 11. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de FRAP, com os valores de maior atividade antioxidante, associados a cada método e solvente, em termos de ET (Equivalentes de trolox).	71
Tabela 12. Determinação do fator de proteção solar do extrato de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau, apresentando o maior FPS de acordo com o método e solvente.	74
Tabela 13. Inibição da tirosinase pelos extratos obtidos com diferentes solventes e diferentes métodos de extração, apresentando a maior % de inibição.	78
Tabela 14. Avaliação da libertação controlada dos extratos que são libertados das nanopartículas de	

cacau, de tomilho, de cortiça, de lavanda e de eucalipto, e medição da concentração (%).	83
---	----

1. Estado de arte

1.1 Melanina

A pele é o maior órgão do corpo humano, desempenhando a função de proteção contra fatores térmicos, mecânicos, químicos e microbianos a que este está sujeito (Hussein, 2005; Palm & O'Donoghue, 2007; Svobodova et al., 2006). A pele representa uma grande parte da aparência física de uma pessoa, por isso é fundamental protegê-la de problemas como textura áspera, rugas, envelhecimento, hiper ou hipopigmentação, entre outros (González et al., 2008; Sgarbi et al., 2007).

A melanina é um pigmento biológico produzido na forma de polímero por células de melanócitos localizados no estrato basal da epiderme da pele, essencial para a produção de cor na pele humana, sendo também responsável pela coloração do cabelo, olhos e outras estruturas do corpo, sendo o principal pigmento responsável pela proteção da pele contra os danos induzidos por radiação ultravioleta (Feng et al., 2022; Hanamura et al., 2008; J. Y. Lin & Fisher, 2007; Wang et al., 2006). Os dois principais tipos de células que constituem a epiderme da pele são os queratinócitos, que se encontram em grande quantidade em todas as camadas da epiderme e produzem queratina para atuar na proteção das células epiteliais do stresse mecânico ou não mecânico; e os melanócitos, que se encontram na camada basal da epiderme e produzem o pigmento protetor, melanina. Os melanócitos são células que têm origem na crista neural durante o desenvolvimento embrionário como melanoblastos dérmicos e migram para a epiderme. Os queratinócitos são células que se reproduzem e desenvolvem e passam por um processo contínuo de diferenciação em direção às camadas mais externas da epiderme. Esse processo resulta na formação de cinco camadas distintas da pele, conhecidas como estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo, que se encontram apenas na pele grossa, enquanto na pele fina, que é a que abrange a maior parte do corpo humano, o estrato lúcido não está presente. Cada melanócito é capaz de se ligar a cerca de 40 queratinócitos viáveis através das suas dendrites, conseguindo formar a melanina epidérmica (Moreiras et al., 2021). As células de melanócitos são responsáveis pela produção de dois tipos de melanina, a eumelanina e a feomelanina (Hanamura et al., 2008; J. Y. Lin & Fisher, 2007; Wang et al., 2006). A eumelanina é um tipo de pigmento que pode variar entre tons de castanho e tons de preto sendo que é mais abundante em indivíduos com pele mais escura e cabelos castanhos ou pretos, sendo uma macromolécula de 5,6-di-hidroxi-indole (DHI) e ácido 5,6-di-hidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Por outro lado, a feomelanina é um pigmento que vai do amarelo ao vermelho e é mais comum em pessoas com cabelos loiros ou ruivos, sendo uma macromolécula que

contém enxofre composta por unidades de 1,4-benzotiazina (Janádia & Fernandes, 2019). A pigmentação da pele pode ser dividida em dois tipos de cores: a cor constitutiva, que é determinada geneticamente e não muda com a exposição solar, e a cor induzida ou facultativa, que é resultado da exposição solar ou de doenças que afetam a pigmentação da pele. As alterações patológicas na cor da pele são chamadas de discromias (Peixoto, 2015). As peles que apresentam pigmentação leve não apresentam melanina nas camadas superiores, já as peles mais escuras, apresentam pigmentação nessas camadas. De entre diversos fatores críticos na determinação dos diferentes fotótipos de pele, vários autores sugerem que um deles é o mecanismo de transferência de melanina entre os melanócitos, os produtores de pigmento, e os queratinócitos, os recetores de pigmento (**Figura 1**) (Moreiras et al., 2021).

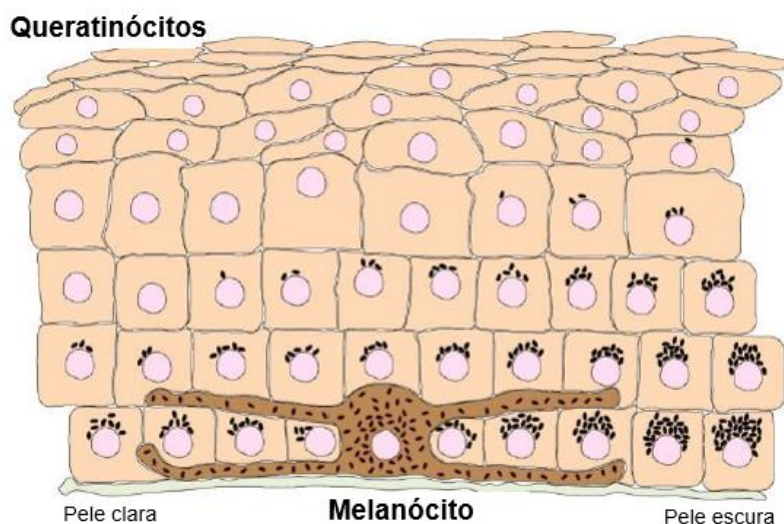


Figura 1. Imagem ilustrativa da representação dos melanócitos e queratinócitos (Imagem adaptada de Bento-Lopes et al., 2023).

A melanina desempenha um papel importante de prevenção de problemas da pele, através da sua capacidade de absorver a radiação ultravioleta (UV) nociva (Feng et al., 2022; Solano et al., 2006). Contudo, quando existe uma acumulação de grandes quantidades de melanina pode ocorrer a pigmentação anormal, causando doenças como cloasma e sardas. Existem atualmente produtos comerciais de clareamento, como hidroquinona, ácido kójico e arbutina que são utilizados para regular a biossíntese excessiva de melanina. Contudo, o uso prolongado destes produtos pode causar problemas de saúde. Apesar da arbutina ser instável quimicamente, é muitas vezes usada em vez da hidroquinona, visto que a hidroquinona se apresenta muito tóxica para a medula óssea e com efeitos mutagénicos nas células, sendo relacionada com reações adversas, como a dermatite. Por conseguinte, utilizar extratos de plantas de modo a desenvolver inibidores de melanina naturais e seguros, tem sido um dos maiores alvos de pesquisa e investigação. Estudos recentes demonstraram que alguns extratos de plantas e

fitoquímicos apresentam efeitos inibitórios significativos da melanina (Feng et al., 2022). É possível adicionar extratos vegetais com propriedades inibidoras da tirosinase em produtos cosméticos para reduzir a síntese de melanina. Um exemplo disso é o resveratrol encontrado na planta *Vitis vinífera* L., que demonstrou um efeito significativo na inibição da atividade da tirosinase (Feng et al., 2022). Outro exemplo relata que a galangina encontrada em *Alpinia officinarum*, que possuem a capacidade de inibir a atividade da tirosinase em células cultivadas e em ratos sem pêlos (Feng et al., 2022). Além disso, alguns extratos de plantas e fitoquímicos têm a habilidade de inibir os fatores de transcrição associados à microftalmia (MITF), alcançando, dessa forma, o efeito de redução da melanina por meio da regulação de diferentes vias de sinalização e da mediação do óxido nítrico e da autofagia de citocinas. Por exemplo, a cardamonina extraída da semente de *Alpinia katsumadai* Hayata tem a capacidade de inibir a melanogênese ao controlar a via de sinalização Wnt/ β -catenina (Feng et al., 2022), enquanto o β -mangostin extraído da semente de *Garcinia mangostana* regula a via de sinalização induzida pela hormona estimulante de melanócitos alfa (α -MSH) para reduzir a produção de melanina (Feng et al., 2022). Adicionalmente, alguns extratos de plantas apresentam propriedades fotoprotetoras ao absorver a radiação UV e, conseqüentemente, inibir a produção de melanina. Um exemplo disso é o extrato etanólico das folhas de *Andrographis paniculata* L., que possui uma alta capacidade de absorção de UV devido ao seu elevado teor de flavonoides (Feng et al., 2022).

A síntese de melanina é controlada principalmente pela tirosinase, uma enzima que contém cobre e está presente exclusivamente nos melanócitos (Parvez et al., 2006; Sharma et al., 2004). O controle da produção de melanina é uma abordagem crucial para tratar desordens de pigmentação na pele para propósitos cosméticos (Roy et al., 2013).

1.1.1 Melanogênese

A melanogênese corresponde ao processo de produção de melanina, que envolve um longo e complexo conjunto de reações químicas. Este processo depende de fatores hormonais e genéticos e da ação dos raios UV (Peixoto, 2015).

O processo de biossíntese de melanina envolve principalmente a migração dos melanócitos para áreas específicas do embrião, a divisão e amadurecimento dessas células, a formação de melanossomas, a síntese de melanina, transporte das partículas de melanina e a sua excreção. Quando expostos aos raios ultravioleta, os melanócitos produzem radicais livres de oxigênio reativos, como o anião superóxido, radical hidroxilo e o peróxido de hidrogênio. Concentrações elevadas de radicais livres de oxigênio causam

danos ao DNA celular e também estimulam a produção de melanina nos melanócitos por meio de reações complexas. Em seguida, os melanócitos transportam continuamente as partículas de melanina para os queratinócitos e epiderme circundantes e, por fim, essas partículas são eliminadas junto com o estrato córneo. O processo de biossíntese de melanina envolve uma sequência de reações químicas e enzimáticas (Feng et al., 2022; Janádia & Fernandes, 2019).

A melanina é constituída principalmente por dois tipos de polímeros de quinona, eumelanina e feomelanina e a síntese desses dois compostos requer a presença de três substâncias essenciais: a tirosina, que atua como o substrato inicial para a formação da melanina, a enzima tirosinase (TRP), que catalisa a conversão final da tirosina em melanina e a presença de oxigênio.

O processo inicial começa pela atuação da tirosinase sobre a L-tirosina (complexo de enzimas cúprico-proteico) e envolve a oxidação da L-tirosinase em L-DOPA para, por subsequente oxidação, formar a dopaquinona, com a tirosinase atuando como a enzima catalisadora. Essa etapa é identificada como a reação principal limitante de velocidade na biossíntese da melanina. Em seguida, a dopaquinona sofre auto-oxidação, produzindo dois compostos: 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) e dopacromo. A DOPA pode ser reoxidada para originar a dopaquinona sob a ação da tirosinase, ao mesmo tempo que o dopacromo é predominantemente convertido em 5,6-diidroxiindole (DHI) pela proteína correlacionada com a tirosinase-2 (TRP-2, dopacromo-tautomerase). Uma pequena fração do dopacromo é hidroxilada para se tornar ácido 5,6-diidroxiindol carboxílico (DHICA). Por fim, ocorre uma polimerização do DHI com DHICA para formar a eumelanina, que é a melanina mais abundante nos humanos e é responsável pela pigmentação castanha e preta da pele e cabelos. Além do mais, quando a cisteína ou glutatona estão presentes, a dopaquinona reage com esses compostos para produzir cisteil-DOPA ou glutatona-DOPA, que são subsequentemente oxidados para formar a feomelanina, que é a menos abundante e responsável pela pigmentação que varia do amarelo ao vermelho, sendo que este processo encontra-se presente na **Figura 2**. Na **Figura 3** está presente a síntese da melanina de forma sucinta (Feng et al., 2022; Janádia & Fernandes, 2019).

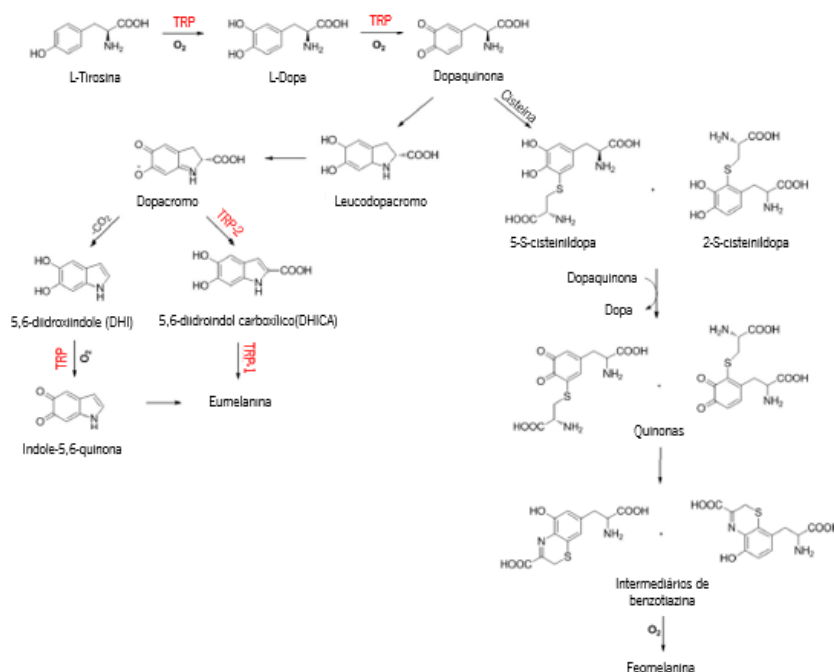


Figura 2. Esquema referente à melanogénese catalisada por TRP, TRP-1 e TRP-2 (Niu & Aisa, 2017).

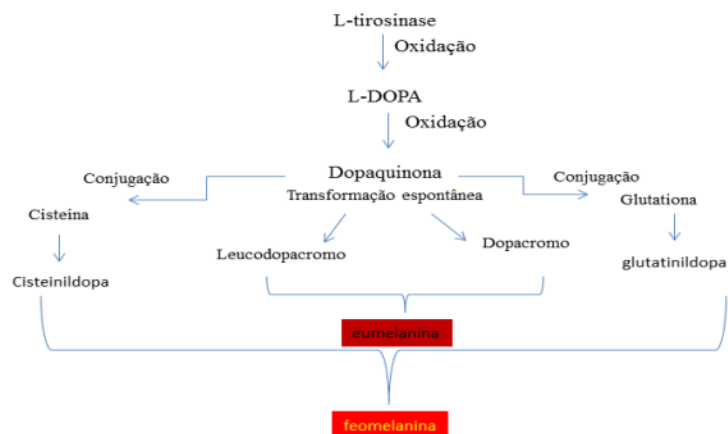


Figura 3. Síntese de melanina (Janádia & Fernandes, 2019).

1.1.2 Hiperpigmentação e hipopigmentação

As discromias (**Figura 4**) são mudanças na coloração normal da pele devido às diferenças na quantidade de melanina. Estas patologias que afetam a pigmentação da pele são comuns e resultam de uma combinação de fatores genéticos e ambientais, podendo manifestar-se de diversas formas no corpo, seja de forma localizada, difusa, regional ou delimitada. As desordens pigmentares, sejam elas localizadas ou generalizadas, são designadas de acordo com a distribuição anómala de melanina em três grupos principais, as hipocromias, leucomelanodermias e hiperpigmentações, sendo a hipocromia

referente as manchas claras, onde há uma redução na produção ou distribuição de melanina, a leucomelanodermia referentes a manchas brancas e escuras e, por fim, as hiperchromias, manchas escuras onde se verifica um aumento na produção ou acumulação de melanina (Peixoto, 2015).

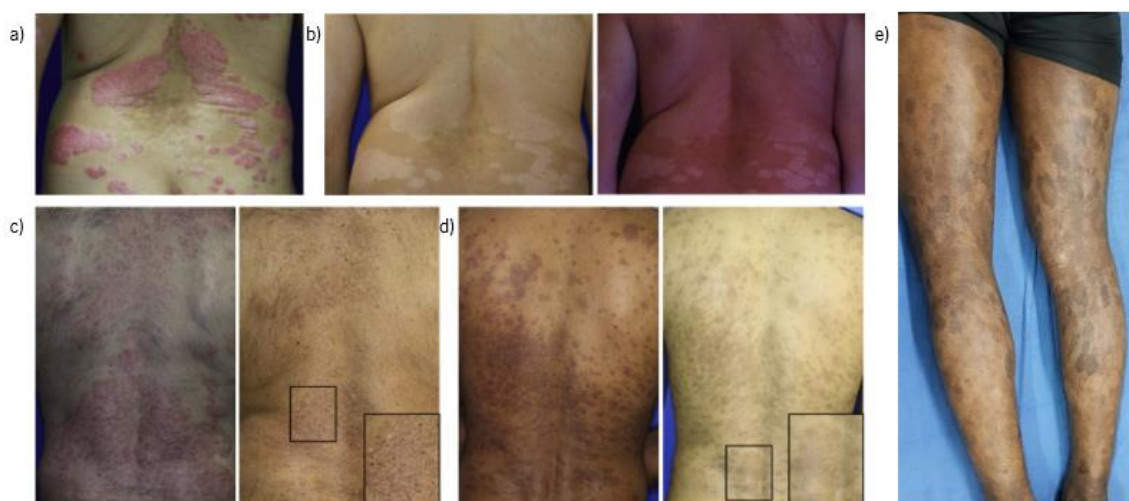


Figura 4. Discromias: **a) e b)** padrão de hipopigmentação Lesões hipopigmentadas mostradas sob luz normal e sob luz UV, observadas em áreas de pele previamente afetadas pela psoríase após 6 meses de terapia sistêmica. Exame com lâmpada de Wood da pele hipopigmentada mostrando bordas bem definidas das lesões; **c) e d)** padrões de hiperpigmentação. **c)** Padrão de hiperpigmentação lentiginosa que ocorre em áreas previamente afetadas pela psoríase. **d)** Padrão hiperpigmentado homogêneo ocorrendo em áreas previamente afetadas por psoríase (Amico et al., 2020); **e)** leucomelanodermias, membros inferiores (parte dorsal) evidenciando múltiplas máculas hiperpigmentadas com hipopigmentação periférica (Abideen et al., 2021).

A hiperpigmentação na camada externa da pele ocorre devido ao aumento da atividade da enzima tirosinase e está associada a várias condições dermatológicas, incluindo melasma, melanodermia pós-inflamatória e lentigo solar. A exposição solar à radiação ultravioleta (UV) aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na pele. Essas ROS estimulam a síntese de melanina, causam danos no DNA e podem originar a multiplicação de melanócitos. O excesso de produção e consequente acumulação de melanina na pele humana resulta em alteração da coloração, formação de rugas e envelhecimento cutâneo (Roy et al., 2013; Wang et al., 2006). A hiperpigmentação pode originar o surgimento de várias condições dermatológicas sérias, como dermatite por cloasma, sardas e manchas pigmentares relacionadas com o envelhecimento. A síntese de melanina pode ser reduzida evitando a exposição aos raios ultravioleta, inibindo o metabolismo e a multiplicação dos melanócitos, bem como a inibição da atividade da tirosinase. Além disso, a hiperpigmentação também pode ser reduzida usando antioxidantes que atuam como eliminadores de ROS e inibidores da melanogênese na camada epidérmica da pele. Atualmente, estão a ser desenvolvidos diversos produtos cosméticos e medicamentos clareadores com o objetivo de regular a produção de melanina na pele (Roy et al., 2013; Wang et al., 2006).

A hipopigmentação/hipomelanose dá-se devido à redução na produção de melanina, que pode ser atribuída a diferentes fases do processo de síntese desta substância. Maioritariamente, as condições relacionadas à hipopigmentação são benignas e não estão relacionadas com doenças sistêmicas ou malignidades. No entanto, o desejo estético e o estigma social, fazem com que as pessoas procurem um tratamento. As máculas, lesões achatadas com 5 mm de tamanho distintas pela descoloração quando contrastadas com a pele normal ao redor, de hipopigmentação são bastante comuns, sendo observadas em pelo menos 1 em cada 20 pessoas, tanto em crianças como em adultos (Madireddy & Crane, 2023). A ocorrência de diferentes condições de hipomelanose varia de acordo com a idade, raça e sexo dos pacientes assim como com a localização geográfica, herança familiar e exposição a fatores ambientais. A hipopigmentação pode originar o surgimento de várias condições fisiopatológicas como a hipomelanose gutata idiopática (IGH) e a pitíriase alba tendo como causa a exposição à luz UV, a pitíriase devido à genética, condições ambientais, pele oleosa e aplicação de cremes ou loções oleosas, o vitiligo por meio da apoptose de melanócitos induzida por células T, autoanticorpos para componentes de melanócitos resulta na redução da síntese de melanina, a hipopigmentação pós-inflamatória relacionada com a exposição a produtos químicos, entre outras (Madireddy & Crane, 2023).

Existem diversas formas de diagnóstico como o exame com lâmpada de Wood, a dermatoscopia, a raspagem de pele com montagem de KOH, biópsia de pele e a microscopia eletrônica. Após o diagnóstico feito e tendo a confirmação da doença, existem medicamentos que podem ser usados como os corticosteroides tópicos, os inibidores tópicos de calcineurina, a vitamina D, os antifúngicos, os emolientes, entre outros (Madireddy & Crane, 2023).

1.2 Cosméticos para o controlo da hiper- ou hipopigmentação

Segundo o regulamento do Conselho da União Europeia, um cosmético é definido como qualquer substância ou mistura destinada a entrar em contacto com as partes externas do corpo humano, como pele, cabelo, unhas, lábios ou com os dentes e a mucosa da cavidade oral. Os produtos cosméticos têm a finalidade de serem aplicados diretamente na superfície externa do corpo humano, com o objetivo de realizar quatro funções principais, manter a pele em boas condições, alterar a aparência, proteger e corrigir o odor corporal. O termo “cosmecêuticos” refere-se a uma combinação de cosméticos e produtos farmacêuticos, sendo usado para definir produtos que podem beneficiar a pele, mas não possuem um efeito terapêutico biológico claro, como é o caso de alguns ingredientes como retinol e agentes de branqueamento (Halla et al., 2018).

Através da aplicação de produtos cosméticos é possível proteger a pele contra agentes nocivos quer endógenos, quer exógenos (Saraf & Kaur, 2010). Estes produtos reforçam a aparência externa da pele, nutrindo-a, ao nível da sua textura, hidratação, elasticidade, como também atuam na sua longevidade, solucionando problemas que esta possa apresentar, como as rugas, textura áspera, o envelhecimento, a hiper ou hipopigmentação, entre outros (Ashawat et al., 2009; Datta & Paramesh, 2010).

Considerando a problemática em estudo, desregulação da atividade da enzima tirosinase e consequente hiper e hipopigmentação da pele, podem-se destacar produtos com capacidade de redução/eliminação do problema. Os retinoides, por exemplo, diminuem a pigmentação, aproximadamente em cerca de 60%, e contribuem de forma positiva para a distribuição de melanina na epiderme. Tendo em conta este potencial são bastante utilizados em formulações cosméticas de modo a atuar neste tipo de problemas (Hoang et al., 2021).

Os hidroxiácidos são também utilizados para combater as discromias, assim como outros problemas como o acne, cicatrizes superficiais e textura da pele (Hoang et al., 2021). Os derivados da vitamina B são indicados para o tratamento da hiperpigmentação (Glass, 2020). A vitamina C é outro exemplo já conhecido que atua no tratamento de hiperpigmentação, melasma e manchas solares, uma vez que possui a capacidade de obstruir o sítio ativo na enzima tirosinase, o que limita a melanogénese (Hoang et al., 2021).

Agentes clareadores de pele também muito utilizados são extratos cítricos, babosa, ácido kójico, extrato de alcaçuz, extrato de amora branca, extrato de uva-ursina, groselha indiana, hidroquinona, resveratrol, *Cassia alata* e *Cassia occidentalis*, *Kaliziri*, *Garcinia mangostana*, *Salvia miltiorrhiza* e *Salvia officinalis* (Dini & Laneri, 2021; Tasneem Husain et al., 2022).

Existem alguns produtos, já comercializados, próprios para o tratamento destas duas doenças relacionadas com a pigmentação, como é o caso dos quatro produtos presentes na **Figura 5**.



Figura 5. Produtos existentes no mercado com função clareadora da pele: a) Sérum Antimanchas da Isdin; b) Gel Hiperpigmentações, Xerose, Fotoenvelhecimento da Retincare; c) Creme Espuma de Limpeza da Uriage; d) Creme Intensivo Anti-Manchas da Uriage.

1.3 Fontes Naturais

Existem compostos naturais utilizados nas aplicações cosméticas que beneficiam a pele em diversos distúrbios que esta possa apresentar, atuando ao nível dos mecanismos de reparação de tecidos, na modulação da resposta imune, na eliminação de espécies reativas de oxigénio, entre outras (Glass, 2020).

Os consumidores estão cada vez mais a optar por ingredientes naturais em produtos de beleza e cosméticos, em detrimento de produtos químicos sintéticos. Isso deve-se ao potencial económico que existe na utilização de recursos naturais provenientes dos ecossistemas, bem como à biodegradabilidade e à menor toxicidade associada aos ingredientes naturais em comparação com os sintéticos. Por essa mesma razão, extratos naturais de plantas, são utilizados na criação de antioxidantes, agentes clareadores e conservantes naturais para produtos cosméticos. Isso permite também maximizar o aproveitamento de recursos que muitas vezes são subutilizados ou descartados (Hoang et al., 2021). Os métodos de extração não convencionais, considerados mais amigos do ambiente, apresentam diversas vantagens globais, como é exemplo os efeitos não térmicos e prevenção da degradação de compostos termolábeis, a redução do tempo de extração, do consumo de energia e da quantidade de solventes, os processos de reprodutibilidade automatizados, maiores rendimentos e seletividade de compostos de interesse, e são ecologicamente mais sustentáveis e corretos (Rodríguez De Luna et al., 2020).

As fontes naturais utilizadas neste estudo já foram mencionadas noutros estudos no que diz respeito ao ramo cosmético.

A lavanda é usada, em óleo, para combater o acne (Bijauliya et al., 2017). Investigações recentes revelaram que a biomassa obtida como subproduto durante a extração do óleo essencial pode ser aproveitada como fonte de polissacarídeos e incluída em produtos cosméticos. De entre todas as espécies de lavanda cultivadas, a *Lavandula angustifolia* é a predileta para o uso em perfumaria e cosméticos (Crişan et al., 2023).

A cortiça é usada nos cosméticos antienvelhecimento como ingrediente principal e a presença de suberina no extrato de cortiça proporciona um efeito *lifting* na pele. Isso significa que os produtos são projetados para ajudar a firmar e tonificar a pele, reduzindo os sinais visíveis de envelhecimento. A suberina, encontrada naturalmente na cortiça, é destacada como responsável por esse feito positivo na aparência da pele, tornando-a uma escolha promissora para o segmento antienvelhecimento da indústria cosmética. A cortiça apresenta outras potenciais aplicações cosméticas como exfoliante, antimicrobiana, anti-inflamatória, despigmentante, entre outras (Mota et al., 2022).

Desde tempos remotos que o tomilho, mais precisamente o óleo essencial de tomilho, tem sido extensamente utilizado na medicina alternativa em virtude das suas propriedades carminativas, antiespasmódicas digestivas, expetorantes e anti-inflamatórias. Além disso, os metabólitos secundários do tomilho possuem atividades biológicas, que têm aplicações tanto na indústria farmacêutica quanto na cosmética. Por esse motivo, os óleos essenciais de tomilho são extensivamente incorporados em produtos de cuidado com a pele e higiene, como pasta dos dentes, água de colônia, desodorizantes, loções capilares, gel de banho, entre outros (Soleimani et al., 2022).

Diversos extratos de eucalipto são usados na indústria dos cosméticos como ingrediente de fragrância e agente condicionador da pele (Becker et al., 2023).

1.3.1 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

O tomilho apresenta o seu centro de origem localizado na região do mediterrâneo (Kosakowska et al., 2020).

Os principais bioativos do tomilho são: o timol, carvacrol, fenóis monoterpênicos, ácidos fenólicos, compostos bifenílicos, flavonóides e óleos essenciais.

O carvacrol é um monofenol de origem natural, reconhecido pelas suas propriedades antimicrobianas. Na indústria alimentar, é utilizado como conservante de carne ou agente aromatizante. Além disso, possui uma ampla gama de efeitos biológicos e farmacológicos, abrangendo propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas, bem como ação antioxidantes, inseticida e anticolinesterásicas. O timol, assim como o carvacrol (**Figura 6**), exibe uma ampla variedade de efeitos biológicos e farmacológicos (Vaezi, 2023). O estudo de Satooka & Kubo, concluiu que o óleo de tomilho, em particular os bioativos timol e carvacrol, são os principais compostos bioativos a contribuir para a inibição da melanogénese (Satooka & Kubo, 2011).

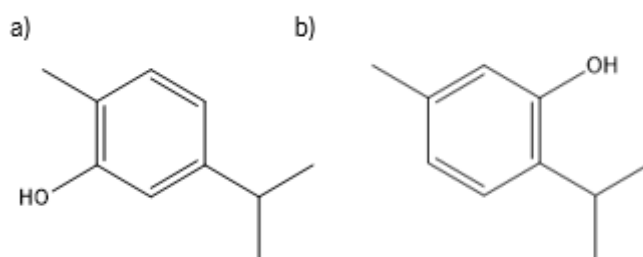


Figura 6. a) Estrutura química do carvacrol e b) Estrutura química do timol (Vaezi, 2023).

1.3.2 Cacau (*Theobroma cacao*)

O cacau encontra-se, principalmente, na África Ocidental e América (Carr & Lockwood, 2011).

Os principais bioativos do cacau são: os flavonóides, principalmente flavanóis, sendo a epicatequina e a catequina os mais abundantes, e a teobromina (**Figura 7**). Estes possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e atuam na modulação da aterosclerose e hipertensão (Hernández-Hernández et al., 2022).

A epicatequina faz parte de um conjunto de flavonóides que oferecem uma ampla gama de benefícios para a saúde humana. Esta substância apresenta muitas propriedades biológicas notáveis, destacando-se principalmente por ações antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anti-tumorais e de proteção cardiovascular (Prakash et al., 2019).

A catequina é um composto polifenólico que pode ser encontrado em altas concentrações em algumas frutas e vegetais (Daussin et al., 2021). Este composto demonstrou ter eficácia como anti-inflamatório, antidiabético, anticancerígeno e neuroprotetor (Baranwal et al., 2022).

A teobromina pertence à classe química das metilxantinas, que exibem notáveis atividades biológicas que contribuem para diversos benefícios ao nível da saúde humana. Estas desempenham um papel na prevenção de doenças respiratórias e cardiovasculares, ao nível de propriedades anticancerígenas, no controlo da obesidade e diabetes, na infertilidade humana, assim como na gestão de doenças neurológicas e neurodegenerativas (Cadoná et al., 2022).

O extrato de vagem de cacau apresenta um elevado teor de polifenóis o que faz com que apresente potencial para ser desenvolvido como agente antioxidante e inibidor da tirosinase nas preparações cosméticas, ou seja, o presente extrato possui atividade inibitória da tirosinase (Mukhrani et al., 2023).

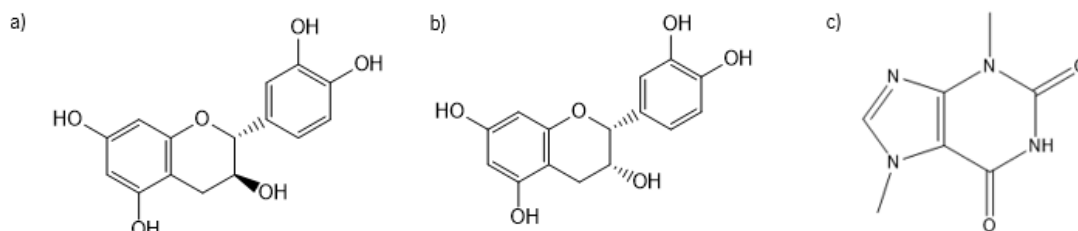


Figura 7. a) Estrutura química da Epicatequina (Daussin et al., 2021), b) Estrutura química da catequina e c) Estrutura química da teobromina (Cadoná et al., 2022).

1.3.3 Lavanda (*Lavandula angustifolia*)

A lavanda encontra-se na bacia do mediterrâneo (Lafhal et al., 2020).

Os principais bioativos da lavanda são: linalol, o acetato de linalilo, o 1,8-cineol, o terpinen-4-ol e a cânfora (**Figura 8**).

O linalol, nome comum do 2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol, é um álcool monoterpreno aromático, muito utilizado em perfumes, cosméticos, aditivos alimentares, entre outros. Este apresenta diversas propriedades como anti-cancerígena, antimicrobiana, ação neuroprotetora, antidepressiva, entre outras (An et al., 2021).

O acetato de linalilo é um composto de baixa toxicidade e volátil presente nas frutas cítricas, o componente predominante encontrado no óleo de lavanda. Este composto demonstrou ter propriedades anti-inflamatórias, juntamente com efeitos antidiabéticos e anti-stresse, além da capacidade de prevenir a disfunção do endotélio vascular (Seo et al., 2021).

O monoterpreno 1,8-cineol é um agente terapêutico de origem vegetal, usado no tratamento de diversas doenças inflamatórias, tendo em conta as suas propriedades mucolíticas, antimicrobianas, antivirais e anti-inflamatórias (Pries et al., 2023).

O terpinen-4-ol e a cânfora apresentaram atividade inseticida em testes de fumigação e de toxicidade (Karabörklü & Ayvaz, 2023).

O óleo da lavanda é útil em diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-tirosinase, entre outras (Kharraf et al., 2023). Este atua como agente despigmentante devido ao seu potencial anti-tirosinase, sendo eficaz contra o melasma (Wijayadi & Kelvin, 2023).

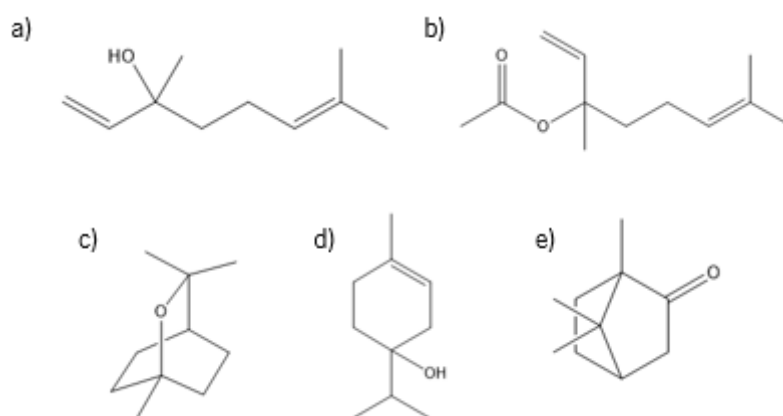


Figura 8. Estruturas químicas do a) linalol (Merckle et al., 2021); b) acetato de linalilo (Karabörklü & Ayvaz, 2023); c) 1,8-cineol (Pries et al., 2023); d) terpinen-4-ol (Karabörklü & Ayvaz, 2023); e) cânfora (Karabörklü & Ayvaz, 2023).

1.3.4 Cortiça (*Quercus suber* L.)

A cortiça encontra-se na região do mediterrâneo ocidental (Sampaio et al., 2019).

Os principais bioativos da cortiça são: ácidos fenólicos (por exemplo, ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido cafeico), sendo o ácido elágico o mais abundante, os flavonóides, as cumarinas (**Figura 9**) e os taninos hidrolisáveis, nomeadamente os elagitaninos.

O ácido elágico é um composto polifenólico encontrado naturalmente como um metabólito secundário em muitas plantas. Tem sido bastante estudado devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagénicas e antiproliferativas. Além destas, possui um excelente e extenso histórico no que diz respeito às suas propriedades antialérgicas, antiateroscleróticas, cardioprotetoras, hepatoprotetoras, nefroprotetoras e neuroprotetoras (Sharifi-Rad et al., 2022).

Os flavonoides são metabólitos secundários que existem em plantas, frutas e sementes. Estes compostos possuem ação anti-inflamatória, anticancerígena, antienvhecimento, antibacteriana, antivirais, neuroprotecção, entre outras (Dias et al., 2021).

As cumarinas pertencem a um grupo de compostos heterocíclicos oxigenados, cristalinos e incolores. Estes compostos apresentam ação antitumoral, atividade anti-HIV, propriedades antibacterianas e antifúngicas, efeito anti-inflamatório, ação anticoagulante bem como efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central (Küpel Akkol et al., 2020).

Os elagitaninos, pertencem aos fenólicos, e encontram-se nos vacúolos e no citoplasma das células vegetais, sendo que são essenciais na proteção em condições naturais de crescimento, contribuindo com defesa química contra infeções por micróbios (Sharifi-Rad et al., 2022).

A cortiça exibiu atividade anti-tirosinase, antioxidante e antiglicosidase (Tanase et al., 2022).

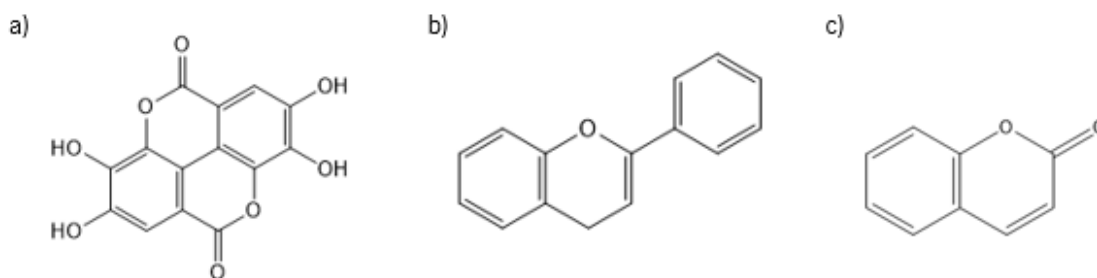


Figura 9. Estruturas químicas do a) ácido elágico; b) flavonoides; c) cumarinas.

1.3.5 Eucalipto (*Corymbia citriodora*)

O eucalipto encontra-se na Austrália, África do Sul, Ásia e Brasil (Healey et al., 2021).

Os principais bioativos do eucalipto são: 1,8-cineol, α - e β -pineno e terpineol (**Figura 10**).

O monoterpeno 1,8-cineol, como mencionado anteriormente, é um agente terapêutico de origem vegetal e apresenta propriedades mucolíticas, antimicrobianas, antivirais e anti-inflamatórias (Pries et al., 2023).

Os pinenos são hidrocarbonetos que compõem um composto bicíclico com ligações duplas terpenóides, sendo que se encontram em diversas plantas. Eles se apresentam em dois isômeros, conhecidos como alfa e beta-pineno, que são obtidos por meio de destilação de plantas. O α -pineno é um líquido incolor, não miscível em água, mas é solúvel em óleo e etanol. Da mesma forma, o β -pineno é um líquido incolor que se dissolve em óleos, contudo não é solúvel em etanol e água. Os pinenos têm demonstrado diversos efeitos terapêuticos, incluindo propriedades anti-alérgicas, antioxidantes, anti-esquizofrênicas, anti-inflamatórias, hipoglicemiantes, entre outros. Fontes comuns de pinenos incluem o pinheiro, a planta ajwain (*Trachyspermum ammi*) e até mesmo a casca de frutas de limão. (*Revisão da Atividade Terapêutica do Pineno (C₁₀H₁₆)*, 2020; Salehi et al., 2019).

O terpineol é um álcool terciário monoterpenóide monocíclico, encontrado na natureza numa ampla variedade de fontes, incluindo flores, folhas, frutas, ervas, óleos e outros materiais vegetais, em diferentes concentrações. Além de seus usos tradicionais na indústria de aromas e fragrâncias, estudos recentes têm revelado diversas propriedades biológicas do α -terpineol, que incluem ação antioxidante, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antimicrobiana, e até mesmo potencial anticancerígeno, entre outras (Sales et al., 2020).

O eucalipto apresenta várias bioatividades atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, atividade antitirosinase (despigmentação), atividade antimicrobiana e proteção ultravioleta, podendo por isso ser utilizado em cosméticos (Aneklaphakij et al., 2022).

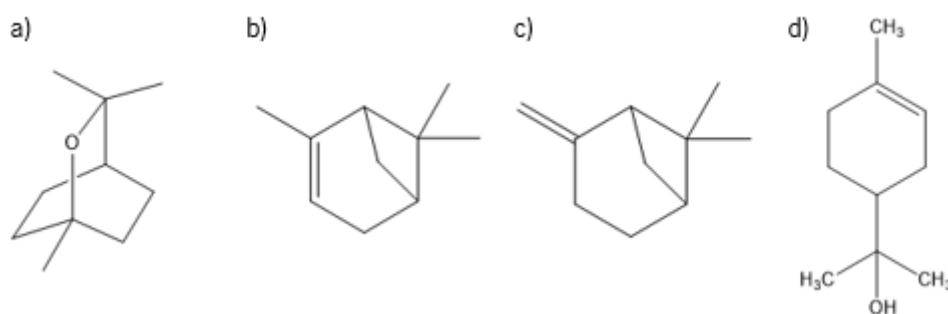


Figura 10. Estruturas químicas do a) 1,8-cineol; b) α -pineno; c) β -pineno; d) terpineol.

1.4 Extração de compostos bioativos de fontes naturais

Existem diversas técnicas de extração, como é o caso das técnicas convencionais, sendo estas a maceração, decoção, percolação, infusão, digestão, extração exaustiva em série, extração de soxhlet (Alara et al., 2021; Zhang et al., 2018).

Muitos laboratórios usam métodos convencionais de extração graças à sua facilidade de uso e ao baixo custo associado. Contudo estes apresentam desvantagens como é o caso de baixa eficiência dos métodos, a necessidade de grandes volumes de solventes orgânicos que são bastante prejudiciais para o ambiente, o que espoleitou a necessidade de procurar ou desenvolver outros métodos (Alara et al., 2021; Zhang et al., 2018).

Os métodos mais recentes apresentam mais vantagens como menor volume de solvente, rendimentos mais altos, menos resíduos tóxicos, menor tempo para ocorrer a extração e apresentam melhor reprodutibilidade do processo (Alara et al., 2021). Estes métodos mais recentes dizem respeito à extração de fluidos supercríticos/extração de CO₂ supercrítico (SC-CO₂), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultrassom (UAE), extração assistida por enzima (EAE), extração por fluido pressurizado (PFE) (Alara et al., 2021; Zhang et al., 2018).

Os solventes orgânicos são considerados indispensáveis em diversas indústrias e desempenham um papel essencial em muitos processos, como o fabrico de medicamentos, a extração de corantes e pigmentos e a purificação de compostos (Oomen et al., 2020).

Contudo apesar da sua utilidade, estes solventes orgânicos podem ser tóxicos e apresentar sérios riscos ambientais. A preocupação com os riscos associados leva a uma busca constante por alternativas mais sustentáveis, e mais ecológicas de forma a minimizar o uso de solventes orgânicos. Isso envolve a exploração de tecnologias mais sustentáveis, a redução do consumo e o uso de solventes mais “verdes” (Oomen et al., 2020).

Em 2001 surgiram os solventes eutéticos profundos na área da química verde, e desde então, é possível observar através de diversos estudos que abrangem uma ampla gama de campos de aplicação (El Achkar et al., 2021). Estes representam uma alternativa promissora aos solventes orgânicos tradicionais devido à simplicidade de preparação, que envolve o uso de compostos naturais facilmente disponíveis, bem como a sua baixa toxicidade. Além disso, estes exibem uma notável versatilidade. Neste contexto são detalhadas as propriedades físico-químicas dos solventes eutéticos profundos, abordando aspetos como o seu comportamento de fase, densidade, viscosidade, condutividade iónica, tensão superficial e polaridade (El Achkar et al., 2021). É importante destacar que essas propriedades podem

ser controladas por meio da escolha adequada dos compostos formadores, da relação molar entre eles, da temperatura e do teor de água. As propriedades físico-químicas dos solventes eutéticos profundos têm sido um dos principais motivos que têm despertado um crescente interesse entre os investigadores. Esses solventes oferecem várias vantagens, incluindo baixa volatilidade, não inflamabilidade, baixa pressão de vapor, assim como estabilidade química e térmica. Além do mais, os solventes eutéticos profundos são altamente versáteis do ponto de vista químico, o que significa que podem ser ajustados para atender a aplicações específicas. Essa flexibilidade decorre da ampla gama de possíveis compostos formadores de solventes eutéticos profundos disponíveis (El Achkar et al., 2021).

1.5 A enzima tirosinase

1.5.1. O papel da tirosinase na regulação da melanogénese

A tirosinase, também designada por fenoloxidase, pode ser encontrada em microrganismos, fungos, plantas e animais (Vaezi, 2023).

A tirosinase é uma glicoproteína que contém cobre tipo III (**Figura 11**) conectada à membrana multifuncional localizada na membrana dos melanossomas (Feng et al., 2022). Todas as tirosinases têm uma característica comum, que é a presença de um centro de cobre binuclear do tipo III (T3Cu) no seu sítio ativo. Esse centro consiste em dois átomos de cobre, cada um ligado a três resíduos de histidina. Essa configuração específica dos átomos de cobre no sítio ativo da tirosinase permite que a enzima desempenhe duas reações enzimáticas distintas: *orto*-hidroxilação de monofenóis e oxidação de α -difenóis em α -quinonas (Zaidi et al., 2014).

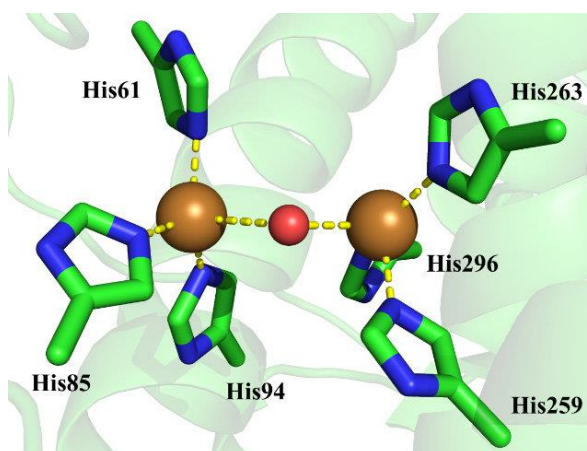


Figura 11. Sítio ativo da estrutura tridimensional cristalina da tirosinase do cogumelo (Zou et al., 2017).

Na **Figura 11**, as cadeias laterais dos resíduos de histidina estão representadas como bastões, enquanto os íons de cobre e o oxigênio em ponte estão representados como esferas. Os átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e cobre estão coloridos com verde, azul, vermelho e castanho, respectivamente (Zou et al., 2017).

A tirosinase pode catalisar a hidroxilação de monofenóis para os catecóis compatíveis, e em seguida, oxidar os catecóis a quinonas correspondentes (Feng et al., 2022). Possui a capacidade de catalisar as atividades de monooxigenase e *o*-difenol oxidase. Na **Figura 12**, abaixo apresentada, é possível observar a oxidação de substratos fenólicos pela tirosinase nas atividades de monooxigenase (cercosolase) e difenolase (catecolase). Na primeira reação, ocorre a adição de um grupo hidroxilo à posição *orto* do anel aromático, enquanto na segunda reação, o composto *o*-dihidroxiado formado anteriormente é oxidado a *o*-quinona. As quinonas são pouco estáveis em solução aquosa e sofrem diversas reações de ciclização podendo apresentar-se sob a forma de diversas melaninas (Vaezi, 2023), esta pode ser transformada em pigmentos de melanina através de reações enzimáticas e não enzimáticas (Zaidi et al., 2014). As atividades de monofenol hidroxilase e difenoloxidase das tirosinases são a base para diversas aplicações biotecnológicas industriais que já foram testadas como marcador em pessoas com melanoma e como alvo para ativação de pró-fármacos. As tirosinases são extensamente encontradas na natureza e desempenham um papel fundamental em diversas funções biológicas, com destaque especial para a melanogênese. A melanogênese, envolve a tirosina que é responsável pela coloração do cabelo, da pele e dos olhos, atuando deste modo na regulação de doenças pigmentares, e desempenha um papel essencial na proteção da pele contra a radiação ultravioleta (UV) (Zaidi et al., 2014).

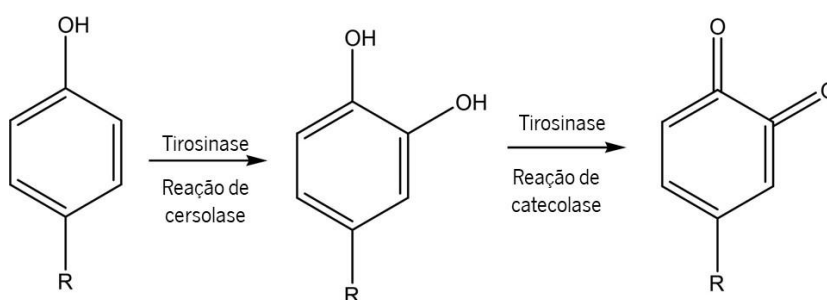


Figura 12. Modelos estruturais para reações catalisadas pela tirosinase (Vaezi, 2023).

A tirosinase é uma enzima que desencadeia a conversão (hidroxilação) de L-tirosina (98,0% Alfa Aesar, USA) em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) e, em seguida, a DOPA é transformada (oxidada) em

DOPA quinona. Essas duas etapas são consideradas as primeiras etapas limitantes de velocidade na síntese de melanina (Wang et al., 2006). A produção excessiva da melanina no corpo humano está associada à ação da enzima tirosinase, que é influenciada por processos antioxidantes, pela tendência da migração de melanina de célula para célula e atividades hormonais. A inibição da função da tirosinase e progresso de inibidores altamente eficazes para essa enzima assumem um papel crucial e aparentam ser as melhores abordagens nos âmbitos da saúde humana, biomedicina, cosmética, podendo ser aplicados em diversos produtos (Vaezi, 2023).

No que diz respeito ao mecanismo das reações da tirosinase, a tirosinase fúngica oral (tirosinase de cogumelo) é uma das espécies usadas como modelo humano, sendo por isso, o melhor modelo para estudar a melanogênese. Como é possível observar na **Figura 13**, abaixo apresentada, o sítio ativo da tirosinase de cogumelo é constituído por dois átomos de cobre, sendo que cada um se liga a três histidinas e um resíduo de cisteína altamente preservado. Na biossíntese da melanina, estão envolvida três variações da tirosinase ([Tyr oxy (Cu(II)-O₂-2-Cu(II)), [Tyr met (Cu(II)-Cu(II))] e [Tyr deoxy (Cu(I)-Cu(I))] cada uma com estruturas distintas de cobre no seu centro ativo da enzima. Entre essas três formas, a variedade oxy é capaz de catalisar tanto a atividade monofenolase como a difenolase, enquanto que a variedade met não apresenta atividade monooxigenase (Vaezi, 2023).

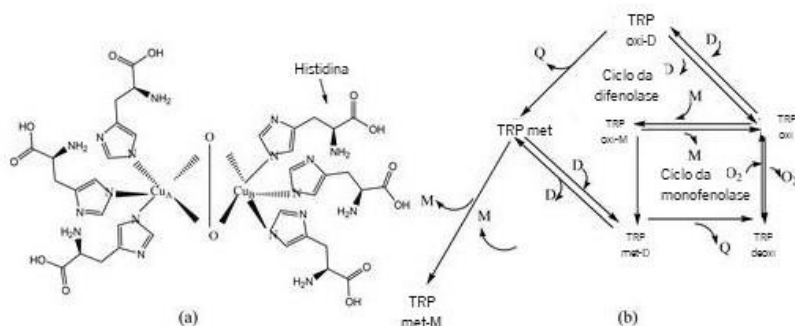


Figura 13. a) O lado ativo da oxi-tirosinase (Tyr oxy); b) As reações do ciclo catalítico da tirosinase (Tyr); M, D e Q são produtos monofenolase, difenolase e quinona, respetivamente (Vaezi, 2023).

Muitas vezes é necessário a presença de um agente redutor, um difenol, para alcançar a forma desoxi e permitir a continuação da reação catalítica. Como resultado, na atividade da monofenolase, ocorre um atraso na produção de uma quantidade adequada de catecol, devido à presença limitada da forma oxi durante as fases iniciais das reações enzimáticas, atraso esse evidente nas preparações enzimáticas em repouso. Por essa razão, é viável regular a atividade da difenolase de forma independente, enquanto que a atividade da monofenolase não. Isto deve-se ao facto de ocorrer sincronização simultânea de ambas as reações, da difenolase e da monofenolase. A forma met da enzima

tirosinase é considerada a configuração enzimática em repouso. Após a purificação da enzima, é observada uma composição mista, 85 a 90% na forma met e 10 a 15% na forma oxi. Como a met apresenta maior percentagem, é a mais abordada nas pesquisas e assume um papel crucial no reconhecimento e procura por inibidores da tirosinase (Vaezi, 2023).

1.6. Caracterização dos extratos

1.6.1. Conteúdo em fenólicos

Os fenólicos são compostos que estão presentes em certas espécies de plantas, e possuem a capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio, o que resulta em efeitos benéficos na pele, como a neutralização de radicais livres e a prevenção de danos ao DNA. Além disso, essas substâncias afetam a imunidade inata, promovendo um estado anti-inflamatório contínuo, e também aceleram a diferenciação e renovação dos queratinócitos (Glass, 2020).

Os compostos fenólicos possuem propriedades que combatem a inflamação, previnem o cancro, reduzem o risco de aterosclerose e outras características que podem estar associadas a problemas de pele (Kale et al., 2012; Roy et al., 2013).

Nos últimos tempos, surgiu na literatura uma grande variedade de compostos fenólicos naturais com modificações estruturais que foram investigados como potenciais inibidores da tirosinase. Os grupos de inibidores de tirosinase que se destacam incluem derivados fenólicos, assim como derivados de flavonoides, ácido kójico, ácido cinâmico, chalcona, resorcinol, carvacrol, timol, estilbenos, lignanas, terpenóides, entre outros (**Figura 14**) (Vaezi, 2023).

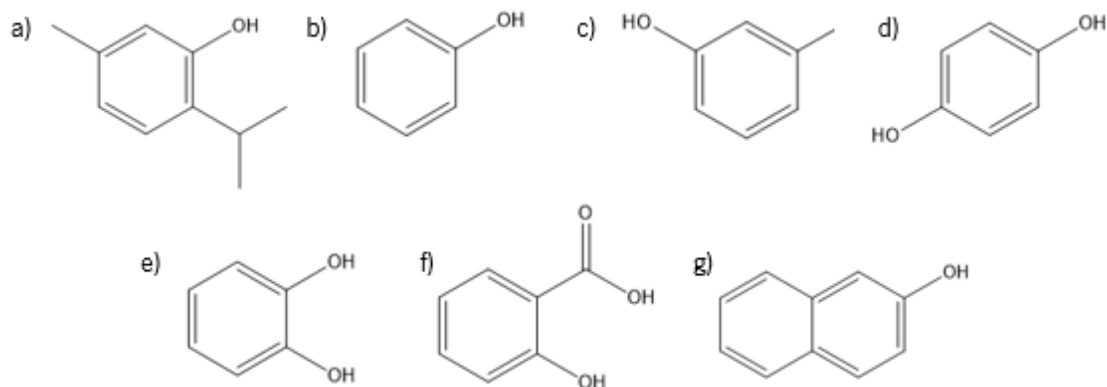


Figura 14. Estruturas químicas do a) Timol; b) Fenol; c) Resorcinol; d) Hidroquinona; e) Pirocatecol; f) Ácido salicílico; g) 2-Naftol (Alara et al., 2021).

1.6.2 Conteúdo em flavonoides

Os flavonoides (**Figura 15**) são um conjunto variado de compostos polifenólicos provenientes de plantas, incluindo os subgrupos proantocianidinas, antoxantinas e flavanóis (**Figura 16**). Eles estão presentes em diversos alimentos, como mirtilos, chá preto, vinho tinto (nas sementes de uva), chocolate, e na planta *Ginkgo biloba*. Essas substâncias apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, com baixa toxicidade. Além disso, alguns flavonoides também demonstram efeitos que inibem a produção de melanina, tornando-os interessantes tanto para uso cosmético como nutracêutico (Glass, 2020). No entanto, é importante salientar que existe pouca evidência de ensaios clínicos que corroborem esses efeitos. Os isoflavonoides são compostos fitoestrógenos encontrados em plantas e fazem parte do grupo dos flavonoides. A sua utilização em cosméticos baseia-se principalmente na teoria de que previnem o envelhecimento da pele relacionado com a idade, através da ativação de fatores de crescimento. No entanto, é importante mencionar que existem poucas evidências clínicas disponíveis para comprovar esses efeitos (Glass, 2020).

Os flavonoides são suplementos polifenólicos que apresentam um papel importante na proteção contra a oxidação de lípidos e estão associados à atividade antioxidante (Bernatoniene et al., 2011; Liu et al., 2008, 2008; Roy et al., 2013).

Diversos estudos têm vindo a confirmar a eficácia destes compostos e dos seus derivados, sendo os grupos hidroxilo muito importantes para a atividade inibidora da tirosinase (Vaezi, 2023).

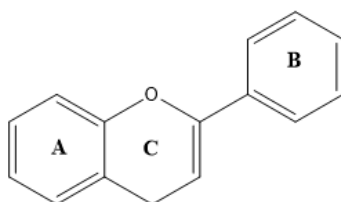


Figura 15. Estrutura química dos flavonoides, esqueleto do fenilbenzopirano (Rosa et al., 2019).

Os flavonoides apresentam um esqueleto de fenilbenzopirano: dois anéis fenilo (A e B) unidos por um anel heterocíclico do tipo pirano (C). Os flavonoides podem ser divididos em seis grupos distintos, ou famílias, de acordo com as variações presentes no anel de pirano. Dentro de cada família, os compostos individuais diferenciam-se pelo arranjo de hidroxilação e metilação nos anéis A e B (Rosa et al., 2019).

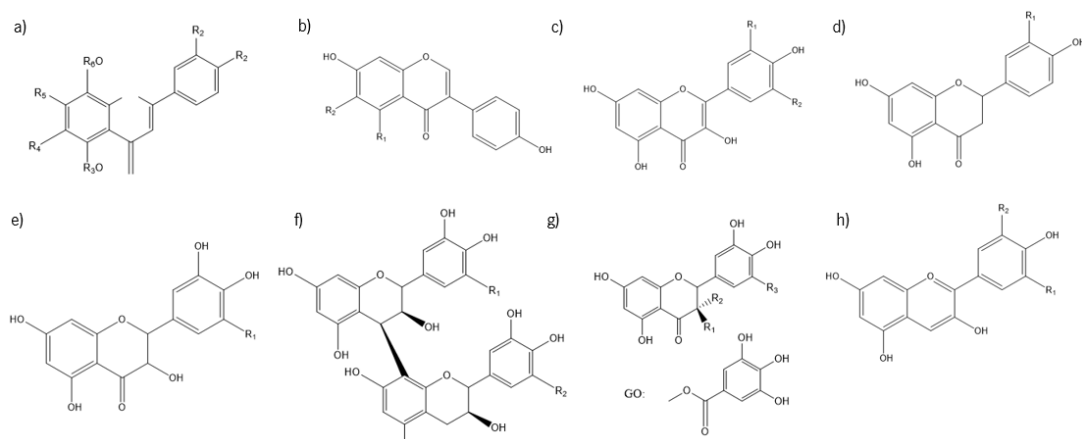


Figura 16. Estruturas químicas de a) Flavonas; b) Isoflavonas; c) Flavonóis; d) Flavanonas; e) Dihidroflavonóis; f) Proantocianidinas; g) Flavan-3-ols; h) Antocianidinas (Rosa et al., 2019).

1.6.3 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que têm a capacidade de inibir os processos de oxidação que são desencadeados pela presença de oxigênio atmosférico ou de ROS. Estes são utilizados no mecanismo de defesa do organismo contra doenças relacionadas com os danos causados pelos radicais livres (C.-W. Lin et al., 2020). Quando os mecanismos internos do corpo não conseguem garantir uma proteção suficiente contra as espécies reativas do oxigênio, torna-se necessário o uso de antioxidantes exógenos. Estes podem ser encontrados na forma de aditivos nutricionais, produtos farmacêuticos ou cosméticos, contendo compostos antioxidantes como princípio ativo. Essas substâncias ajudam a complementar a defesa antioxidante do organismo e podem oferecer uma proteção adicional contra os danos causados pelos radicais livres (Kale et al., 2012; Roy et al., 2013).

1.6.4 Proteção Solar

Alguns da radiação ultravioleta (UV) produzida pelo sol consegue atingir a superfície da Terra apesar da camada protetora de ozônio estratosférico. O sol emite diferentes tipos de radiação ultravioleta, sendo dividida em Ultravioleta C (270-290 nm), Ultravioleta B (290-320 nm) e Ultravioleta A (320-400 nm), sendo que esta se encontra subdividida em UVA2 (320-340 nm) e UVA1 (340-400 nm). As radiações UVB e UVA alcançam a superfície terrestre em quantidades consideráveis e têm a capacidade de causar efeitos biológicos. O ozônio na estratosfera absorve a radiação UVC, evitando que ela atinja a superfície terrestre (Kullavanijaya & Lim, 2005).

A pele humana é altamente sensível à radiação ultravioleta (UV) e pode sofrer diversos danos quando exposta a níveis elevados desta radiação. A radiação UV afeta diferentes componentes da pele, como DNA e RNA, proteínas, lipídios, e aminoácidos aromáticos como tirosina e triptofano. Essa exposição pode levar a várias alterações na pele, incluindo mudanças histoquímicas de diferentes intensidades, aumento da espessura da camada espinhosa da epiderme e achatamento da junção entre a derme e a epiderme (Balogh et al., 2011). Os níveis de antioxidantes na pele diminuem, as enzimas antioxidantes perdem a sua eficácia e aumenta a presença de marcadores de peroxidação lipídica. Essas alterações podem contribuir para o desenvolvimento de desordens cutâneas e danos na pele (Roy et al., 2013; Yasui & Sakurai, 2003). Quando o corpo é exposto à radiação UV, a pele é estimulada a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres. Esses agentes oxidantes têm efeitos nocivos na pele, levando ao desenvolvimento de problemas cutâneos (González et al., 2008; Sgarbi et al., 2007).

A exposição do corpo humano à radiação solar ultravioleta pode ter efeitos prejudiciais na pele, como queimaduras solares, envelhecimento precoce da pele devido à exposição solar (fotoenvelhecimento), o surgimento de cânceros de pele, enfraquecimento do sistema imunológico local da pele e danos ao DNA das células cutâneas (Afaq & Katiyar, 2011; Katiyar, 2007; Pissavini et al., 2007).

O fotoenvelhecimento da pele é principalmente causado pelos comprimentos de onda UVA, que abrangem a faixa de 320 a 400 nm. Isso ocorre porque os raios UVA têm maior capacidade de penetração nas camadas mais profundas da pele, contribuindo significativamente para os danos relacionados com o envelhecimento cutâneo. Comprimentos de onda mais curtos, como os raios UVB, são cerca de 30 a 40 vezes mais energéticos do que os raios UVA. Eles apresentam maior capacidade de penetração na epiderme, a camada mais superficial da pele. Essa penetração profunda dos raios UVB pode levar ao desenvolvimento de fotocarcinogênese, ou seja, o surgimento de cânceros da pele, além de causar imunossupressão na pele. Portanto, a exposição excessiva aos raios UVB representa um risco significativo à saúde da pele (Hojerová et al., 2011; Lautenschlager et al., 2007; Stanfield et al., 2010).

Alguns compostos, como o ácido *para*-aminobenzóico, dibenzoilmetano e benzofenona-3, são adicionados a protetores solares comerciais para absorverem a radiação UV fornecendo fotoproteção. O que estes compostos têm em comum é a presença de um anel benzênico ou uma estrutura conjugada, que os torna eficazes na absorção de raios UV. A faixa de comprimento de onda UV que eles absorvem e o fator de proteção solar (FPS) são os principais critérios utilizados para avaliar a capacidade fotoprotetora dessas substâncias (Feng et al., 2022).

Os produtos naturais desempenham um papel crucial nas pesquisas em busca de novos compostos bioativos. Isso abre oportunidades para a exploração de novos mecanismos biológicos, a identificação de

moléculas ativas inovadoras e o estudo das relações entre a estrutura e a função, direcionando o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes com menos efeitos colaterais indesejados. Além disso, quando as fontes de substâncias naturais são comuns e amplamente disponíveis, torna-se possível produzi-las em larga escala a custos acessíveis (Ebrahimzadeh et al., 2014). Muitas plantas já demonstraram ter a capacidade de absorção UV, como a *Loes de verdadeiro grandiflorum*, *Morus multicaulis* Perr, no que diz respeito aos ácidos fenólicos a *Pulsatilla cernua*, a *Oryza sativa indica cv*, a *Púnica granatum L.*, outros fenólicos como a *Oryza sativa L.* (arroz preto), curcuma, babosa, cominho, *Orégano vulgaris*, no caso dos flavonoides a *Sophora flavescens*, a *Vinífera L.*, a *Paeoni suffruticosa*, *bálsamo irrevistível*, a *Moringa oleífera*, entre outras. De acordo com a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, só extratos de plantas que apresentem valores de FPS maiores ou iguais a 15 é que são apropriados para produtos fotoprotetores. Certos extratos de plantas foram identificados com altos valores de SPF em baixas concentrações como os extratos etanólicos das folhas de *Andrographis paniculata*, sementes de *Dimorphandra gardneriana*, folhas de *Lippia microphylla* e cascas de *Schinus terebinthifolius*, entre outros exemplos.

Existem evidências sólidas de que a exposição prejudicial à luz ultravioleta (UV) pode desencadear o acúmulo de flavonoides e outros compostos fenólicos, que absorvem a luz UV, nos tecidos da planta. Isso sugere uma função fisiológica, embora especulativa, na proteção contra a luz UV em plantas, e essa descoberta apresenta implicações semelhantes para a proteção contra a luz UV em seres humanos (Ebrahimzadeh et al., 2014).

A determinação do fator de proteção solar (FPS) é definido pela energia UV necessária para produzir uma dose mínima de eritema (MED) na pele protegida, a dividir pela energia UV necessária para produzir uma MED na pele desprotegida (Kaur & Saraf, 2010). O SPF indica a eficácia de um protetor solar, logo um valor mais alto corresponde a uma maior eficácia na prevenção de queimaduras solares. A radiação ultravioleta (UV) origina uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, que podem causar mudanças na estrutura e função de proteínas na pele, como colágeno, elastina e glicosaminoglicanos. Essas alterações podem contribuir para o processo de fotoenvelhecimento (Kambayashi et al., 2001).

As células da pele contêm enzimas como a Superóxido Dismutase, a Catalase e Glutathione peroxidase (SOD, CAT e GPX, respetivamente), bem como peptídeos com grupos tiol, como a glutathione, que auxiliam na produção de antioxidantes (Kang et al., 2009; Roy et al., 2013). É relatado que alto valor de FPS está relacionado com o alto conteúdo fenólico. Essa observação gerou um interesse crescente no uso de antioxidantes naturais em filtros solares, a fim de proporcionar uma ação fotoprotetora adicional. Os

antioxidantes derivados de fontes naturais estão a abrir novas perspectivas para o tratamento e prevenção de doenças relacionadas à exposição à radiação UV (Ebrahimzadeh et al., 2014). Estes podem ser obtidos através da nutrição a partir de fontes naturais, como vitamina C, vitamina E e carotenoides, os quais oferecem proteção contra o fotoenvelhecimento causado pela radiação ultravioleta (Kang et al., 2009; Roy et al., 2013).

A exposição prolongada da pele humana ao sol ou à radiação ultravioleta é mais significativa do que as diferenças na constituição natural da pele. Isso resulta numa redução da elasticidade da pele devido à deterioração da estrutura tridimensional das fibras resilientes, o que, por sua vez, leva a uma diminuição das propriedades elásticas da pele originando as rugas (Roy et al., 2013).

1.6.6 Inibição da atividade da tirosinase

No que diz respeito à inibição da atividade da tirosinase, esta é monitorizada utilizando sempre um espectrofotómetro adequado. Resumidamente, existe diversas misturas reacionais que contém diferentes quantidade de soluções inibidoras e concentrações fixas de tirosinase que são incubadas. Posteriormente é medida a atividade da monofenolase e da difenolase com a L-tirosinase e L-Dopa como substratos, respetivamente, sendo que no fim a absorbância das misturas reacionais é medida, por norma, a 475 nm. De modo a obter resultados mais fidedignos são sempre realizadas repetições, e utiliza-se um inibidor da tirosinase como o ácido kójico, por exemplo, como controlo positivo (Fan et al., 2017).

Os compostos inibidores da tirosinase são testados na presença de substratos monofenólicos ou difenólicos, como a tirosina ou L-DOPA. A avaliação da atividade desses inibidores é realizada considerando a formação de dopacromo. Contudo, alguns apresentam limitações, tais como eficácia limitada, biodisponibilidade reduzida e permeabilidade baixa em relação à pele, o que restringe a sua atividade biológica. Os inibidores da tirosinase possuem a capacidade de diminuir a produção e acumulação de melanina na pele ao bloquear a atividade da enzima tirosinase. Todavia, ao reduzir a produção de L-Dopa e dopaquinona, individualmente ou em conjunto, estes inibidores auxiliam na diminuição da síntese de melanina desde o início do mecanismo de formação, beneficiando assim o tratamento de doenças causadas pelo excesso de melanina, como é o caso do melanoma, daí ser tão importante avaliar este parâmetro. Um inibidor natural da tirosinase, já bastante estudado é o ácido kójico, contudo apresenta desvantagens como instabilidade química, citotoxicidade, lipofilia, sendo que nos últimos anos muitos estudos têm sido feitos no sentido de compreender a atividade de extratos vegetais contendo derivados de flavonoides, carvacrol, resorcinol, timol e ácidos gordos de modo a

melhorar a eficácia e segurança destes inibidores (J. Li et al., 2023; Vaezi, 2023). Os compostos fenólicos têm a capacidade de inibir a tirosinase por meio de uma competição com o substrato da tirosinase, agindo de maneira semelhante a este. Diversas espécies de plantas, que contêm quantidades razoáveis de fenólicos e flavonoides, exibem a inibição mais pronunciada da atividade da tirosinase. Isso sugere que a composição dos compostos fenólicos desempenha um papel mais significativo na inibição da tirosinase do que apenas a concentração desses mesmos compostos (Baek et al., 2021).

Portanto, a busca por novos inibidores da tirosinase, visando reduzir a toxicidade e aumentar a atividade inibitória, requer uma síntese e alteração estrutural de compostos naturais, como os derivados de plantas (J. Li et al., 2023; Vaezi, 2023).

1.7 Nanopartículas

As nanopartículas, devido às suas diversas aplicações nas mais distintas áreas, têm sido cada vez mais investigadas (Maleki Dizaj, Barzegar-Jalali, et al., 2015; Maleki Dizaj et al., 2016). Um nanomaterial é uma substância, que pode ser encontrada na natureza, surgir como um subproduto ou ser produzida pelo homem, e é composto por partículas que não estão ligadas entre si, podendo formar aglomerados ou agregados. No contexto dos nanomateriais, pelo menos metade das partículas devem apresentar uma dimensão externa de 1 a 100 nanômetros. (Khezri et al., 2018; Papakostas et al., 2011).

As nanopartículas farmacêuticas são partículas coloidais carregadas com princípios ativos de tamanho nanométrico (10-100 nm), compostas por diferentes substâncias biocompatíveis (Maleki Dizaj, Lotfipour, et al., 2015; Maleki Dizaj, Mennati, et al., 2015). As nanoestruturas lipídicas, as nanopartículas metálicas, nanocristais e nanopartículas poliméricas têm sido utilizadas como diferentes formas de transporte de substâncias ativas em sistemas biológicos (Khezri et al., 2018). Essas nanopartículas possuem a capacidade de melhorar significativamente as propriedades do material em comparação com a sua forma convencional (Maleki Dizaj, Lotfipour, et al., 2015; Maleki Dizaj, Mennati, et al., 2015). Quando um princípio ativo é baseado em nanopartículas, este adquire uma função específica que está relacionada com o tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças. As principais vantagens do uso de nanopartículas como meios para princípios ativos em medicamentos são o direcionamento específico para o local de ação, a redução da toxicidade, a manutenção dos efeitos benéficos, maior segurança e biocompatibilidade, além do avanço mais célere no desenvolvimento de novos medicamentos (De Jong & Borm, 2008). As nanopartículas produzidas a partir de lipídios são especialmente interessantes por causa da sua excelente biocompatibilidade relacionada com o conteúdo lipídico (Kelidari et al., 2016;

Moazeni et al., 2016), sendo que estas desempenham um papel significativo na eficácia dos cosméticos, já que têm demonstrado ser seguras para uso em humanos. Além do mais, as nanopartículas têm o potencial de aumentar a durabilidade e consistência dos produtos cosméticos para cuidados da pele (Akbari et al., 2016; Kelidari et al., 2015; Khezri et al., 2018).

Alguns exemplos já usados são o caso das nanoemulsões, emulsões ultrafinas, muito usadas em desodorizantes, protetores solares e em produtos para cuidados com o cabelo e pele, devido às suas excelentes características como o poder hidratante, a rápida penetração e combinação de texturas e propriedades biofísicas (Brugè et al., 2015). Outro exemplo são as emulsões nanométricas de óleo, água e anfílico, que é um líquido opticamente isotrópico e estável termodinamicamente, também são muito usadas em cosméticos para cuidados com o cabelo e pele (Miao et al., 2013). Os hidrogéis são redes poliméricas que possuem ligações químicas ou físicas capazes de absorver água ou outros fluidos biológicos sem se dissolver, o que lhes permite aumentar de volume e adquirir uma consistência semelhante a um gel (Gokce et al., 2012). Os niossomas, apresentam uma estrutura em forma de vesículas e são compostos de surfactante não iônicos, sendo que estes fazem com que haja um bom armazenamento, um elevado grau de pureza e baixos custos na sua produção. Apresentam, por isso, vantagens como maior estabilidade dos princípios ativos encapsulados, melhor biodisponibilidade de princípios com baixa absorção e maior capacidade de penetração na pele (Sankhyan & Pawar, 2012).

A terapia direcionada no tratamento de doenças envolve a administração prolongada e precisa de agentes terapêuticos na área afetada do corpo. Para que isso ocorra, é essencial desenvolver nanopartículas terapêuticas seguras, estáveis e eficazes, sendo este um dos objetivos principais da nanomedicina. Para além do tempo de retenção, da capacidade de direção, o tamanho das nanopartículas é um fator crítico que influencia a sua circulação, absorção e distribuição no corpo. A forma das nanopartículas também é muito importante, uma vez que afeta a internalização pelas células-alvo. A carga superficial das nanopartículas desempenha um papel na eliminação e direcionamento para o local de atuação. Partículas com carga positiva tendem a gerar respostas imunológicas mais intensas, enquanto partículas com carga próxima a zero são menos suscetíveis à fagocitose. A carga superficial das nanopartículas também está relacionada com a sensibilidade ao pH, o que pode ser explorado para direcionar a sua localização para compartimentos celulares específicos. Em resumo, a investigação em nanomedicina visa superar diversos desafios para desenvolver nanopartículas terapêuticas mais eficazes, estáveis e direcionadas no tratamento de doenças (Yetisgin et al., 2020).

No que diz respeito à problemática em estudo, relacionada com a hiper e hipopigmentação, atualmente, os principais agentes utilizados neste tipo de problema e também nas dermatites incluem

anti-histamínicos, hidroquinonas e corticosteróides. No entanto, o uso prolongado dessa substância pode resultar na sua absorção pelo organismo, desencadeando uma série de efeitos colaterais indesejados, como ocronose, lesões, eczema, dermatite alérgica, potencial carcinogenicidade e risco de cancro da pele, entre outros. Portanto, existe uma necessidade não atendida na área médica de encontrar alternativas seguras e eficazes aos ingredientes sintéticos. Essas alternativas devem ser mais eficazes e melhor toleradas pelos pacientes. A utilização de nanopartículas para administração de medicamentos é a abordagem mais comum para melhorar a absorção pela pele (Shrotriya et al., 2018). Em particular, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) apresentam grande potencial em comparação com outras formas de transporte de nanopartículas, devido à abundância de lípidos no estrato córneo da pele. As pequenas dimensões das partículas lipídicas facilitam a interação direta com o estrato córneo, o que resulta numa maior penetração, retenção e distribuição do medicamento na derme. Isso faz com que se tornem candidatas promissórias para sistemas de administração de medicamentos. Para criar uma forma de dosagem tópica com a textura desejada, as SLNs podem ser incorporadas em veículos dérmicos casuais, como géis e cremes. Geralmente, os géis são preferidos devido à sua capacidade de liberação controlada, direcionamento eficaz para a epiderme, ajuste fácil da consistência e boa compatibilidade com os tecidos cutâneos. Um estudo de Shrotriya et al. teve como principal objetivo produzir nanopartículas lipídicas que foram incorporadas num gel para aplicação tópica, de modo a tratar as doenças pigmentares, tendo sido avaliadas quanto à penetração na pele e oclusividade. Posteriormente, o gel também foi avaliado de modo a verificar o seu efeito inibitório na síntese de melanina (Shrotriya et al., 2018).

A aplicação de tecnologias nanométricas oferece um vasto potencial para melhorar a eficácia dos tratamentos com medicamentos destinados ao controle da hiperpigmentação. Uma abordagem amplamente explorada envolveu recentemente o encapsulamento de agentes hipopigmentantes descritos em sistemas de entrega baseados em nanotransportadores, especialmente no contexto do tratamento do melasma. Esta estratégia apresenta diversas vantagens significativas, como melhoria da capacidade de absorção dos medicamentos pela pele, direcionamento preciso para as áreas afetadas, maior eficácia terapêutica, estabilidade prolongada na manipulação e ação rápida e de longa duração (Singh et al., 2023). Já existem estudos onde demonstram resultados de diversas administração tópica de medicamentos baseados em nanotransportadores para o tratamento do melasma e outros distúrbios de hiperpigmentação, como é o caso de nanotransportadores de ácido kójico que melhorou a distribuição e a libertação controlada do medicamento nas camadas mais profundas da pele, de nitrato de miconazol que proporcionam um melhor efeito de direção na pele e absorção acumulativa do medicamento na pele,

de curcumina apresentam potencial na despigmentação da pele, de glabridina suprimem a síntese de melanina na pele, e de ácido ascórbico adequado para o clareamento da pele, entre outros (Singh et al., 2023).

A pele é composta por várias camadas (**Figura 17**), começando pelo estrato córneo, que consiste em células mortas queratinizadas, seguido pela epiderme, derme e tecido subcutâneo. Dentro das células queratinizadas, existe uma matriz lipídica composta por ceramidas, ácidos gordos, colesterol e ésteres de colesterol, que desempenham um papel vital na formação de uma barreira eficaz na pele. Quando se aplica medicamentos ou princípios ativos topicamente na pele, existem três vias de penetração através da barreira cutânea: (1) a via intercelular, onde a substância se difunde através do estrato córneo entre as camadas lipídicas que envolvem as células corneóцитas; (2) os folículos capilares, que são importantes porque estão cercados por uma rede densa de capilares sanguíneos, permitindo uma penetração eficiente e funcionando como um reservatório para os compostos ativos; e (3) a via transcelular, que é menos compreendida e envolve o transporte direto de medicamentos através das camadas lipídicas e corneóцитos até as células vivas (Yukuyama et al., 2016).

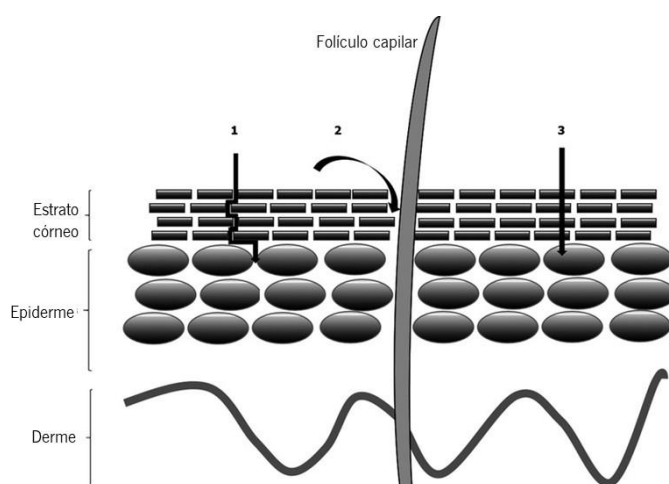


Figura 17. Ilustração esquemática da pele com as três vias de penetração possíveis para substâncias aplicadas topicamente (1 = intercelular, 2 = folicular e 3 = intracelular) (Yukuyama et al., 2016).

Para obter efeitos cosméticos, é necessário que os ativos penetrem na pele, embora não devam ser absorvidos sistemicamente após a aplicação tópica. A penetração cutânea é influenciada por diversos fatores, como o tamanho molecular, grau de ionização, lipofilicidade, interações entre os componentes da fórmula e o composto ativo, bem como as características da formulação e a condição da pele. Dada a composição da pele e sua função de barreira, formulações à base de lípidos são frequentemente consideradas adequadas para a aplicação tópica de princípios ativos (Yukuyama et al., 2016).

2. Motivação e objetivo do trabalho

Os extratos de plantas são ricos numa ampla gama de compostos bioativos com propriedades biológicas benéficas. A extração como é um processo fundamental, é crucial desenvolver técnicas de extração que sejam não apenas económicas e eficientes, mas também ecologicamente sustentáveis, substituindo solventes agressivos, como é o caso dos solventes orgânicos, por alternativas mais amigáveis ao meio ambiente, como são os solventes eutéticos, sendo esse um dos objetivos do presente trabalho.

A indústria cosmética tem adotado cada vez mais produtos de origem natural, procurando substituir ingredientes prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Nesse sentido, o uso de extratos de plantas tem-se destacado como uma solução ideal. Os ingredientes naturais oferecem benefícios terapêuticos, graças às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas entre outras, que ajudam a controlar os danos causados por espécies reativas de oxigénio e inibir bactérias e fungos responsáveis por infeções cutâneas, entre outros benefícios.

Tendo em conta o mencionado anteriormente, o objetivo principal deste estudo foi analisar o papel dos extratos naturais na regulação da ação da tirosinase, com o propósito de identificar a presença de compostos bioativos na sua composição com essa capacidade, de forma a que estes possam posteriormente ser incorporados em formulações cosméticas, para o tratamento de doenças pigmentares como a hiper- e hipopigmentação. A encapsulação dos extratos em nanopartículas também foi alvo de estudo com o objetivo de conseguir aumentar a sua biodisponibilidade e promover a sua entrega sustentada *in vitro*. Para a concretização deste objetivo principal foi necessário a procura por diferentes métodos, a fim de inovar e conseguir o mesmo rendimento ou rendimentos semelhantes usando menos energia, sendo que os métodos de extração usados foram as pás e a misturadora planetária. Assim como de solventes para a extração de compostos bioativos através de fontes naturais, sendo que a utilização de solventes eutéticos foi uma das alterações em prol do bom desenvolvimento do processo. A caracterização dos extratos para aplicação cosmética também foi essencial, assim como as nanopartículas produzidas por encapsulação dos extratos de modo a melhorar a entrega e aumentar a biodisponibilidade.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

As fontes naturais usadas ao longo do presente trabalho estão representadas na **Figura 18**.

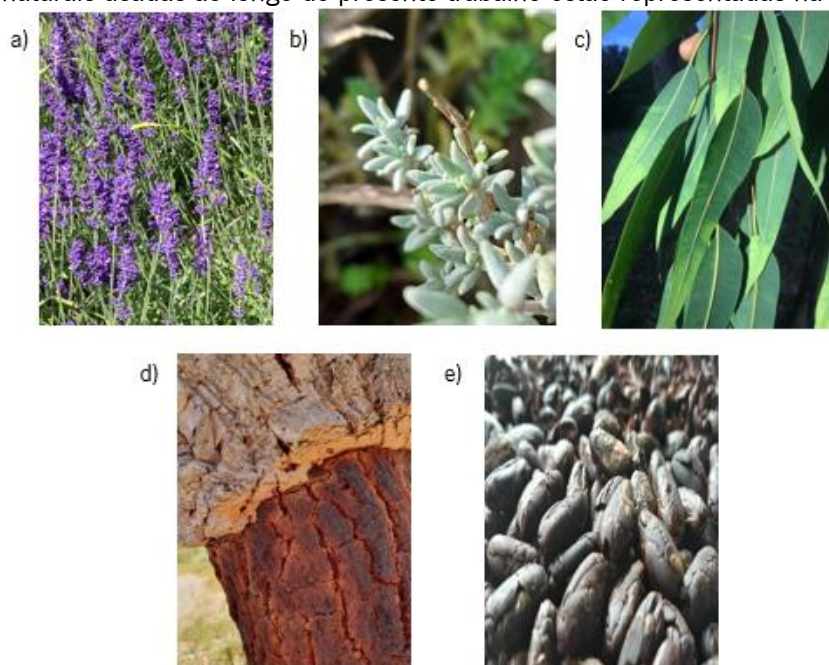


Figura 18. Fontes naturais usadas: a) Lavanda (*Lavandula angustifolia*), b) Tomilho (*Thymus vulgaris*), c) Eucalipto (*Corymbia citriodora*), d) Cortiça (*Quercus suber L.*) e e) Cacau (*Theobroma cacao*) (as imagens foram obtidas através do site PlantNet).

Os solventes de extração utilizados neste trabalho foram duas misturas hidroetanólicas (HE) e três solventes eutéticos profundos (SE). No que diz respeito à composição dos solventes eutéticos utilizados, de origem natural, encontra-se presente na **Tabela 1**, abaixo apresentada.

Tabela 1. Composição dos solventes eutéticos utilizados no presente estudo

Solvente Eutético			Razão molar
SE 1	Glicerol	Ácido Láctico	1:1
SE 2	<chem>OCC(O)CO</chem>	<chem>CC(O)C(=O)O</chem>	4:1
SE 3	<chem>OCC(O)CO</chem>	<chem>OC(=O)CC(O)(C(=O)O)C(=O)O</chem>	1:1

Tabela 2. Composição dos solventes hidroetanólicos utilizados no presente estudo

Solvente Hidroetanólico	Proporção (EtOH:H₂O)
HE 1	50:50
HE 2	30:70

Os materiais utilizados foram no decorrer do presente trabalho foram: tirosinase de cogumelo ($>1000\text{U/mg}_{\text{solido}}$), membrana de diálise cut-off 14 kDa (Sigma), ácido láctico (80,0%), glicerol (99,0%), reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálico (97,5-102,5%), quercetina, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), trolox (6-hidroxi-ácido 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (97,0%), persulfato de potássio (99,99%), piridina, fosfato de potássio (99,0%), cloreto de ferro (97,0%) e clorofórmio (99,8%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha), carbonato de sódio (99,8%), cloreto de alumínio e hidróxido de sódio (98,0%) foram adquiridos de Riedel-de Haen (Alemanha), Acros organics (EUA) e Labkem (Espanha) respetivamente, ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (98,0%), L-tirosina (98,0%) foram adquiridos da Alfa Aesar (EUA), ácido cítrico, ácido clorídrico, ferrozina (97,0%) e etanol (99,8%) foram adquiridos da Fisher Scientific (EUA), vermelho de nilo, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)(98,0%), N,O-Bis(trimetil, trifluoroacetamida (BSTFA+TMCS, 991) foi adquirida à TCI Chemicals (Japão), solução de amónia (25%) foi adquirida à Panreac (Espanha). Todos os produtos químicos foram utilizados sem purificação adicional. O protetor comercial Darphin Soleil FPS 50 foi adquirido numa farmácia.

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização dos solventes de extração

3.2.1.1. Polaridade

O vermelho de Nilo (NR) foi utilizado como sonda solvatocromática para estimar a polaridade dos solventes de extração sob a forma de energia de transição molar (E_{NR}). A solução de corante foi dissolvida no solvente de extração para obter uma concentração de 10^{-5} M e o espectro de absorção do corante (λ_{max}) foi lido num espectrofotómetro UV-Vis (leitor de microplacas BioTek Synergy H1). Todas as medições foram efetuadas à pressão atmosférica a 25°C. A água destilada e o etanol também foram medidos

como referência. A E_{NR} (kcal/mol) foi determinada utilizando a seguinte **equação (1)**:

$$E_{NR} = \frac{hcNA}{\lambda_{max}} = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad (1)$$

Onde h é a constante de Planck; c é a velocidade da luz no vácuo; NA é a constante de Avogadro.

3.2.1.2. Medição do pH

O pH dos solventes de extração foi avaliado com um medidor de pH de bancada (VSTAR83, sonda 8157BNUMD, Thermo Scientific).

3.2.1.3. Viscosidade

Para determinar a viscosidade (η) dos SE, foram usadas duas abordagens. Para os SE 1 e 2, a viscosidade foi avaliada utilizando um viscosímetro Brookfield DV-II+Pro (eixo 27, 50 rpm à temperatura ambiente durante 4 h, com intervalos de tempo de 30 s, binário $3,0 \times 10^6$ N m). Para o SE 3, a viscosidade foi avaliada com um reômetro Discovery HR-1 (TA Instruments), utilizando uma placa paralela de 40 mm, a 25 °C. O método de fluxo foi o seguinte: 1. Rampa de fluxo 25 °C; 120,0s; 0,1 a final 300,0 1/s; 2. Rampa de fluxo 25 °C; 120,0s; 300,0 rampa de fluxo 25 °C; 120,0s; 0,1 a final 300,0 1/s; 3. rampa de fluxo 25 °C; 120,0s; 0,1 a final 300,0 1/s. Os resultados foram expressos em Pa s.

3.2.1.4. Densidade

A densidade (ρ) dos solventes de extração foi medida em triplicado, medindo 25 mL de cada solvente num picnômetro de $25,00 \pm 0,01$ mL. O valor da densidade final foi calculado através do quociente entre a massa e o volume do solvente.

3.2.1.5. Índice de refração

Os índices de refração (n_D) dos solventes de extração foram medidos utilizando um refratômetro Atago RX-9000 α refratômetro. Todas as medições foram efetuadas à pressão atmosférica a 25°C.

3.2.1.6. Condutividade

A condutividade (σ) dos solventes de extração foi medida utilizando um medidor de bancada Thermo Scientific (Orion Versa Star Pro). Todas as medições foram efetuadas à pressão atmosférica a 25 °C.

3.2.2. Extração de compostos bioativos de fontes naturais

A lavanda (*Lavandula angustifolia*), o tomilho (*Thymus vulgaris*), o eucalipto (*Corymbia citriodora*), a cortiça (*Quercus suber L.*) e o cacau (*Theobroma cacao*) foram as fontes naturais neste estudo. As amostras foram inicialmente moídas num pó fino utilizando um moinho de café (KUNFT KCG5414). A extração dos compostos bioativos de todas as fontes naturais em pó foi efetuada utilizando diferentes solventes: duas misturas de etanol:água (50/50 e 30/70) (HE 1 e HE 2) e três solventes eutéticos (SE 1, SE 2 e SE 3) (**Tabela 1**- Materiais).

O glicerol é frequentemente utilizado como umectante em cosméticos, além de ser amplamente utilizado como excipiente em formulações farmacêuticas. A utilização de solventes eutéticos à base de glicerol resulta em extratos ricos em compostos fenólicos (Lee et al., 2023).

A extração foi realizada de acordo com dois procedimentos diferentes: com o auxílio de um sistema de pás (Heidolph), durante 30 e 90 minutos, e de uma misturadora planetária, durante 90 minutos (THINKY ARE-250) (**Figura 19 e 20**).

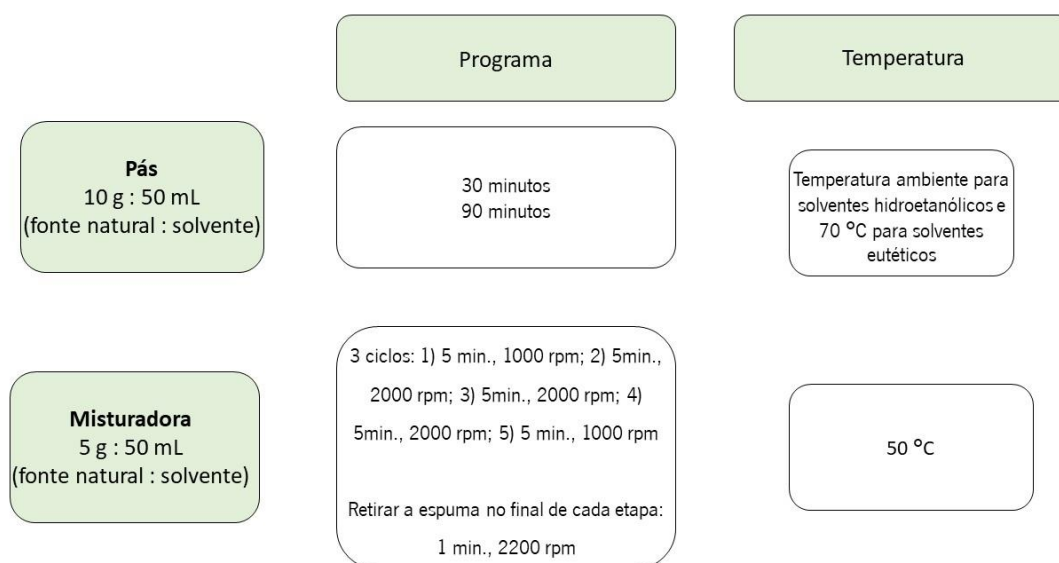


Figura 19. Condições utilizadas nos diferentes métodos de extração.



Figura 20. Equipamento utilizado para as extrações: pás (esquerda) e misturadora planetária (direita).

O procedimento iniciou-se com a colocação das fontes naturais (10 g no caso das pás e 5g no caso da misturadora planetária) com o solvente (50 mL) nos frascos destinados a cada equipamento utilizado para as extrações, tendo os programas durações diferentes, no caso das pás a duração foi de 30 minutos e 90 minutos e no caso da misturadora planetária foi de 90 minutos. De seguida ocorreu a remoção, seguido da filtração do material. No caso das extrações que envolveram misturas hidroetanólicas, o líquido filtrado foi transferido para um evaporador rotativo (Heidolph) e concentrado a 40 °C. Após a concentração, as amostras foram liofilizadas para eliminar a água e, em seguida, submetidas à caracterização. No caso de extrações com solventes eutéticos, o líquido filtrado foi preservado, liofilizado e posteriormente caracterizado. O sólido resultante foi recolhido, seco numa estufa e pesado para posteriormente se efetuar o cálculo do rendimento de extração. Os rendimentos de extração (g extrato/g material de partida) foram calculados de acordo com a **Equação (2)**:

$$\text{Rendimento de extração} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \quad (2)$$

Em que P_1 é o peso inicial da amostra em pó, em gramas; P_2 é o peso no final do processo de extração em gramas.

3.2.3 Caracterização dos extratos

3.2.3.1 Espetros UV-Visível dos extratos das diferentes fontes naturais

Colocou-se num eppendorf 5mg de extrato com 1mL dos solventes hidroetanólicos 50 EtOH:50 H₂O e 20 EtOH:80 H₂O e agitou-se num vortex.. Posteriormente, pipetou-se (em triplicado) para a placa de quartzo e, por fim, traçou-se o espetro respeitando as seguintes condições, varrimento entre 230 - 750nm e com intervalos de 5 nm. Esquema ilustrativo do procedimento presente na **figura 21**.



Figura 21. Esquema ilustrativo do procedimento para traçar os espectros UV-vis (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.2 Determinação do teor em fenólicos dos extratos

O teor de fenólicos totais dos extratos foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, tal como descrito por Singleton & Rossi (Singleton & Rossi, 1965)(**Figura 22**). Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a atingir concentrações de 10 mg/mL para os extratos obtidos por extração hidroetanólica e 100 mg/mL para os extratos obtidos por extração com solventes eutéticos. Numa microplaca de 96 poços, 2 µL de amostra foram misturados com 10 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 120 µL de água destilada. Após a mistura, foram subsequentemente adicionados à mistura 40 µL de solução aquosa de carbonato de sódio a 15% (Na₂CO₃) e 28 µL de água destilada. A microplaca foi mantida no escuro durante 2 horas à temperatura ambiente, após o que a absorvância foi medida a 750 nm (leitor de microplacas BioTek Synergy H1), tomando o DMSO, reagente de Folin, água destilada e o carbonato de sódio como branco, o controlo apresenta todos os componentes, mas em vez do extrato coloca-se DMSO. A curva de calibração foi obtida a partir de uma série de soluções-padrão de ácido gálico com as seguintes concentrações 0,0015, 0,015, 0,15, 0,45, 0,9, 1,5, 2,5 e 5 mg/mL. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de peso seco da amostra (mg/g). Todas as determinações foram efetuadas em duplicado. O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando a **equação (3)**:

$$C = C_1 \times \frac{V}{m} \quad (3)$$

Em que C₁ é a concentração de ácido gálico estabelecida a partir da curva de calibração em mg/mL; V é o volume do extrato em mL; m é a massa do extrato da planta em gramas.

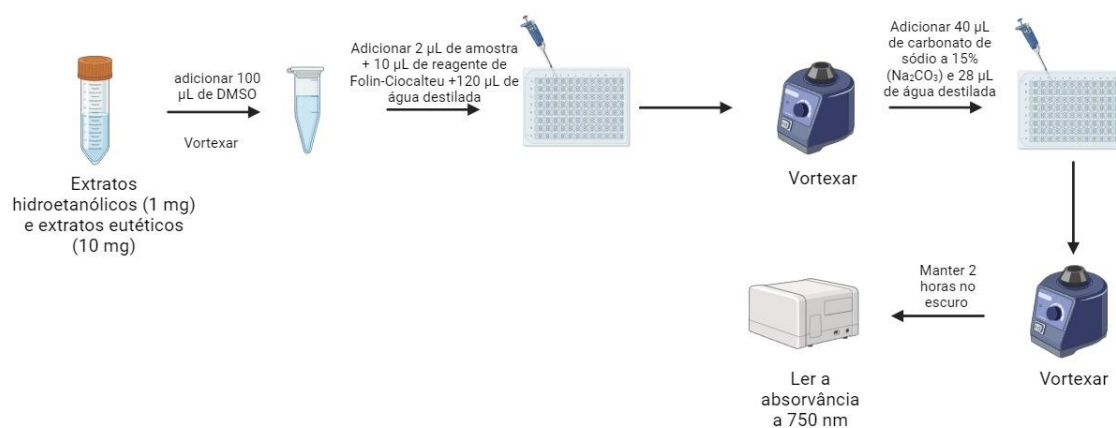


Figura 22. Esquema do procedimento usado para a determinação do teor de fenólico total segundo o ensaio de Folin-Ciocalteu (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.3 Determinação do teor de flavonoides total dos extratos

O teor em flavonóides total dos extratos foi determinado utilizando o ensaio de cloreto de alumínio, tal como descrito por Zhishen et al. (Zhishen et al., 1999) (**Figura 23**). Os extratos foram dissolvidos em DMSO para obter concentrações de 10 mg/mL para os extratos obtidos por extração hidroetanólica e 100 mg/mL para os extratos obtidos por extração com solventes eutéticos. Numa microplaca de 96 poços, 17,5 µL de amostra foram misturados com 140 µL de água destilada e 5,25 µL de solução aquosa de nitrito de sódio a 10% (NaNO₂). Após 5 minutos, foram adicionados à mistura 5,25 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 20% (AlCl₃), 70 µL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1M (NaOH) e 112 µL de água destilada. A absorvância foi medida a 510 nm (leitor de microplacas BioTek Synergy H1), tomando o DMSO, reagente de Folin, água destilada e o carbonato de sódio como branco, o controle apresenta todos os componentes, mas em vez do extrato coloca-se DMSO. A curva de calibração foi obtida a partir de uma série de soluções-padrão de quercetina com as seguintes concentrações 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 mg/mL. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (EQ) por grama de peso seco da amostra (mg/g). Todas as determinações foram efetuadas em duplicado. O teor de flavonóides total foi determinado utilizando a **equação (3)**.

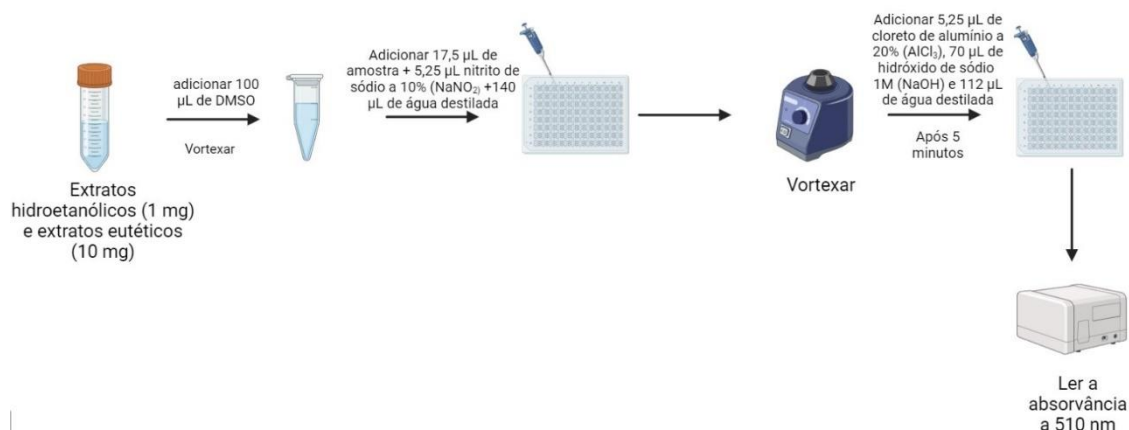


Figura 23. Esquema da determinação do teor de flavonóides total após o ensaio com cloreto de alumínio (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.4. Determinação da atividade antioxidante dos extratos

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando três métodos diferentes: atividade de eliminação do radical DPPH, atividade de eliminação do radical ABTS e ensaio FRAP.

3.2.3.4.1 Ensaio de atividade de eliminação do radical DPPH

A atividade antioxidante avaliada pelo ensaio DPPH seguiu o método descrito por Brand-Williams et al. (Brand-Williams et al., 1995) (**Figura 24**). A solução de DPPH (200 µM, etanol 99,5%) foi preparada diariamente e armazenada a 4 °C no escuro quando não utilizada entre as análises. Com exceção do extrato de eucalipto, que foi dissolvido em etanol a 99,5% por ser insolúvel em água, os extratos foram dissolvidos em água para obter as seguintes concentrações: 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 e 0,5 mg/mL. Numa microplaca de 96 poços, 10 µL de amostra foram misturados com 140 µL de solução de DPPH. A absorbância foi monitorizada continuamente durante 1 hora a 515 nm (leitor de microplacas BioTek Synergy H1). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi utilizado como padrão para efetuar a curva de calibração da redução do DPPH. Todas as determinações foram efetuadas em triplicado. A percentagem de DPPH reduzido em estado estacionário (DPPH_r) foi calculada de acordo com a **equação (4)**:

$$\% \text{ DPPH}_r = \frac{(A_i - A_r)}{A_i} \times 100 \quad (4)$$

Em que Ar é a absorbância registada no estado estacionário; Ai é a absorbância inicial registada no

tempo zero.

A EC_{50} foi obtida a partir da percentagem de redução da curva DPPH e representa a concentração necessária para reduzir a descoloração DPPH em 50%. A atividade antioxidante dos extratos foi expressa em equivalentes Trolox (ET) por 1 g de amostra de peso seco (mg ET/g extrato), de acordo com a **equação (5)**:

$$ET = \frac{EC_{50} \text{ Trolox}}{EC_{50} \text{ extrato}} \quad (5)$$

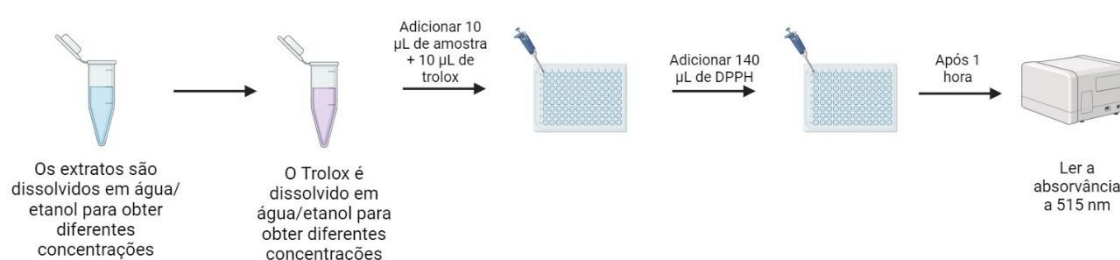


Figura 24. Esquema da determinação da atividade antioxidante após o ensaio de atividade de eliminação do radical DPPH (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.4.2. Ensaio de atividade de eliminação do radical ABTS

A atividade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS seguiu o método descrito por Re et al. (Re et al., 1999)(**Figura 25**). A solução de radical ABTS foi preparada misturando 5 mL de solução de ABTS 7,4 mM com 88 µL de solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) 2,6 mM e deixando-os reagir durante 16 h à temperatura ambiente no escuro. A mistura $ABTS^+$ foi então diluída com a quantidade de etanol a 99,5% necessária para atingir uma absorvância de $0,7 \pm 0,1$ a 734 nm. Com exceção do extrato de eucalipto, que foi dissolvido em etanol a 99,5% por ser insolúvel em água, os extratos foram dissolvidos em água para obter as seguintes concentrações: 0,0005, 0,002, 0,01, 0,03, 0,125, 0,5 mg/mL. Numa microplaca de 96 poços, 10 µL de amostra foram misturados com 140 µL de solução de radical ABTS. A microplaca foi mantida no escuro durante 6 minutos à temperatura ambiente, após o que a absorvância foi medida a 734 nm (leitor de microplacas BioTek Synergy H1), utilizando água ou etanol como branco. O Trolox foi utilizado como padrão. Todas as determinações foram efetuadas em duplicado. A percentagem de atividade antioxidante foi calculada de acordo com a **equação (6)**:

$$Atividade \text{ antioxidante } (\%) = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (6)$$

Onde $Abs_{controle}$ é a absorvância do radical ABTS + água/etanol; $Abs_{amostra}$ é a absorvância do radical ABTS + amostra/padrão.

A EC_{50} foi obtida a partir da curva da percentagem de atividade antioxidante e representa a concentração necessária para eliminar o ABTS em 50%. A atividade antioxidante dos extratos foi expressa em equivalentes de Trolox (ET) por 1 g de amostra de peso seco (mg ET/g extrato), como se mostra na **Equação (5)**.

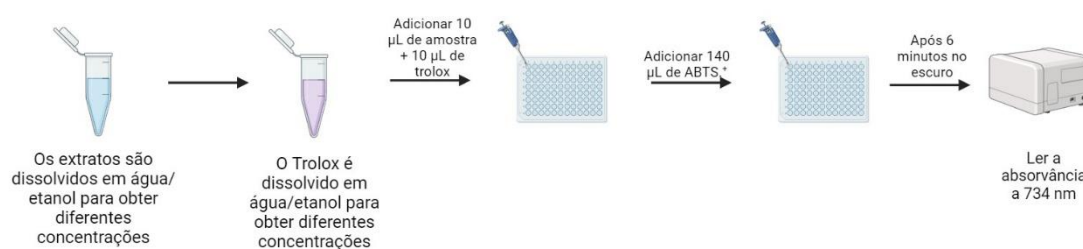


Figura 25. Esquema da determinação da atividade antioxidante após o ensaio de atividade de eliminação do radical ABTS (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.4.3 Ensaio do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante avaliada pelo ensaio FRAP seguiu o método descrito por Benzie e Strain (Benzie & Strain, 1996) (**Figura 26**). O reagente FRAP foi preparado misturando tampão acetato 300 mM (pH 3,6) com solução de TPTZ 10 mM em ácido clorídrico (HCl) 40 mM e solução aquosa de cloreto de ferro ($FeCl_3$) 20 mM, numa proporção de 10:1:1 (v/v/v). Com exceção do extrato de eucalipto, que foi dissolvido em etanol a 99,5% por ser insolúvel em água, os extratos foram dissolvidos em água para obter as seguintes concentrações: 0,5, 0,7, 0,8, 1, 1,3, 1,6, 2 mg/mL. Numa microplaca de 96 poços, 5 µL de amostra foram misturados com 145 µL de reagente FRAP. A microplaca foi incubada durante 10 minutos a 37 °C, posteriormente a absorvância foi medida a 593 nm (leitor de microplacas BioTek Synergy H1), utilizando água ou etanol como branco. O Trolox foi utilizado como padrão. Todas as determinações foram efetuadas em duplicado. A percentagem de atividade antioxidante foi calculada de acordo com a **Equação (7)**:

$$AA (\%) = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{controle})}{Abs_{amostra}} \times 100 \quad (7)$$

Em que $Abs_{amostra}$ é a absorvância do reagente FRAP + amostra/padrão; $Abs_{controle}$ é a absorvância do reagente FRAP + água/etanol.

A EC_{50} foi obtida a partir da curva de percentagem de atividade antioxidante e representa a

concentração necessária para reduzir o complexo Fe^{3+} -TPTZ em 50%. A atividade antioxidante dos extratos foi expressa em equivalentes de Trolox (ET) por 1 g de amostra de peso seco (mg ET/g de extrato), como indicado na **Equação (5)**.

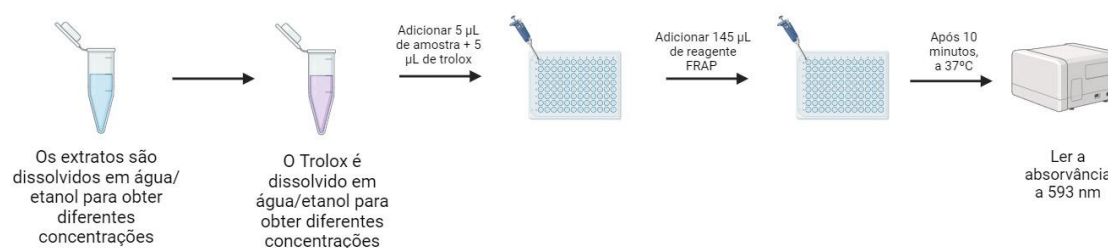


Figura 26. Esquema da determinação da atividade antioxidante após o ensaio do poder antioxidante redutor do ferro (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.5 Determinação do fator de proteção Solar (FPS)

O fator de proteção solar (FPS) dos extratos foi obtido utilizando um método *in vitro* simples, **figura 27**. O FPS mede a capacidade de um produto proteger a pele da radiação UVB e é definido como a razão entre a energia UV necessária para produzir uma dose eritemal mínima (MED) na pele protegida e na pele não protegida. A loção de proteção solar comercial Darphin Soleil SPF 50 (como padrão) e os extratos foram dissolvidos em etanol a 50% para obter uma concentração de 250 µg/mL. A absorvância foi medida entre 290-320 nm, com um intervalo de 5 nm (leitor de microplacas BioTek Synergy H1), utilizando etanol a 50% como branco. Todas as determinações foram efetuadas em duplicado. O valor do SPF foi calculado utilizando a seguinte **equação de Mansur (8)**:

$$SPF_{amostra} = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times A(\lambda) \quad (8)$$

em que o fator de correção $CF = 10$; $EE(\lambda)$ é o efeito eritemogénico da radiação de comprimento de onda λ ; $I(\lambda)$ é a intensidade da luz solar de comprimento de onda λ ; $A(\lambda)$ são os valores de absorvância espectrofotométrica no comprimento de onda λ . Os valores de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ são constantes e foram determinados por (Sayre et al., 1979) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ de cada um dos comprimentos de onda utilizados para determinar o FPS

Comprimento de onda (λ)	$EE(\lambda) \times I(\lambda)$
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,018

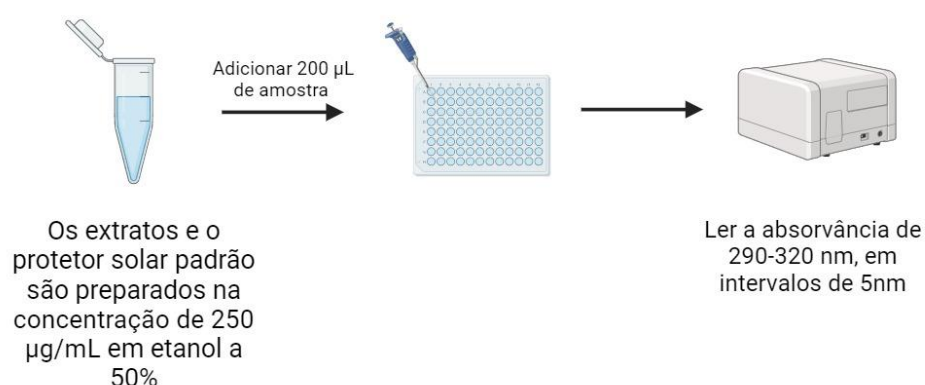


Figura 27. Esquema da determinação do fator de proteção solar (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.3.6 Inibição da tirosinase pelos diferentes extratos

A inibição da tirosinase pelos extratos foi efetuada seguindo o procedimento descrito por Momtaz et al. (Momtaz et al., 2008). Começou-se por fazer uma solução stock dos extratos em DMSO até uma concentração final de 10 mg/mL, e de seguida diluiu-se a solução stock para 1mg/mL em tampão fosfato de potássio 50mM (pH 6,5). Testou-se os extratos em concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 100µg/mL quanto ao seu efeito inibitório da tirosinase. Numa placa de 96 poços colocou-se 70µL de cada diluição de cada extrato com 30µL de tirosinase (1000U/mL, 0,34 mg/mL), em triplicado, e deixou-se a incubar à temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 110µL de solução 2mM de L-tirosina (0,36 mg/ mL) a cada poço, incubou-se à temperatura ambiente por 30 min e, por fim, leu-se a absorvância a 492nm, como podemos observar na **figura 28**.

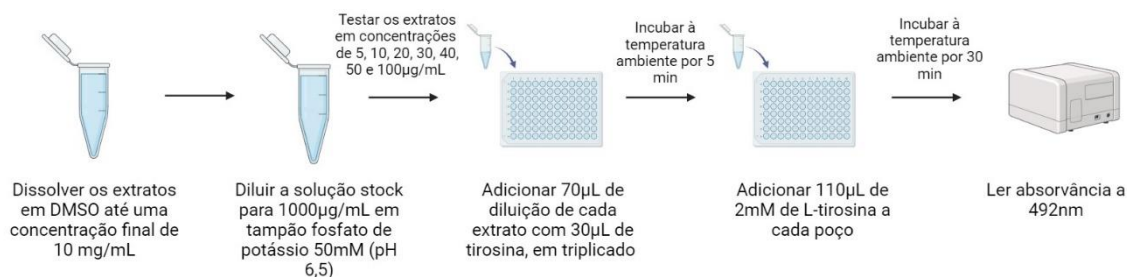


Figura 28. Esquema ilustrativo do procedimento da medição da inibição da tirosinase pelos extratos (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

No fim, procedeu-se ao cálculo da inibição da tirosinase através da **equação (9)**:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

A = Absorvância a 492nm sem amostra teste

B = Absorvância a 492nm com amostra teste

3.2.4 Produção de nanopartículas de quitosano com extratos encapsulados

Começou-se por preparar uma solução de ácido acético em água (1%). Para 5mL de volume final, adicionou-se 50µL de ácido acético. Depois pesou-se o quitosano (low molecular weight) de maneira que a sua concentração fosse 1%. Para 5mL, pesou-se 50mg de quitosano e juntou-se à solução de ácido acético 1% e deixou-se no agitador durante a noite a 25°C. Para 5mL, adicionou-se 8µL de Tween 80 e juntou-se à solução de quitosano durante 2h a 45°C. Posteriormente colocou-se 50 uL do extrato eutético. Para ocorrer o *crosslinking* do polímero, procedeu-se ao método de gelificação iónica, a solução de tripolifosfato (TPP) (0.4% w/v) foi preparada, adicionando 20mg em 5mL de água. Depois, adicionou-se 5mL de solução TPP aos 5mL de solução de quitosano, no agitador a 750 rpm durante 40 min à temperatura ambiente. A seguir, centrifugou-se a 6330rpm (4°C) por 30min e depois lavou-se com água desionizada. Repetiu-se o processo pelo menos duas vezes. De seguida, os *pellets* foram dispersos em 10mL de água usando o sonicador durante 4min (2s sonicar 1s parar) num banho de gelo. Por fim, foram medidos o tamanho e a carga superficial (**Figura 29**).

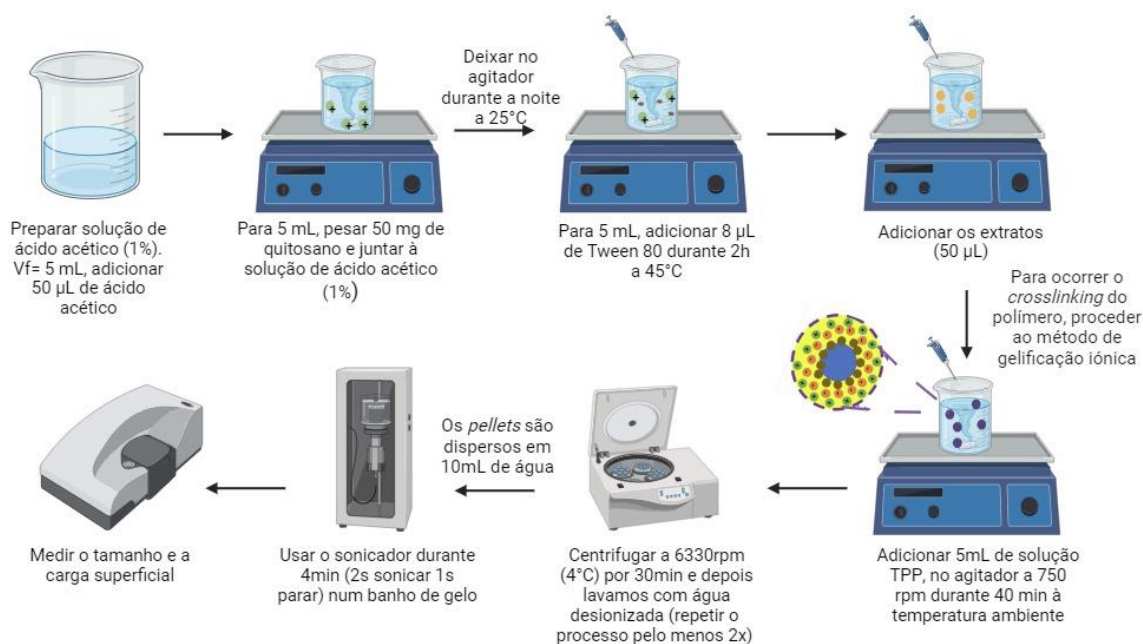


Figura 29. Produção de nanopartículas (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

3.2.4.1. Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho (nm), carga superficial (mV) e polidispersividade (PDI) usando o método DLS (dynamic light scattering) (Malvern Zeta-sizer ZS), e as análises morfológicas foram realizadas em Microscopia Eletrônica de Varrimento de Ultra-alta resolução (FEG-SEM), NOVA 200 Nano SEM, FEI Company. Para isso, as partículas foram instaladas em grades Cu-C TEM e as imagens foram obtidas com um Scanning Transmission Electron Detector (STEM) a uma tensão de aceleração de 15 kV.

3.2.5. Avaliação do perfil da liberação controlada dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano

No que diz respeito à avaliação da liberação controlada, inicialmente, colocou-se 10mL dos extratos (0,028g/ mL) encapsulados nas nanopartículas de quitosano dentro de uma membrana de 14 kDa. Em falcons de 50mL, onde se colocou posteriormente a membrana, colocou-se 20mL de solução hidroetanólica EtOH:H₂O (20:80). Pipetou-se 400 µL da solução hidroetanólica contendo extratos libertados em diferentes períodos de tempo (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h e 72h) durante 72h, para a placa de quartzo, traçou-se o espectro UV-Vis dos 230 aos 700 nm e voltou-se a repor os 400 µL

dentro do falcon (**Figura 30**). A percentagem de libertação dos extratos foi calculada por substituição dos valores de absorvância nas respetivas curvas de calibração de cada extrato, previamente estabelecidas.

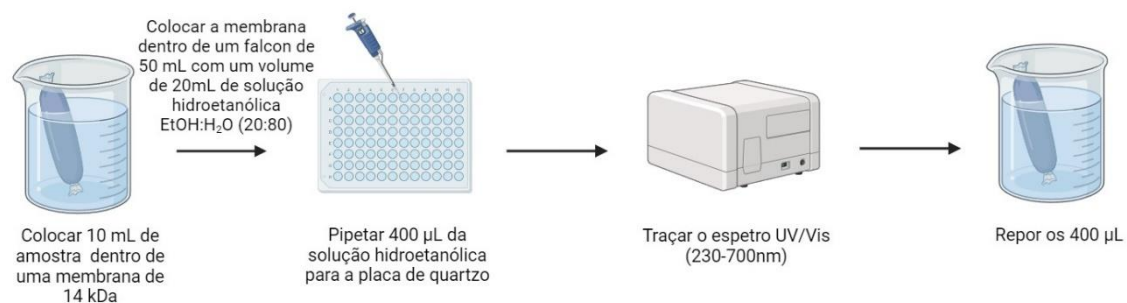


Figura 30. Esquema ilustrativo da libertação controlada dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano (as imagens foram obtidas através do software BioRender).

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos solventes

Nesta primeira secção serão apresentados os resultados da caracterização dos diferentes solventes, hidroetanólicos e eutéticos, utilizados ao longo do presente trabalho (**Tabela 4**).

Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos solventes de extração: polaridade (E_{NR}), pH, viscosidade (η), densidade (ρ), índice de refração (n) e condutividade (σ)

Solvente	E_{NR} (kcal/mol)	pH	η (Pa s)	ρ (g/cm ³)	n	σ (μ S/cm)
HE 1	49,984	5,815	-	0,93	1,35	2,832
HE 2	49,637	6,263	-	0,96	1,34	1,386
SE 1	48,542	0,900	1,01	1,24	1,46	0,900
SE 2	74,550	1,480	1,17	1,23	1,46	0,323
SE 3	47,731	0,150	18,19	1,44	1,48	2,777

As propriedades físico-químicas dos solventes de extração são aspetos importantes e a ter em conta visto que alteram os resultados consoante as suas características e valores.

A polaridade (E_{NR}) refere-se à aptidão de um solvente para dissolver substâncias químicas com base nas suas características de polaridade. A uniformidade dos resultados observados para os HE e SE (47,731-49,984 kcal/mol), com a exceção do SE 2 que apresenta um valor de 0,99 kcal/mol, sugere que a polaridade pode não ser o fator decisivo na extração de compostos bioativos, contudo os valores obtidos pelas SE estão de acordo com a literatura que também ronda os 48,542-50,612 kcal/mol.

O pH apresenta valores semelhantes dentro das soluções HE (5,816-6,263) sendo este ácido e de igual modo semelhantes dentro das soluções SE (0,25-1,48) sendo também ácido, no caso mais ácido que do que o pH verificado nas soluções HE. O pH de diversas soluções eutéticas já foi estudado, sendo que o valor obtido para o SE 1 é igual ao que consta na literatura.

A viscosidade (η) de um solvente desempenha um papel crucial na dinâmica dos fluidos e é uma característica física que está relacionada com a resistência de um fluido ao movimento, quanto maior a viscosidade, mais lentamente o fluido se move. Na engenharia química, quando um solvente hidrofóbico apresenta uma viscosidade muito alta ou possui uma densidade próxima à da água, isso pode prejudicar a separação de fases e resultar em maior consumo de energia e, por isso, do ponto de vista da eficiência de processamento, a viscosidade deve ser o mais baixa possível, no caso, o SE 1 e SE 2, 1,01 Pa s e 1,17 Pa s respetivamente, apresentam-se melhores que o SE 3 que é 18,19 Pa s, visto que tem valores de viscosidade menores.

A densidade (ρ) é uma propriedade física fundamental que se refere à quantidade de massa contida

num certo volume. No contexto deste estudo, é importante notar que todos os SE testados apresentam densidades superiores à da água, que é de aproximadamente 1 g/mL, visto que as densidades das misturas eutéticas variam entre 1,23 e 1,44 g/mL, com SE 2 sendo a menos densa e SE 3 a mais densa. Na literatura onde consta a densidade de alguns SE os valores da densidade são semelhantes variando entre 1,24-1,39 g /cm³.

O índice de refração (n) é uma característica física muito importante para a caracterização de fluidos. Representa a relação entre a velocidade da luz no vácuo para um meio específico. Embora este parâmetro não seja muito mencionado na literatura no contexto de misturas eutéticas, ele é geralmente usado para avaliar a pureza de um líquido ou determinar a concentração de determinada substância numa mistura. De acordo com a literatura, o índice de refração pode variar dependendo da proporção da mistura eutética e da temperatura na qual a medição é efetuada, encontrando os SE entre 1,438 e 1,467. No presente estudo, é observado que todos os SE possuem índices de refração superiores, 1,46-1,48, ao da água ($n = 1,333$) a uma temperatura de 25 °C.

A condutividade elétrica (σ) é uma medida que indica a facilidade com que uma carga elétrica flui através de um material específico. Quando um material possui alta condutividade, indica que oferece pouca resistência ao fluxo de corrente elétrica, possibilitando a transferência da carga elétrica com um mínimo de perda de energia, o que se verifica nos resultados obtidos, sendo que os HE apresentam uma condutividade de 1,386-2,832 $\mu\text{S/cm}$ superior à apresentada nos SE, de 0,323-2,777 $\mu\text{S/cm}$, sendo que o valor de 2,777 $\mu\text{S/cm}$ pertencente ao SE 3 é surpreendente visto que é o SE que apresenta maior viscosidade logo menor condutividade elétrica (Freitas et al., 2022).

4.2 Extração de compostos bioativos de fontes naturais

A extração de compostos bioativos de fontes naturais foi realizada com cinco solventes diferentes (HE 1, HE 2, SE 1, SE 2 e SE 3), e dois métodos de extração (pás e misturadora planetária). O rendimento de extração é um parâmetro essencial para estabelecer a eficácia de um processo de extração.

Assim, os resultados do rendimento de extração obtidos após processamento de todas as fontes naturais com a influência do método de extração estão representados na **Figura 31**.

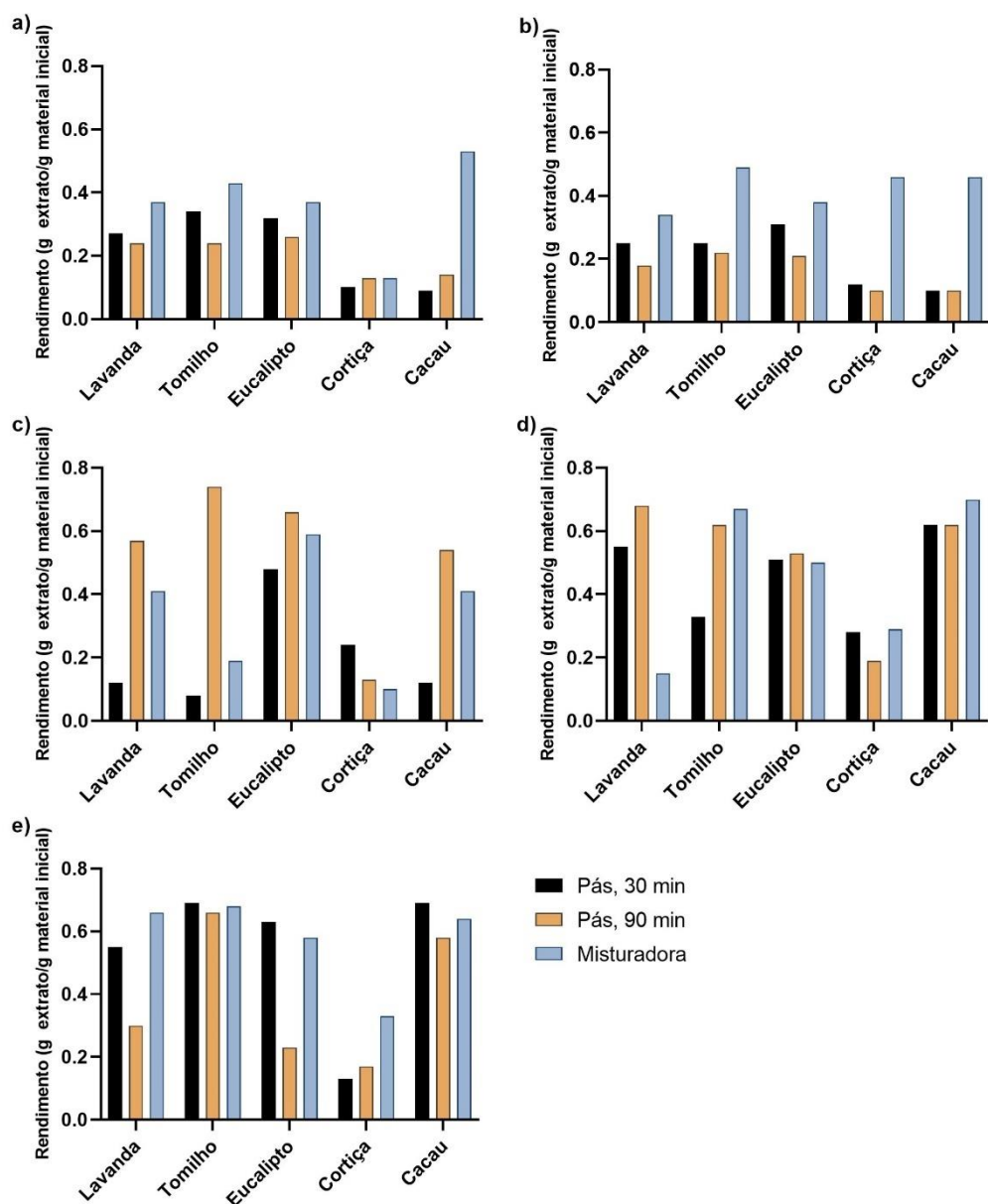


Figura 31. Rendimentos obtidos após extração da lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau com diferentes solventes: extração hidroetanólica a) HE 1 e b) HE 2 e extração com solventes eutéticos c) SE 1 d) SE 2 e) SE 3.

Os resultados dos rendimentos obtidos após a extração dos extratos com os diferentes solventes, apresentando os maiores rendimentos de cada solvente, encontram-se na **Tabela 5**, abaixo apresentada.

Tabela 5. Rendimentos obtidos após extração da lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau com diferentes solventes: extração hidroetanólica a) HE 1 e b) HE 2 e extração com solventes eutéticos c) SE 1 d) SE 2 e) SE 3, apresentando os maiores rendimentos de cada solvente

Rendimento (η) de extração (g de extrato/ g de material inicial)	
Extrato	Métodos e solventes
	Maior η de extração
Lavanda	0,68 (pás 90 min, SE2)
Tomilho	0,74 (pás 90 min, SE 1)
Eucalipto	0,66 (pás 90 min, SE 1)
Cortiça	0,46 (misturadora planetária, HE 2)
Cacau	0,70 (misturadora planetária, SE 2)

Em resumo, nas diversas condições, o extrato que apresenta maiores resultados em termos de rendimento de extração é o do tomilho (obtido com o SE 1 pás 90 min com o valor 0,74 g de extrato/g de material inicial o maior) e o que apresenta menores valores é a cortiça (obtido com o HE 1 pás 30 min, com o HE 2 pás 90 min, e com o SE 1 misturadora, obtiveram os três o valor 0,10 g de extrato/g de material inicial o menor). Ao nível de método de extração, para todos os extratos, com as soluções hidroetanólicas o melhor foi a misturadora, seguida das pás 30 minutos e pás 90 minutos. Com os solventes eutéticos as pás 90 minutos sobressaíram, sendo que posteriormente foi a misturadora e as pás 30 minutos.

Um fator crítico na extração "verde" diz respeito à escolha do solvente, que está diretamente ligado aos rendimentos e às composições dos extratos resultantes. Nesse contexto, está a ser desenvolvida muita investigação, com a intenção de desenvolver abordagens ecológicas e amigas do ambiente para eliminar ou diminuir a necessidade de produtos químicos tóxicos, e cada vez mais há uma procura por extrações sustentáveis de compostos bioativos de diversas fontes naturais empregando solventes eutéticos profundos. Espera-se que estes solventes tenham um maior potencial de extração em comparação com os solventes orgânicos usados para o mesmo fim, o que se verifica nos presentes resultados obtidos. Os dados mencionados na literatura indicam que o rendimento de extração de compostos naturais aumenta quando o processo é prolongado utilizando as misturas eutéticas como solvente, em vez de água ou solventes agressivos, como o dioxano. O processo é influenciado por diversas parâmetros físico-químicos, como pH, polaridade, densidade e o método de extração (Freitas et al., 2022). Através da análise dos resultados obtidos no presente estudo é possível verificar essa premissa, os rendimentos alcançados com os solventes eutéticos foram superiores face aos rendimentos

apresentados pelas soluções hidroetanólicas, apresentando mais uma vantagem na sua utilização.

A diversidade de extratos que podem ser obtidos com a utilização dos solventes eutéticos, além da ausência de toxicidade, baixo custo de produção, estabilidade química e térmica, não inflamabilidade, altamente biodegradável, facilidade de preparação, tornam estes solventes uma abordagem ecologicamente sustentável para os compostos de alto valor de diversas fontes naturais, além do mais, os constituintes naturais dos solventes eutéticos possibilitam o seu uso direto em extratos para aplicações alimentares, farmacêuticas e cosméticas (Dong et al., 2021; Freitas et al., 2022; Lee et al., 2023).

O tomilho têm sido uma das plantas de principal interesse das indústrias alimentares, cosméticas e farmacêuticas que manifestam interesse devido ao seu potencial como aditivos alimentares e nutracêuticos (Munekata et al., 2020), sendo que pelos resultados obtidos o tomilho é o que apresenta maior rendimento, o que significa que é um bom extrato para exploração em aplicações nutracêuticas (Santos et al., 2010).

4.3 Caracterização dos extratos

4.4.2 Espetros UV-Visível dos extratos naturais

O objetivo de traçar os espectros UV-VIS dos extratos utilizados foi inferir o comprimento de onda de absorção máxima para posterior quantificar da quantidade de extrato libertada das nanopartículas (4.6. Avaliação do perfil de libertação dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano). Os espectros UV-VIS traçados encontram-se nas **Figuras 32 a 36**.

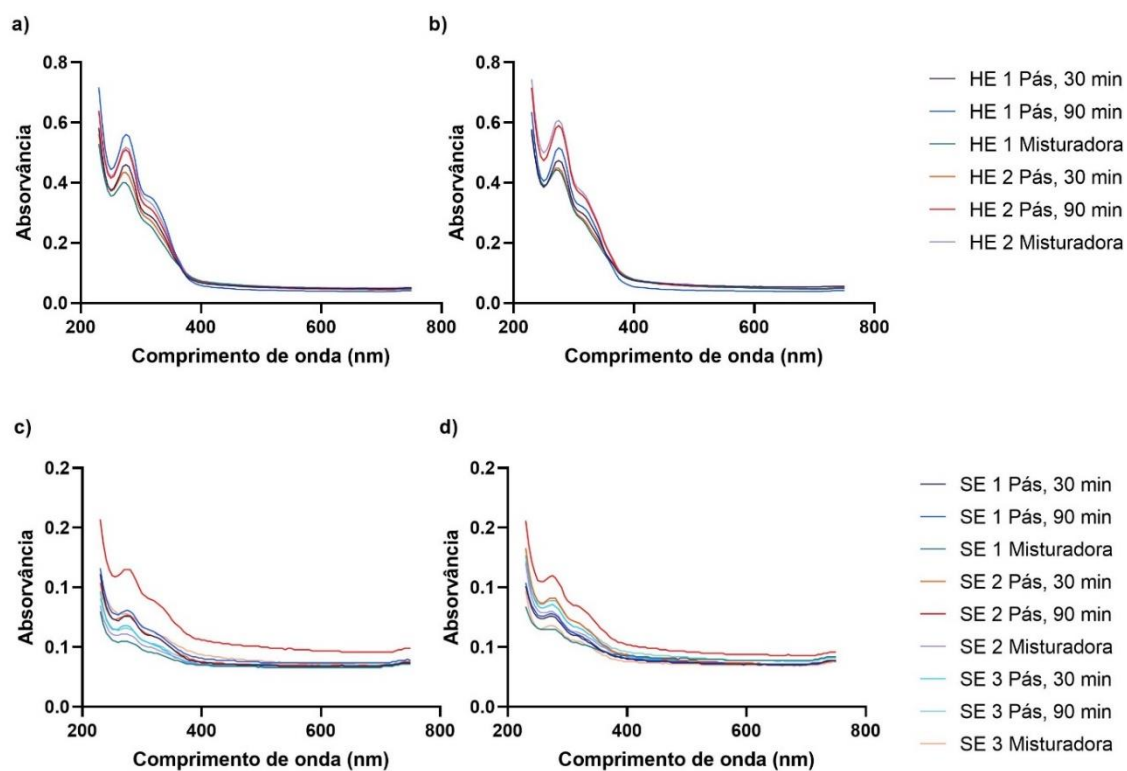


Figura 32. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Lavanda HE 1 (50 EtOH:50 H₂O); b) Lavanda HE 1 (20 EtOH:80 H₂O); c) Lavanda SE 2 (50 EtOH:50 H₂O); d) Lavanda SE 2 (20 EtOH:80 H₂O).

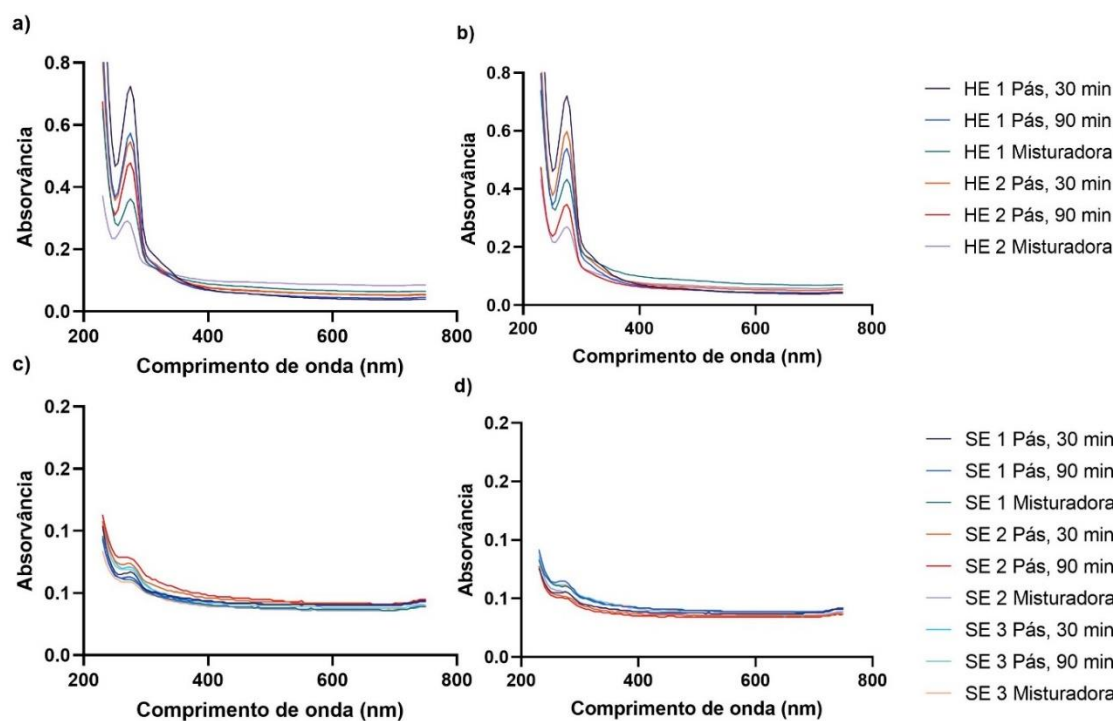


Figura 33. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Cacau HE 1 (50 EtOH:50 H₂O); b) Cacau HE 1 (20 EtOH:80 H₂O); c) Cacau SE 2 (50 EtOH:50 H₂O); d) Cacau SE 2 (20 EtOH:80 H₂O).

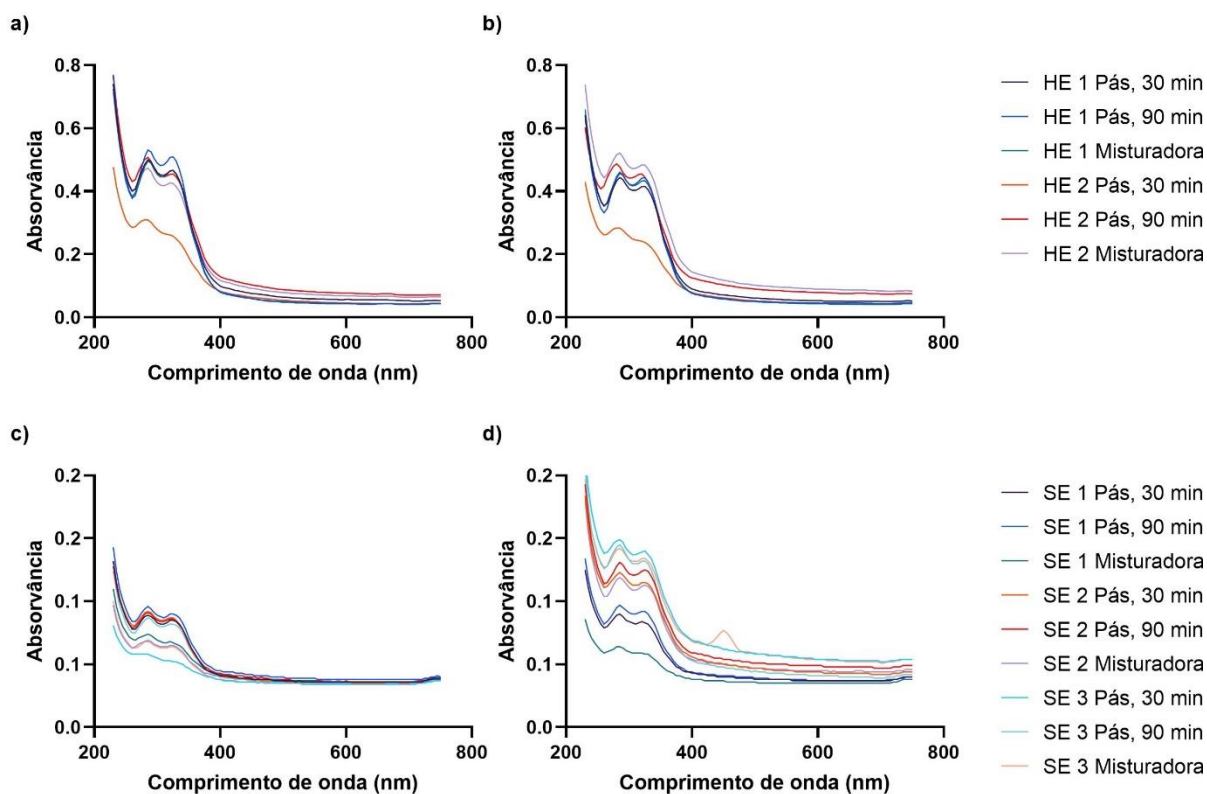


Figura 34. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Tomilho HE 1 (50 EtOH:50 H₂O); b) Tomilho HE 1 (20 EtOH:80 H₂O); c) Tomilho SE 2 (50 EtOH:50 H₂O); d) Tomilho SE 2 (20 EtOH:80 H₂O).

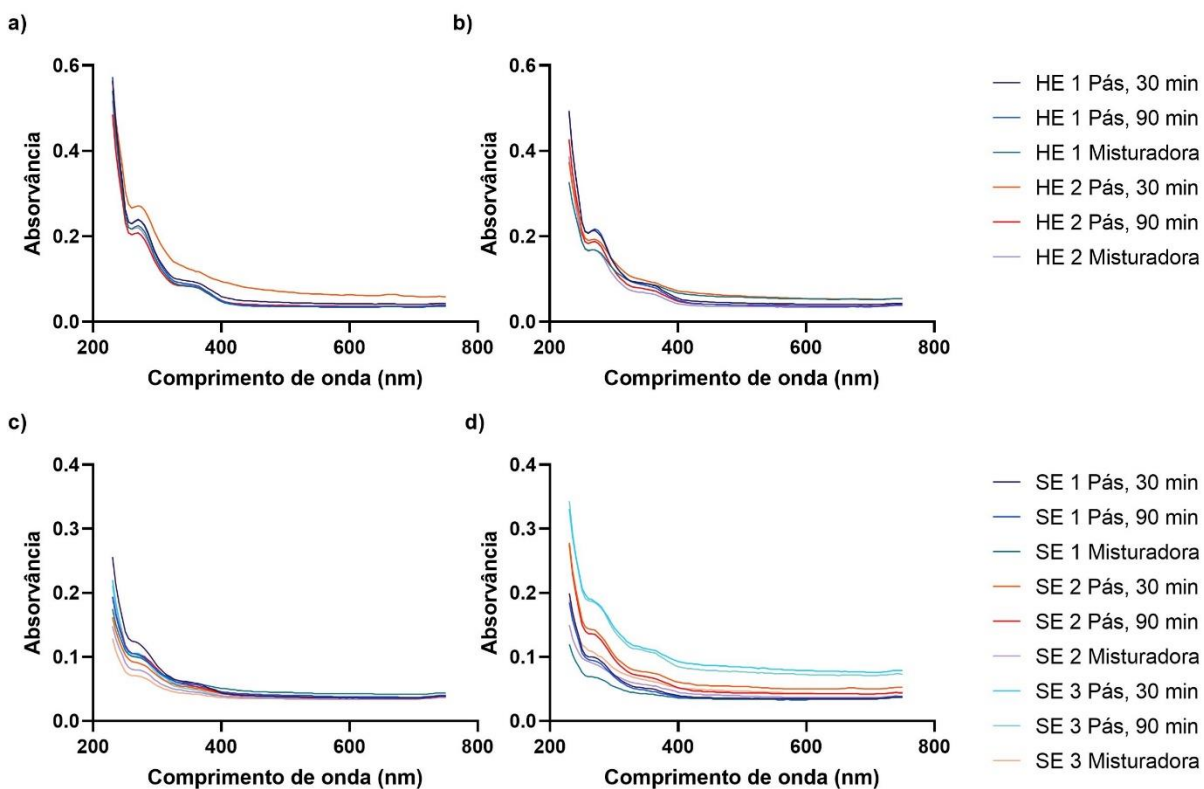


Figura 35. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Eucalipto HE 1 (50 EtOH:50 H₂O); b) Eucalipto HE 1 (20 EtOH:80 H₂O); c) Eucalipto SE 2 (50 EtOH:50 H₂O); d) Eucalipto SE 2 (20 EtOH:80 H₂O).

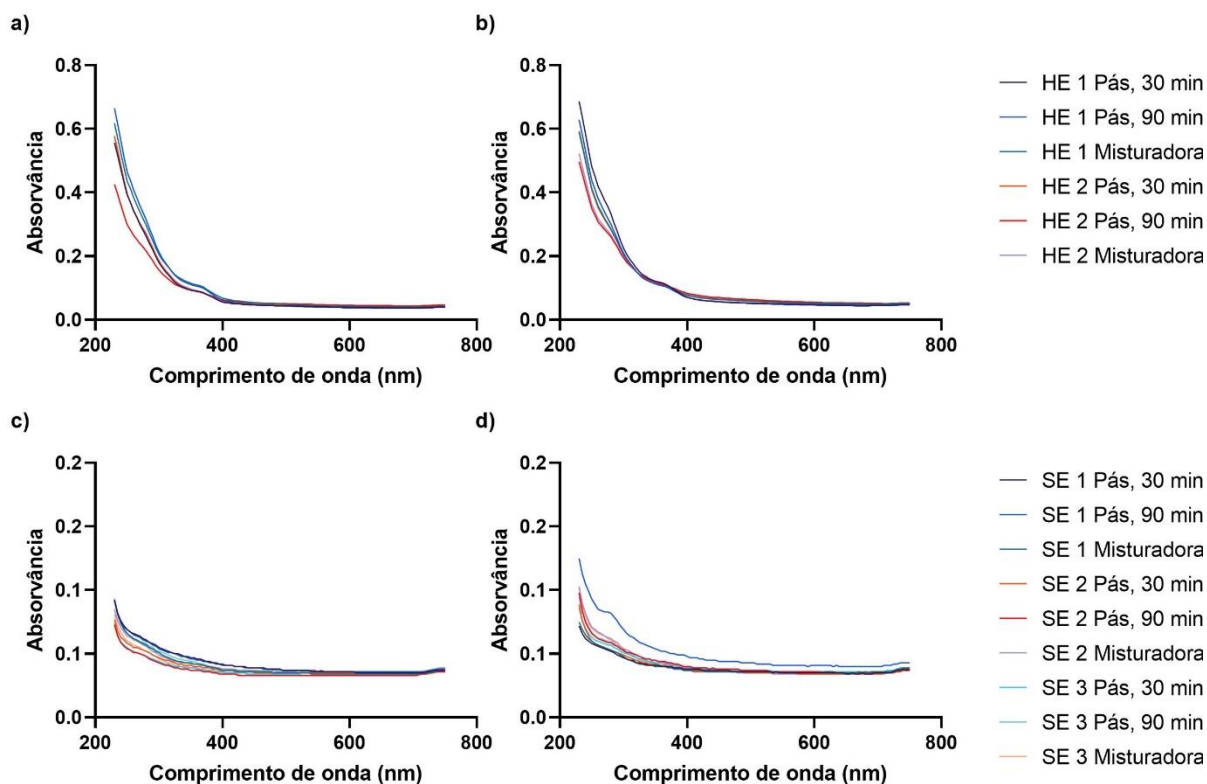


Figura 36. Espectros UV-VIS das amostras de extrato de a) Cortiça HE 1 (50 EtOH:50 H₂O); b) Cortiça HE 1 (20 EtOH:80 H₂O); c) Cortiça SE 2 (50 EtOH:50 H₂O); d) Cortiça SE 2 (20 EtOH:80 H₂O).

Em suma, através dos diferentes espectros UV-VIS traçados, é possível concluir que, o comprimento de onda máximo é 275 nm, exceto no extrato do tomilho que é 285 nm e do eucalipto que é 270 nm, com as exceções para as soluções com solventes eutéticos, SE 1 e SE 2, que é, respetivamente, 260 nm e 265 nm (**Tabela 6**).

Tabela 6. Valores de comprimento de onda máximo para os diversos extratos e solventes

Extratos	Solventes				
	HE 1	HE 2	SE 1	SE 2	SE 3
	Comprimento de onda máximo (nm)				
Lavanda	275	275	275	275	275
Tomilho	285	285	285	285	285
Eucalipto	270	270	260	265	270
Cortiça	275	275	275	275	275
Cacau	275	275	275	275	275

4.4.3. Determinação do teor fenólico total dos extratos

Posteriormente, foi também avaliada a influência dos métodos de extração e dos solventes na composição dos extratos. Os compostos fenólicos são de particular interesse devido à sua atividade antioxidante. A determinação do teor fenólico total dos extratos foi efetuada por análise colorimétrica utilizando o método de Folin- Ciocalteau, tal como descrito por Singleton & Rossi (Singleton & Rossi, 1965). O teor fenólico total foi determinado em todos os extratos estudados e os resultados são apresentados na **Figura 37**.

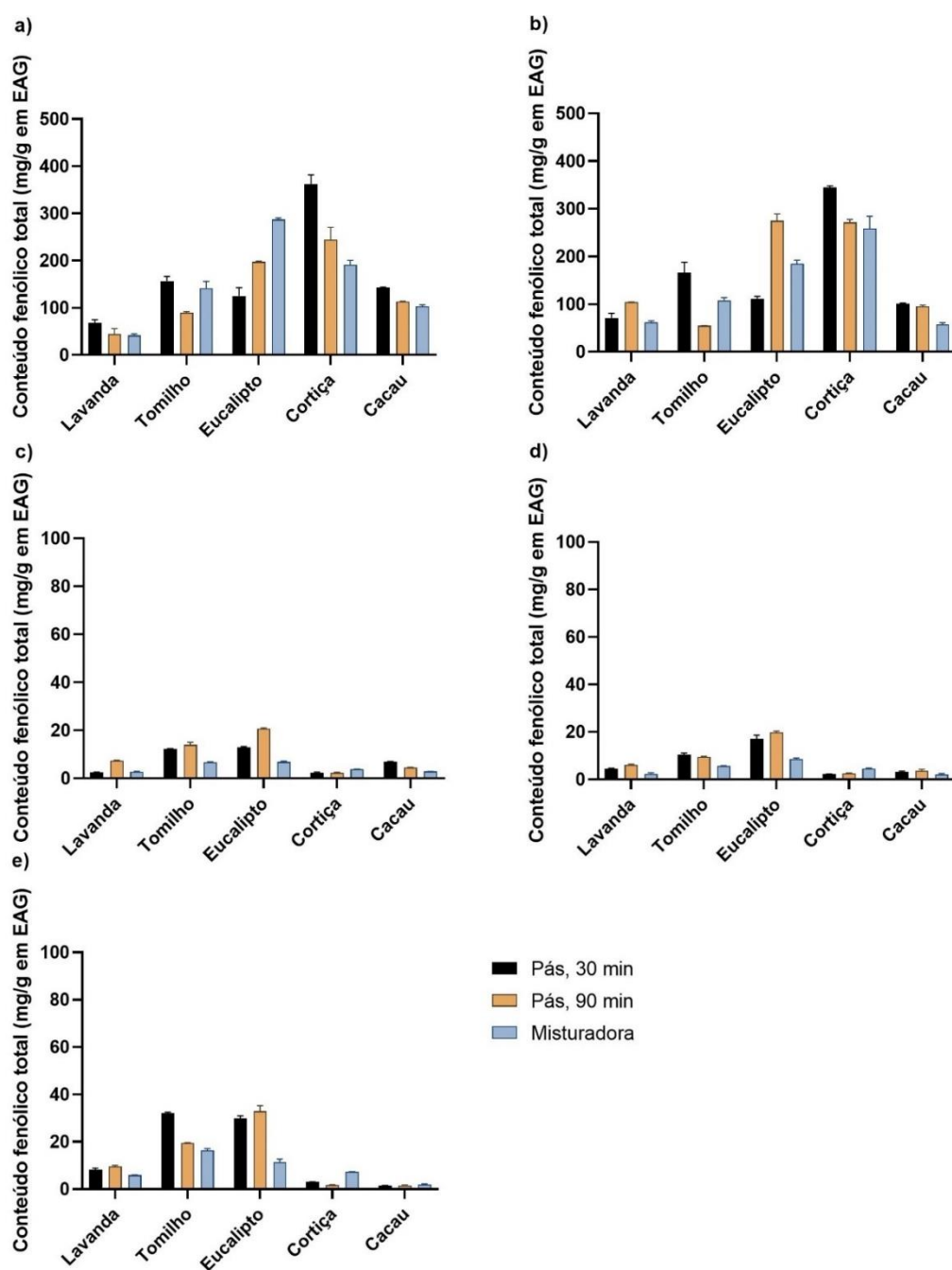


Figura 37. Conteúdo fenólico total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacao obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3. Os valores apresentados resultam da média de 2 ensaios.

O método para cálculo do teor fenólico foi feito em duplicado, para os cinco extratos já conhecidos, lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau, nos cinco solventes já mencionados ao longo do presente estudo. Os resultados obtidos, quanto ao maior teor fenólico, apresentam-se detalhadamente, de acordo com o método e solvente, na **Tabela 7**.

Tabela 7. Conteúdo fenólico total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3, apresentando o maior teor fenólico de acordo com o método e solvente

Teor fenólico total dos extratos (mg/g em EAG)	
Extratos	Métodos e solventes
	Maior teor fenólico
Lavanda	104,25 (pás 90 min, HE 2)
Tomilho	165,51 (pás 30 min, HE 2)
Eucalipto	286,75 (misturadora planetária, HE 1)
Cortiça	362,09 (pás 30 min, HE 1)
Cacau	142,31 (pás 30 min, HE 1)

Em conclusão, no que diz respeito aos extratos obtidos com solventes hidroetanólicos os extratos da lavanda extraídos com o HE 2 apresentam maior conteúdo em fenólicos em relação aos extraídos com o HE 1, o mesmo acontece no extrato da cortiça, exceto para o método das pás durante 30 minutos. Os restantes extratos obtidos com o HE 1 apresentam maior conteúdo fenólico em comparação com os extratos obtidos com o HE 2, contudo nos extratos do tomilho e do eucalipto apresentam exceção com o método das pás durante 90 minutos. No geral, os extratos obtidos com o método das pás apresentam maior conteúdo fenólico quando comparados com os extratos obtidos pelo método da misturadora planetária, exceto no extrato do eucalipto obtido com HE 1. No caso das soluções eutécticas, na generalidade os extratos obtidos com o SE 3 apresentam maior conteúdo fenólico do que os extratos obtidos com o SE 1 e obtidos com SE 2, sendo que os obtidos com o SE 2 apresentam os valores mais baixos. Em particular nos extratos da lavanda, tomilho e eucalipto estes apresentam maior conteúdo fenólico obtidos com o SE 3, seguido os obtidos com o SE 1 e, por fim, os obtidos com o SE 2, no extrato da cortiça apresentam maior conteúdo fenólico obtido com o SE 3, depois obtido com o SE 2 e, por último obtido com o SE 1, e no extrato do cacau é precisamente ao contrário, o maior conteúdo fenólico é obtido com o SE 1, depois obtido com o SE 2 e, por último, obtido com o SE 3. Os extratos obtidos pelo método das pás apresentam valores mais elevados de conteúdo fenólico face aos extratos obtidos pela misturadora planetária, em específico com o das pás 90 durante minutos. Comparando os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos com os extratos obtidos com os solventes eutécticos, os

primeiros apresentam conteúdo fenólico superior. Tendo em conta que este método é realizado em meio alcalino, com pH básico (10) e os eutéticos apresentam um pH ácido (entre 0,15 (SE 3) e 1,48 (SE 2)), essa pode ter sido a razão pela qual os gráficos correspondentes aos extratos obtidos com solventes eutéticos apresentam valores tão baixos, assim como pelo facto de ainda existir eutético nas amostras.

No que diz respeito aos extratos obtidos com solventes hidroetanólicos a cortiça demonstrou ser o melhor extrato, apesar do seu rendimento de extração ser baixo, contudo é coincidente com a literatura que apresenta a cortiça como contendo compostos bioativos, como ácidos fenólicos, terpenoides e taninos, que apresentam propriedades biológicas notáveis, abrangendo a ação antioxidante, anti-inflamatória e antienvelhecimento com potenciais aplicações nas áreas cosmética e farmacêutica (Freitas et al., 2022).

No caso dos extratos obtidos com solventes eutéticos, os que apresentam maior teor em fenólicos foram o extrato do tomilho e do eucalipto, que são também aqueles em que se obteve um maior rendimento de extração. As plantas mediterrâneas despertam o interesse de investigadores e profissionais de diversas áreas devido às suas propriedades benéficas, que incluem efeitos antivirais, anti-inflamatórios, cardiovasculares e antiobesidade. Grande parte desses benefícios à saúde está associada ao elevado teor de compostos bioativos, como polifenóis e carotenoides. Dentre as diversas ervas mediterrâneas, o tomilho destaca-se como uma escolha comum, graças ao seu aroma característico e outras propriedades, tais como atividades antimicrobianas, antissépticas e antioxidantes. Além disso, o tomilho é rico em polifenóis e outros compostos com atividade biológica relevante, apresentando altos valores, notadamente a ação antioxidante, o mesmo se confirmou pelos resultados obtidos no presente estudo (Munekata et al., 2020). Vale ressaltar que a gama de valores observados neste estudo está em consonância com as informações disponíveis na literatura científica, no que diz respeito ao tomilho HE os resultados variam dentro da faixa de 7,3 a 158–256 mg EAG/g de extrato (Munekata et al., 2020), e nos resultados obtidos no presente estudo variam de 54,98-156,78 mg EAG/g de extrato, encontrando-se de acordo com os valores mencionados na literatura. O eucalipto é uma fonte de compostos polifenólicos, incluindo taninos, lignanas, flavonoides e ácidos fenólicos. Esses são metabólitos secundários com propriedades químicas diversas que têm aplicações potenciais em vários setores. Por exemplo, os taninos são bioativos com propriedades antioxidantes devido à sua natureza fenólica, resistentes às suas estruturas químicas, tanto nos taninos condensados quanto nos hidrolisáveis. As propriedades antioxidantes desses compostos polifenólicos apresentam várias vantagens para a saúde, como a redução do risco de doenças cardiovasculares, virais, mutagénicas, bem como a minimização de doenças neurodegenerativas, cancros e inflamações (Andrew et al., 2020).

As espécies de eucalipto apresentam diferentes quantidades importantes de compostos fenólicos que conferem uma atividade antioxidante de seus extratos. Diversos compostos fenólicos como ácido elágico, rutina e quercetina, entre outros, apresentam alto potencial como boas fontes de fenólicos biologicamente ativos (Gullón et al., 2020).

O método de extração é essencial uma vez que este tem de ser o mais apropriado para recuperar os compostos fenólicos, o que ajudará a conseguir os rendimentos mais elevados (Alara et al., 2021), concluindo que, no geral, os extratos que apresentam maior rendimento de extração apresentam maior conteúdo fenólico como podemos verificar pelos resultados referente aos extratos do tomilho e eucalipto.

4.4.4 Determinação do teor de flavonoides total dos extratos

Os compostos flavonoides, assim como os compostos fenólicos também são de particular interesse devido à sua atividade antioxidante. A determinação do teor flavonoide total dos extratos foi determinada utilizando o ensaio de cloreto de alumínio, tal como descrito por Zhishen et al. (Zhishen et al., 1999). O teor flavonoide total foi determinado em todos os extratos estudados e os resultados são apresentados na **Figura 38**.

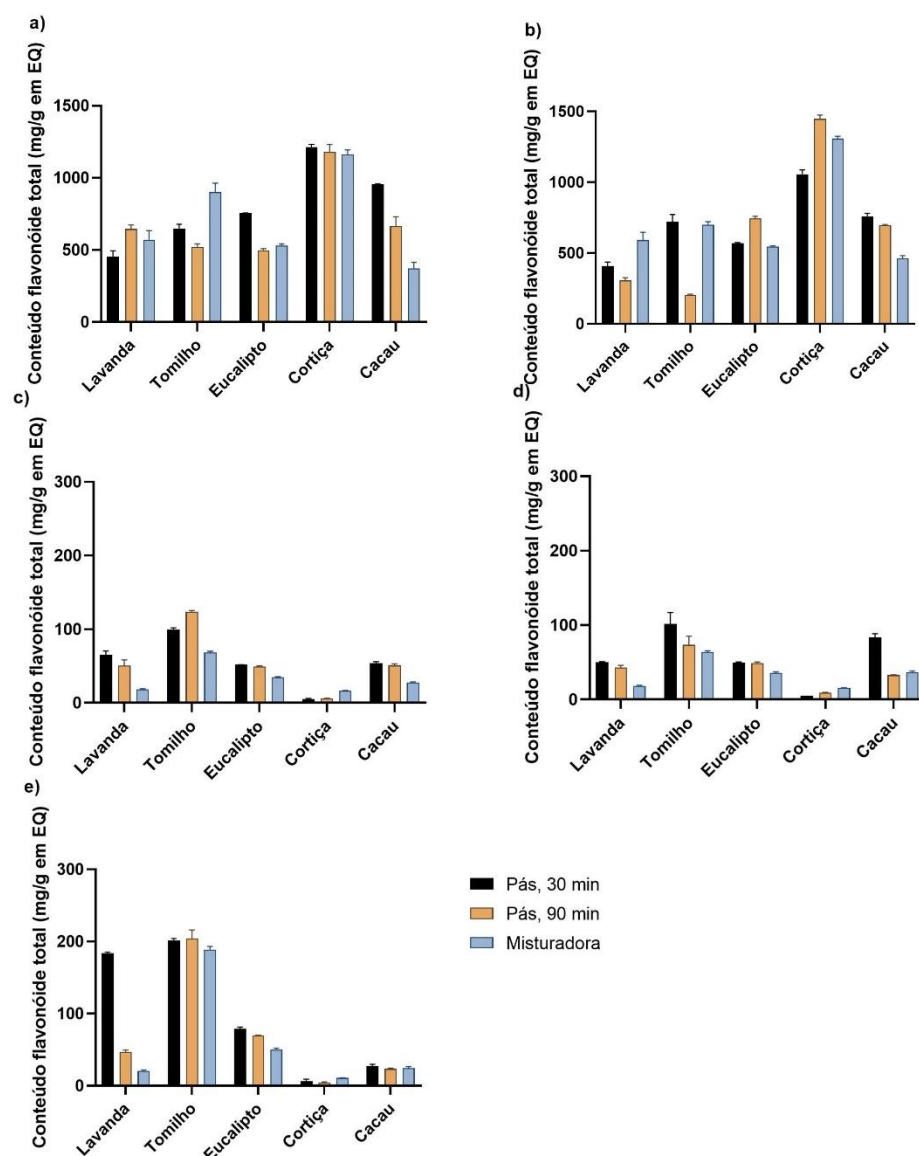


Figura 38. Conteúdo flavonoide total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3. Os valores apresentados resultam da média de 3 ensaios.

O método para cálculo do teor em flavonoides foi feito em triplicado, para os cinco extratos já conhecidos, lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau, nos cinco solventes já mencionados ao longo do presente estudo. Os resultados obtidos, quanto ao que apresenta maior teor flavonoide, apresentam-se detalhadamente, de acordo com o método e solvente, na **Tabela 8**.

Tabela 8. Conteúdo flavonoides total dos extratos de lavanda, tomilho, eucalipto, cortiça e cacau obtidos com os solventes: a) HE 1; b) HE 2; c) SE 1; d) SE 2; e) SE 3, apresentando o maior teor flavonoide, de acordo com o método e solvente

Teor flavonoides total dos extratos (mg/g em EQ)	
Extrato	Métodos e solventes
	Maior teor flavonoide
Lavanda	646,89 (pás 90 min, HE 1)
Tomilho	901,80 (misturadora planetária, HE 1)
Eucalipto	755,00 (pás 30 min, HE 1)
Cortiça	1448,16 (pás 90 min, HE 2)
Cacau	955,44 (pás 30 min, HE 1)

Em conclusão, no que diz respeito aos extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos, no extrato da lavanda obtido com o HE 2 apresenta maior conteúdo flavonoide do que o obtido com o HE 1, o mesmo acontece no extrato da cortiça, exceto com o método das pás durante 30 minutos. Nos restantes extratos obtidos com o HE 1 apresentam maior conteúdo flavonoide do que os obtidos com o HE 2, contudo nos extratos do tomilho e do eucalipto apresentam exceção com o método das pás durante 90 minutos. No geral, os extratos obtidos com o método das pás apresentam valores mais elevados de conteúdo flavonoide quando comparados com os obtidos pelo método da misturadora planetária, exceto no extrato do eucalipto com o HE 1. No caso dos extratos obtidos com solventes eutéticos, na generalidade obtidos com o SE 3 apresentam maior conteúdo flavonoide do que com os obtidos com SE 1 e os obtidos com o SE 2, sendo que os obtidos com o SE 2 apresentam os valores mais baixos. Em particular nos extratos da lavanda, tomilho e eucalipto os extratos que apresentam maior conteúdo flavonoide são os obtidos com o SE 3, seguido os obtidos com o SE 1 e, por fim, os obtidos com o SE 2, no extrato da cortiça os extratos que apresentam maior conteúdo flavonoide são os obtidos com o SE 3, depois os obtidos com o SE 2 e, por último, os obtidos com o SE 1, e no extrato do cacau é precisamente ao contrário, o maior conteúdo flavonoide é nos extratos obtidos com o SE 1, depois os obtidos com o SE 2 e, por último os obtidos com o SE 3. No que diz respeito aos extratos obtidos pelo método das pás apresentam valores mais elevados de conteúdo flavonoide face aos extratos obtidos pelo método da misturadora planetária, em específico com o das pás durante 90 minutos. Comparando os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos com os extratos obtidos com os solventes eutéticos, os obtidos com o solvente hidroetanólicos apresentam valores superiores de conteúdo flavonoide, porque como já foi mencionado anteriormente, este método é realizado em meio alcalino, com pH básico (10) e os eutéticos apresentam um pH ácido (entre 0,15 (SE 3) e 1,48 (SE 2)), essa pode ter sido a razão pela

qual os gráficos correspondentes aos extratos obtidos com solventes eutéticos apresentam valores tão baixos, assim como pelo facto de ainda existir eutético nas amostras.

Os flavonoides são uma das principais classes dos compostos fenólicos (Alara et al., 2021), consequentemente os extratos que apresentam maior rendimento de extração apresentam maior conteúdo flavonoide (Alara et al., 2021), podemos verificar através do extrato do tomilho.

Como era expectável, assim como no conteúdo fenólico, no conteúdo flavonoide no que diz respeito aos extratos obtidos com solventes hidroetanólicos a cortiça demonstrou ser o melhor extrato apesar de apresentar o rendimento de extração mais baixo, e no caso dos extratos obtidos com solventes eutéticos foi o extrato do tomilho, o que faz sentido tendo em conta que é o extrato que apresenta maior rendimento de extração. O tomilho apresenta propriedades notáveis, que incluem ação antimicrobiana, antisséptica e antioxidante. Este é uma fonte rica em compostos flavonoides e outros compostos com atividades biológicas significativas (Munekata et al., 2020).

No que diz respeito à cortiça, o interesse em compostos fenólicos naturais baseia-se na ampla gama de propriedades significativas que essa classe de compostos propostos, incluindo, entre outras, as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, capacidade de eliminação de radicais livres e ação antimicrobiana. O interesse por compostos fenólicos naturais em aplicações nutraceuticas e cosméticas tem crescido consideravelmente nos últimos anos devido às propriedades mencionadas, bem como à ausência de efeitos adversos comuns aos seus equivalentes sintéticos (Santos et al., 2010).

4.4.5 Determinação da atividade antioxidante dos extratos

O potencial da atividade antioxidante dos extratos é um parâmetro crucial quando se considera a sua aplicação em produtos cosméticos para ajudar a controlar a produção de ROS. Sendo que no presente trabalho a determinação da atividade antioxidante dos extratos foi efetuada através de três métodos, DDPH, ABTS e FRAP.

4.4.5.1 Ensaio de atividade de eliminação do radical DPPH

Através da utilização do radical DPPH estável é possível analisar a capacidade de eliminação de radicais livres (Liu et al., 2008; Roy et al., 2013; Yang et al., 2006).

O radical livre estável, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (**Figura 39**) é uma substância comumente utilizada como padrão para avaliar a atividade antioxidante em testes *in vitro*. O DPPH é composto por dois grupos

aromáticos que são dois grupos fenil ligados por um grupo N-N e um grupo trinitrobenzilo (NO_2). Este radical possui simetria C_1 , com um elétron desemparelhado, que está principalmente localizado no átomo central de nitrogênio. O DPPH é notório por ser um radical livre estável à temperatura ambiente. Este transforma-se numa molécula neutra estável quando receber um átomo de hidrogênio ou um elétron dos antioxidantes. O átomo de nitrogênio no DPPH, que possui um único elétron, sofre redução, formando a hidrazina correspondente, ao remover um átomo de hidrogênio dos antioxidantes. O radical DPPH· exibe uma cor notavelmente intensa e estável. Tendo em conta essas duas características do radical, a sua solução tem sido extremamente usada. Em solução etanólica, o radical livre apresenta uma coloração púrpura, e a sua absorbância é registada na faixa de comprimento de onda entre os 200 e 800 nm. Quando uma solução de DPPH é combinada com uma solução contendo uma substância capaz de ceder um átomo de hidrogênio, a cor violeta da solução desaparece, resultando na forma reduzida do radical DPPH·, chamada DPPH-H. A banda mais ampla é responsável pela cor violeta intensa da solução DPPH·. A formação de hidrazina (DPPH-H) leva ao desaparecimento da banda visível, resultando em uma mudança de cor da solução, que passa de violeta para amarelo pálido. Isso ocorre devido à redução do radical por meio da transferência de átomos de proteção de antioxidantes, que atuam como doadores de H. A intensidade da cor desta reação, designada na literatura por “teste DPPH”, pode ser registada por espectroscopia UV-vis. Este método é muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidantes de moléculas antioxidantes puras, principalmente extratos de ervas ou compostos fenólicos. O DPPH apresenta-se como um radical livre devido à deslocalização do elétron na totalidade da molécula, deste modo, o radical DPPH não dimeriza como outros radicais livres. A deslocalização de elétrões faz com que apareça uma cor púrpura e uma absorção máxima da solução de etanol em 517nm. À medida que os pares elétrões são retirados do radical DPPH a absorção é perdida (Anitha et al., 2021; Gulcin & Alwasel, 2023).

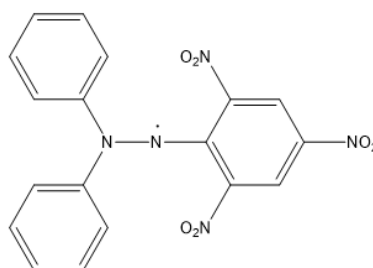


Figura 39. Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Maciel et al., 2018).

O ensaio DPPH, é um ensaio colorimétrico, e é amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias, é baseado em medições espectrofotométricas da capacidade que os antioxidantes apresentam para eliminar radicais DPPH. Uma das razões pelas quais se tornou tão

utilizado nos últimos tempos é devido ao facto de ser um método muito sensível e simples. Na figura 21, podemos observar o mecanismo onde o DPPH aceita hidrogénio de um antioxidante. Contudo, este tem algumas limitações notáveis, como a proporção desfavorável entre os radicais DPPH e os antioxidantes, além da interferência de pigmentos presentes no meio, que podem afetar as medições de absorbância. Para superar essas limitações, foi desenvolvido um ensaio DPPH modificado que introduz um novo conceito chamado IC 100. Esse conceito se refere à quantidade de radical DPPH necessária para oxidar completamente todos os antioxidantes presentes no meio reacional. O ensaio DPPH modificado aborda eficazmente a subestimação da atividade antioxidante observada no procedimento DPPH original, que ocorre devido à diminuição na proporção entre os radicais DPPH e os antioxidantes testados (**Figura 40**). Isso faz com que o ensaio DPPH modificado seja uma abordagem mais precisa para avaliar a capacidade antioxidante das substâncias em estudo (Gulcin & Alwasel, 2023; Yeo & Shahidi, 2019).

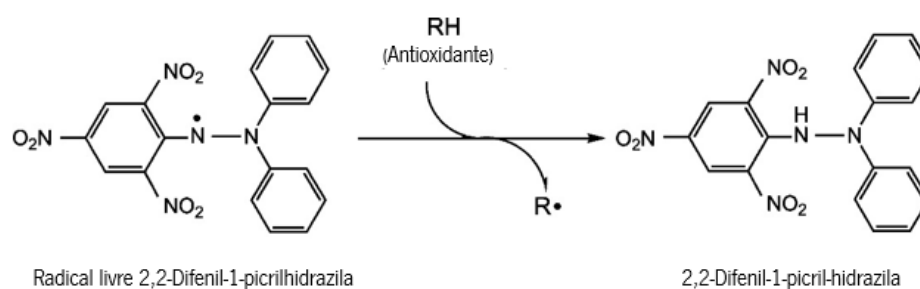


Figura 40. Reação entre DPPH • e antioxidante para formar DPPH (Gulcin & Alwasel, 2023).

Através da realização do ensaio DDPH obteve-se os seguintes resultados presentes na **Figura 41**.

O ensaio de DPPH, como já foi mencionado anteriormente, permite determinar a atividade antioxidante. No caso quanto menor for o valor de EC₅₀, maior é o seu poder antioxidante.

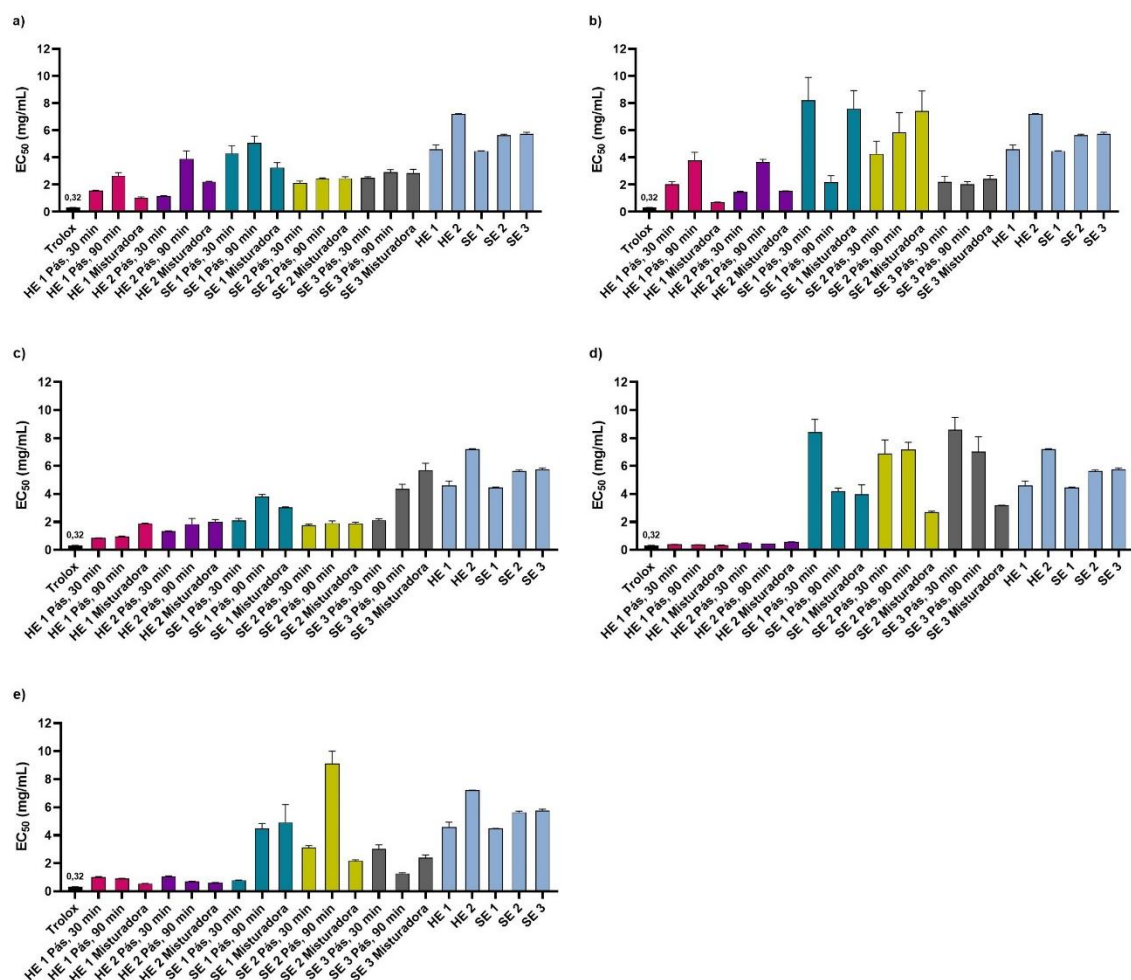


Figura 41. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau, avaliada pelo método de DPPH, sendo que as barras azuis claras dizem respeito ao controle.

Como é possível verificar através da observação dos gráficos e resultados, o trolox apresenta um valor de $EC_{50} = 0,324 \text{ mg/mL}$, sendo que os resultados obtidos através do ensaio DPPH encontram-se presentes na **Tabela 9**.

Tabela 9. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de DPPH com o valor da maior atividade antioxidante associada a cada método e solvente

Atividade antioxidante- EC_{50} (mg/mL)	
Extrato	Métodos e solventes
	Maior atividade antioxidante
Lavanda	1,045 (misturadora planetária, HE 1)
Tomilho	0,703 (misturadora planetária, HE 1)
Eucalipto	0,551 (misturadora planetária, HE 1)
Cortiça	0,346 (misturadora planetária, HE 1)
Cacau	0,853 (pás 30 min, HE1)

Em suma é possível concluir que, no geral, e tendo em conta os 2 métodos utilizados, os extratos obtidos com o solvente HE 1 são melhores que os extratos obtidos com o solvente HE 2 uma vez que apresentam valores de EC_{50} inferiores, logo maior poder antioxidante. No que diz respeito a cada extrato em concreto, e tendo também em conta os 2 métodos utilizados, o extrato da lavanda obtido com o solvente HE 1 apresenta maior atividade antioxidante do que o extrato obtido com o solvente HE 2, exceto com o método das pás durante 30 minutos. O mesmo acontece com o extrato do eucalipto, com a exceção com o método das pás durante 90 minutos. O extrato do tomilho obtido com o solvente HE 2 apresenta maior atividade antioxidante do que o obtido com o solvente HE 1, exceto com o método da misturadora planetária, os extratos do cacau e da cortiça obtidos com o solvente HE 1 apresentam consistentemente maior atividade antioxidante do que os obtidos com o solvente HE 2. Sendo que nos extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos, no geral, com o método das pás demonstram maior atividade antioxidante em comparação com o método da misturadora planetária. No caso das soluções eutéticas, os extratos obtidos com o SE 2 apresentam maior atividade antioxidante do que os extratos obtidos com os restantes solventes eutéticos. No que diz respeito a cada extrato, no caso da lavanda e do tomilho apresentam maior atividade antioxidante os extratos obtidos com o SE 2, de seguida os obtidos com o SE 3 e, por fim, os obtidos com o SE 1, no do cacau apresentam maior atividade antioxidante com os obtidos com SE 2, depois os obtidos com SE 1 e, por último os obtidos com o SE 3, no da cortiça apresentam maior atividade antioxidante os extratos obtidos com o SE 1, seguido os obtidos com o SE 2 e, por último os obtidos com o SE 3 e, por fim, no extrato do eucalipto apresentam maior atividade antioxidante os extratos obtidos com o SE 3, depois os obtidos com o SE 1 e, por último os obtidos com o SE 2. Os extratos obtidos com o método das pás apresentam-se com maior atividade antioxidante do que os extratos obtidos com o método da misturadora planetária. No que diz respeito aos extratos obtidos com solventes HE apresentam maior atividade antioxidante do que os extratos obtidos com os SE. O eucalipto e a cortiça são os extratos obtidos com os solventes HE que apresentam maior atividade antioxidante, o que se apresenta como um resultado viável visto que também apresentam o maior conteúdo em fenólico e flavonoide. No caso com os solventes eutéticos os melhores extratos são o extrato de eucalipto e de cacau, sendo que o cacau não seria espetável pois não foi dos extratos que apresentou maior conteúdo fenólico e flavonoide.

A atividade antioxidante determinada pelo método DPPH é determinada principalmente pelos compostos fenólicos presentes nos extratos (Lee et al., 2023).

Os compostos fenólicos representam a categoria principal de antioxidantes derivados da natureza e, portanto, têm sido extensamente estudados. Esses fenólicos possuem a capacidade de prevenir diversas

doenças degenerativas e apresentam uma notável atividade antioxidante, sendo que quando maior for a quantidade de conteúdo fenólico maior será a atividade antioxidante apresentada. Dentro da família dos compostos fenólicos de origem vegetal, encontramos uma diversidade de tipos, que incluem ácidos fenólicos (como os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos), cumarinas, flavonoides e polifenóis xantonoides (tais como ligninas e taninos) (Hapsari et al., 2022).

O teor de compostos fenólicos totais desempenha um papel fundamental, uma vez que contribui de maneira significativa para a atividade antioxidante. Um extrato com teores mais elevados de compostos fenólicos é altamente benéfico para os seres humanos, uma vez que tem a capacidade de combater eficazmente os danos causados pelos radicais livres ou agentes oxidantes. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos pode ser facilmente realizada por meio do método de eliminação de radicais livres DPPH resultantes. Este método é uma abordagem simples, rápida, precisa e requer uma baixa concentração de amostras e reagentes. Ele se baseia na capacidade do DPPH radical de interagir com espécies doadoras de hidrogênio presentes em materiais de extração, como os compostos fenólicos (Hapsari et al., 2022).

As soluções eutéticas demonstraram uma capacidade de eliminação de radicais mais eficaz em comparação com as soluções hidroetanólicas quando impostas as mesmas condições, o que provavelmente se deverá à maior eficiência na eliminação fornecida pelas soluções eutéticas (Dong et al., 2021).

O interesse pelos antioxidantes, especialmente os compostos fenólicos encontrados em plantas, como o eucalipto, cresceu consideravelmente na última década. As folhas e galhos finos do eucalipto contêm uma abundância de compostos fenólicos com potencial de aplicação em diversos setores industriais, incluindo a indústria farmacêutica, agrícola e alimentícia. Notavelmente, a atividade antioxidante dos extratos e o teor dos fenóis totais exibiram uma correlação linear positiva (Palma et al., 2021).

A cortiça é uma espécie comum nas regiões do Mediterrâneo, e as suas características peculiares, como alta elasticidade e baixa permeabilidade, permitem uma ampla gama de aplicações, incluindo na área farmacêutica. A composição principal da cortiça consiste em lignina, polissacarídeos, suberina, extrativos e componentes inorgânicos. A suberina, devido à sua abundância e composição única, destaca-se como o componente mais promissor para o desenvolvimento de novos produtos químicos. Conforme mencionado anteriormente, os compostos fenólicos estão associados à atividade antioxidante, e o interesse nos compostos fenólicos naturais deriva da diversidade de propriedades valiosas que essa

classe de compostos oferece, tais como suas propriedades antioxidantes e sua capacidade de neutralizar radicais livres (Santos et al., 2010).

O cacau é muito utilizado na medicina. Pesquisas indicam que o cacau possui propriedades antioxidantes, contribui para a prevenção de doenças cardiovasculares, tem efeitos antiaterogênicos e anti-inflamatórios, auxilia na redução da pressão arterial, além de melhorar a sensibilidade à insulina e apresentar benefícios contra distúrbios neurodegenerativos (Zubaydah et al., 2022).

As sementes de cacau são uma fonte rica de substâncias bioativas que contribuem positivamente para a saúde humana. As características distintivas desses fitoquímicos, bem como suas concentrações significativas, fazem com que os grãos de cacau crus se destaquem pela sua notável atividade antioxidante. Os principais antioxidantes presentes nos grãos de cacau crus e em produtos de cacau ricos em flavonoides são os polifenóis. As propriedades antioxidantes consideráveis estão, em grande parte, associadas aos elevados teores de flavonoides, especialmente epicatequina e catequina, e também às procianidinas oligoméricas e poliméricas. Outros compostos fenólicos, como antocianinas, flavonóis, flavonas, fenóis e ácidos fenólicos, podem ser encontrados em grãos de cacau. É importante notar que muitos flavonoides, notadamente como as procianidinas, apresentam uma atividade antioxidante alta, visto que possuem a capacidade de neutralizar radicais livres, quelar íons metálicos, interagir com proteínas e inibir enzimas envolvidas na síntese de radicais superóxido. As propriedades antioxidantes desses compostos são influenciadas significativamente pelo grau de polimerização e pelas características dos grupos hidroxilo (Felice et al., 2020; Oracz & Nebesny, 2016).

4.4.5.2. Ensaio de atividade de eliminação do radical ABTS

O ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), como indicador bastante comum, tem sido extensivamente utilizado para medir uma variedade de oxidantes, incluindo persulfato/peroximonossulfato, peróxido de hidrogênio, ferrato, cromato e bromo/cloro. Em comparação com corantes convencionais, o ABTS apresenta uma faixa de determinação mais ampla devido à sua capacidade de absorver luz em comprimentos de onda distintos, tais como 820nm, 732nm, 650nm e 415nm. Consequentemente, o ABTS é amplamente reconhecido como um excelente indicador, sendo que é muito rápido na sua determinação, bastante conveniente para determinar a concentração de certos oxidantes na água e é altamente sensível (Liu et al., 2022).

O ABTS é um substrato amplamente utilizado na detecção de peroxidase, capaz de ser oxidado pelo peróxido de hidrogênio, resultando na produção de um produto de cor verde na presença de um

catalisador. Este método demonstra uma notável sensibilidade e seletividade, permitindo a detecção de diversos aminoácidos. Ao longo dos anos têm sido aplicado, com sucesso, para detetar, por exemplo, a glutatona no plasma humano, o que indica o seu grande potencial em aplicações clínicas no que diz respeito ao diagnóstico (Y. Li et al., 2017). Este é igualmente empregado com frequência na indústria alimentar e por cientista na área agrícola para avaliar as propriedades antioxidantes de alimentos. O ABTS é utilizado para monitorar a cinética de reações de enzimas específicas e para avaliar a capacidade de compostos antioxidantes e complexas misturas, como bebidas ou alimentos, fluidos biológicos, na captura de radicais livres (Ji et al., 2021). Um catião radical ABTS estável, apresenta uma absorção de cromóforo azul-esverdeado, produzido pela oxidação de ABTS com persulfato de potássio antes da adição de antioxidantes, como é possível observar na **Figura 42** (Gulcin & Alwasel, 2023).

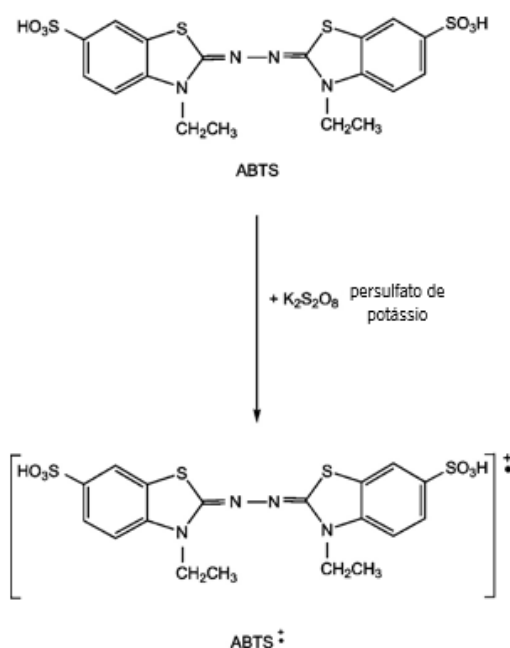


Figura 42. Formação de um radical ABTS estável a partir de ABTS com persulfato de potássio (Gulcin & Alwasel, 2023).

Através da realização do ensaio ABTS obteve-se os seguintes resultados presentes na **Figura 43**.

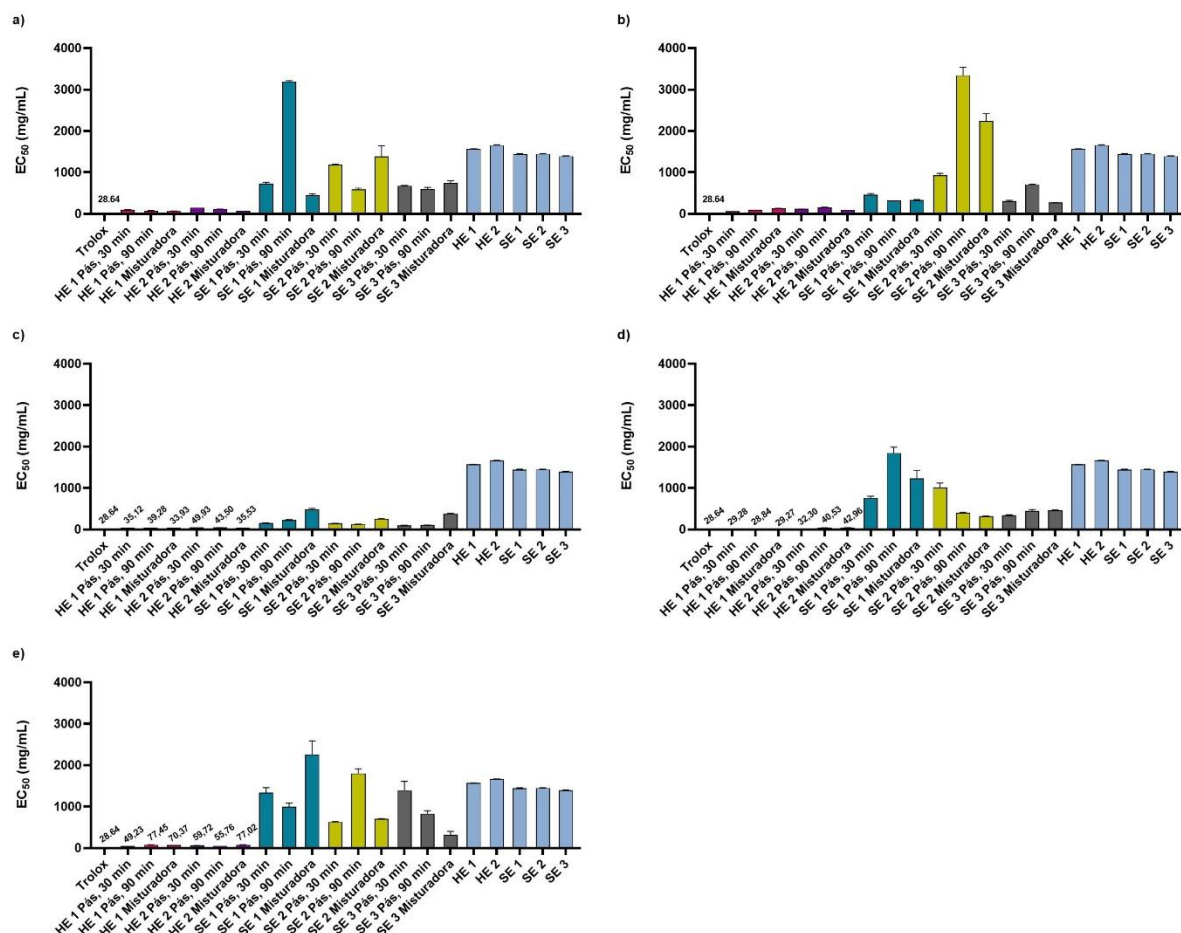


Figura 43. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau, avaliada pelo método de ABTS, sendo que as barras azuis claras dizem respeito ao controle.

Como mencionado anteriormente, o ensaio ABTS é utilizado para avaliar a atividade antioxidante, sendo que como no método anterior, quanto mais baixo for o valor de EC_{50} maior será o seu poder antioxidante.

O Trolox é um análogo da vitamina E que possui solubilidade em água. Semelhante à vitamina E, ele atua como um antioxidante utilizado em contextos biológicos e bioquímicos para combater o stresse oxidativo e prevenir danos causados pela oxidação (Mukhriani et al., 2023). Ao analisar os gráficos e resultados, podemos observar que o Trolox possui um valor de referência de 28,642 mg/mL. Os resultados obtidos através do ensaio do ABTS, encontram-se apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de ABTS, com o valor da maior atividade antioxidante associada a cada método e solvente

Atividade antioxidante- EC ₅₀ (mg/ mL)	
Extrato	Métodos e solventes
	Maior atividade antioxidante
Lavanda	69,769 (misturadora planetária, HE 1)
Tomilho	62,424 (pás 30min, HE 1)
Eucalipto	33,931 (misturadora planetária, HE 1)
Cortiça	28, 840 (pás 90 min, HE 1)
Cacau	49,232 (pás 30 min, HE 1)

Em conclusão, no geral, os extratos obtidos com o solvente HE 1 são melhores que os extratos obtidos com o solvente HE 2 uma vez que apresentam valores inferiores de EC₅₀, logo maior poder antioxidante. Em específico no que respeita a cada extrato, o extrato da lavanda obtido com o solvente HE 1 apresenta maior atividade do que obtido com o solvente HE 2, o mesmo acontece com o extrato do eucalipto e da cortiça. Os extratos do tomilho e do cacau, obtidos com o solvente HE 1 também apresentam maior atividade do que os obtidos com o solvente HE 2, com a exceção com o método da misturadora planetária no extrato do tomilho e com o método das pás durante 90 minutos no extrato do cacau. Nos extratos obtidos com os solventes HE o método das pás apresenta maior atividade quando em comparação com o método da misturadora planetária, exceto no extrato da lavanda e do eucalipto. No caso dos extratos obtidos com SE, os extratos obtidos com SE 3 apresentam maior atividade antioxidante. No que diz respeito a cada extrato, no caso da lavanda, cortiça e cacau os que apresentam maior atividade são os extratos obtidos com SE 3, seguidos os obtidos com o SE 2 e depois os obtidos com o SE 1, do tomilho apresentam maior atividade os obtidos com o SE 1, depois os obtidos com o SE 3 e, por último, os obtidos com o SE 2 e o eucalipto apresentam maior atividade os obtidos com o SE 2, depois com os obtidos com o SE 3 e, por fim, os obtidos com o SE 1. Os extratos obtidos com o método das pás apresentam-se, no geral, com maior atividade antioxidante do que os extratos obtidos com o método da misturadora planetária. Os extratos obtidos com os solventes HE apresentam maior atividade antioxidante do que os extratos com os SE.

O eucalipto, como já foi mencionado anteriormente, é uma fonte de diversos compostos polifenólicos, de entre os quais se destacam os taninos como bioativos com excelentes propriedades antioxidantes devido à sua natureza fenólica, resistentes às suas estruturas químicas. Essas propriedades antioxidantes apresentam várias vantagens para a saúde, ajudando a combater diversos problemas e doenças (Andrew

et al., 2020).

A cortiça é essencialmente composta por suberina, lenhina e celulose, além de conter vários ácidos fenólicos extraíveis. O interesse por esses compostos fenólicos naturais é devido à diversidade de propriedades benéficas demonstradas por essa família, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, capacidade de eliminação de radicais livres, inibição de enzimas e ação antimicrobiana. Diversas pesquisas confirmam que os extratos obtidos da cortiça realmente possuem propriedades antioxidantes, anti-envelhecimento, anti-inflamatórias e antifúngicas, tudo a partir de um material natural e sustentável. A composição química variada e as propriedades notáveis da cortiça torna-a um material de grande potencial e importância em diversos setores, especialmente nas áreas cosmética e farmacêutica (Carriço et al., 2018).

4.4.5.3 Ensaio do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)

O ensaio FRAP, que permite determinar a atividade antioxidante requer condições específicas para sua realização, incluindo um meio ácido com pH 3,6, que ajuda na solubilização do ferro, e uma temperatura de 37 °C. O pH reduzido desempenha um papel importante, diminuindo o potencial de ionização e aumentando o potencial redox, o que resulta numa mudança no mecanismo de reação predominante. Como outros ensaios, o FRAP apresenta limitações, sendo a mais significativa relacionada ao potencial redox do par $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$. Qualquer substância com um potencial redox inferior a esse par pode levar a resultados falsos, apresentando elevados valores de redução do Fe^{3+} . Além disso, os resultados obtidos no ensaio FRAP dependem do tempo de análise. Ele baseia-se na suposição de que a reação redox ocorre rapidamente e que todas as reações são concluídas num período de quatro a seis minutos. No entanto, essa suposição nem sempre se confirma na prática. Apesar dessas limitações, esse método é amplamente utilizado em estudos de atividade biológica. É importante notar que uma das limitações mais críticas do ensaio FRAP é a sua dependência de uma solução aquosa (tampão acetato). Portanto, ele tem restrições quando se trata de lidar com substâncias hidrofóbicas, como os óleos essenciais de plantas e seus componentes antioxidantes, como é o caso dos terpenos (Wojtunik-Kulesza, 2020). O mecanismo ligado a este método encontra-se presente na **Figura 44**.

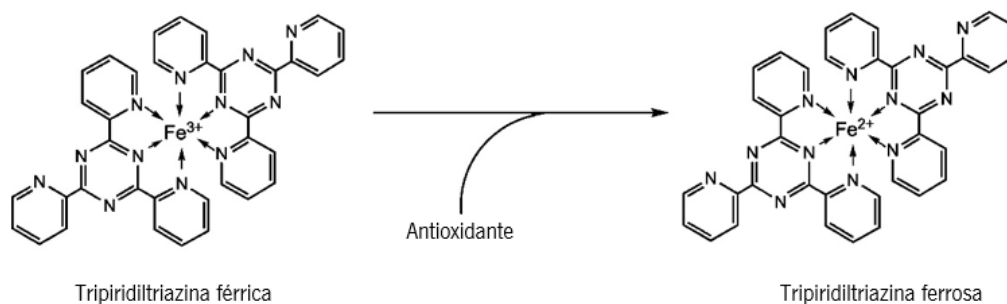


Figura 44. Formação do complexo (Fe 2+ –TPTZ) a partir do complexo (Fe 3+ –TPTZ) por antioxidante (Gulcin & Alwaseel, 2023).

Através da realização do ensaio FRAP obteve-se os seguintes resultados presentes na **Figura 45**.

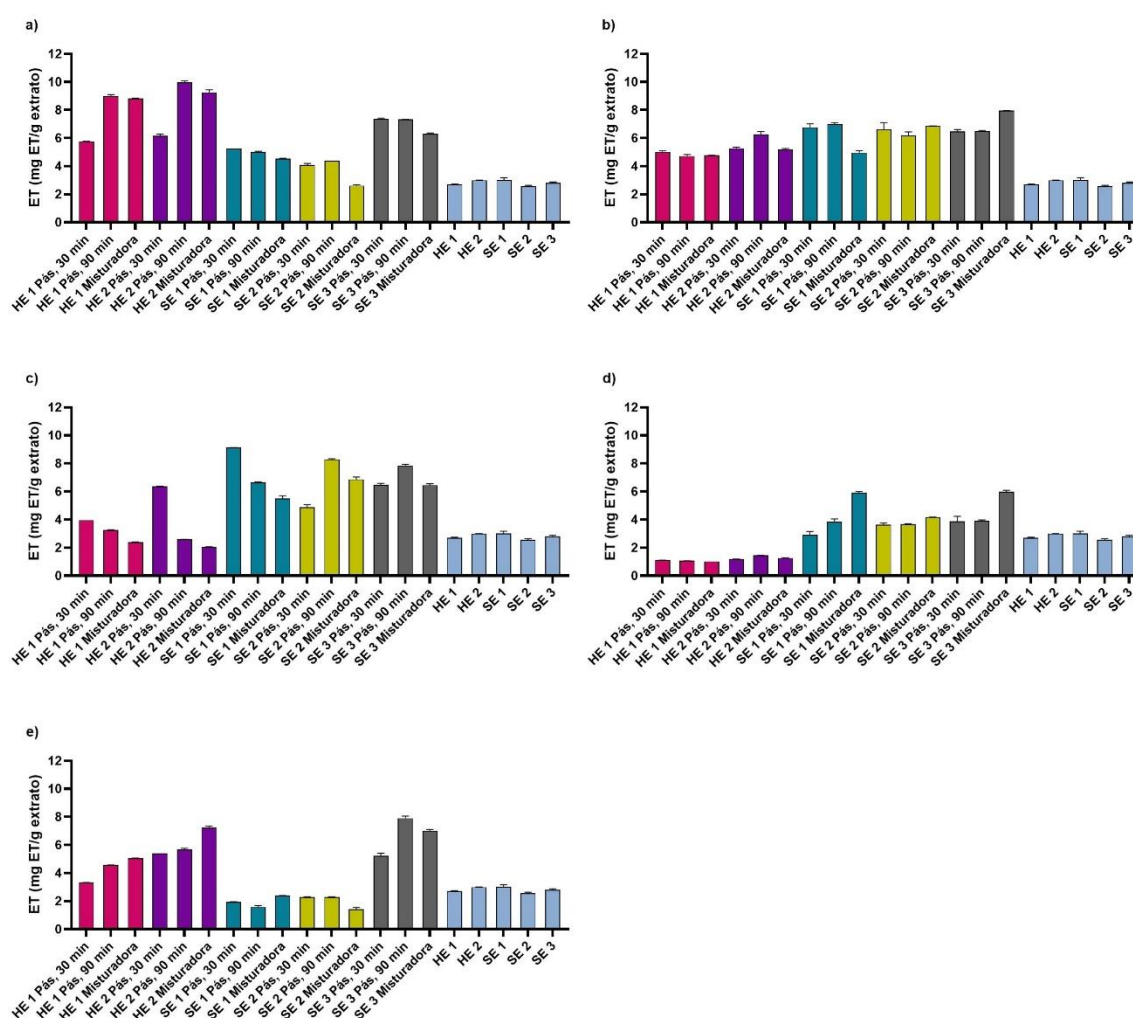


Figura 45. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau, avaliada pelo método de FRAP, sendo que as barras azuis claras dizem respeito ao controle.

Como mencionado anteriormente, o ensaio FRAP é utilizado para a avaliação da atividade antioxidante. Os resultados obtidos encontram-se presente na **Tabela 11**, abaixo apresentada.

Tabela 11. Atividade antioxidante dos extratos de a) lavanda; b) tomilho; c) cacau; d) cortiça; e) eucalipto, avaliada pelo método de FRAP, com os valores de maior atividade antioxidante, associados a cada método e solvente, em termos de ET (Equivalentes de trolox)

Atividade antioxidante- Ensaio FRAP (mg ET/ g de extrato)	
Extratos	Métodos e solventes
	Maior atividade antioxidante
Lavanda	9,964 (pás 30 min, HE 2)
Tomilho	6,988 (pás 90 min, SE 1)
Eucalipto	9,124 (pás 30 min, SE 1)
Cortiça	5,999 (misturadora planetária, SE 3)
Cacau	7,901 (pás 90 min, SE 3)

Em resumo, no geral, os extratos obtidos com o solvente HE 2 demonstram um desempenho superior aos extratos obtidos com o solvente HE 1, pois apresenta valores mais elevados, logo maior atividade antioxidante. Nos extratos com obtidos solventes HE, com o método das pás tende a ser mais eficaz, a apresentarem maior atividade, com algumas exceções, como no extrato de cacau, no extrato da lavanda obtido o solvente HE 1 com o método das pás durante 30 minutos e obtido com o solvente HE 2 com o método das pás durante 90 minutos, na cortiça obtido com o solvente HE 2 com o método das pás durante 30 minutos e no tomilho obtido com o solvente HE 1 com o método das pás durante 30 minutos. Quanto aos extratos obtidos com SE, os extratos obtidos com o SE 3 apresentam maior atividade em comparação com os extratos obtidos com os restantes SE. No entanto, quando avaliamos cada extrato individualmente, observamos que o extrato de lavanda e o da cortiça, apresentam maior atividade com os obtidos com o SE 3, seguido os obtidos com o SE 1 e, por último, os obtidos com o SE 2, no extrato do tomilho e do cacau, apresentam maior atividade os obtidos com o SE 3, depois os obtidos com o SE 2 e, por último, os obtidos com o SE 1 e, por fim, no extrato do eucalipto, os extratos apresentam maior atividade obtidos com o SE 1, posteriormente obtidos com o SE 3 e, por último, obtidos com o SE 2.

Em termos gerais, os extratos com o método das pás apresentam maior atividade antioxidante, com algumas exceções, como no extrato do tomilho obtido com o SE 2 e obtido com o SE 3, no extrato do cacau obtido com o SE 1, e obtido com o SE 3 com o método das pás durante 30 minutos, no extrato da cortiça e no eucalipto os extratos obtidos com o SE 2 obtido nas pás durante 30 minutos, onde com o método da misturadora planetária apresentam maior atividade. Os extratos obtidos com os solventes SE demonstraram maior atividade em comparação com os extratos obtidos com os solventes HE. O extrato da lavanda e do cacau demonstraram maior atividade com os extratos obtidos com solventes HE, e o extrato do tomilho e do eucalipto demonstraram maior atividade antioxidante com os extratos obtidos

com SE.

O tomilho, uma planta aromática, é também conhecido pelo seu óleo essencial, que possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes devido à presença de compostos fenólicos. Os compostos mais importantes sintetizados pelo tomilho são o carvacrol e o timol, que exibem propriedades antioxidantes notáveis, mas também demonstram habilidade para inibir microrganismos. Essa proteção ocorre devido à interferência nos processos enzimáticos desses microrganismos e ao aumento da permeabilidade das suas membranas celulares. O extrato residual de tomilho pode, consequentemente, ser usado como um antioxidante em emulsões, seja em produtos alimentares ou farmacêuticos, como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos, sendo que o extrato do tomilho foi um dos que, no geral, apresentou maior atividade antioxidante, assim como a lavanda (El-Guendouz et al., 2019; Mokhtari et al., 2023).

A lavanda tem sido bastante usada na fitoterapia e é reconhecida pela sua eficácia. É extremamente empregada na formulação de produtos cosméticos e de aplicação tópica, sendo que apresenta atividade antioxidante e antibacteriana. Além disso, a lavanda é considerada benéfica para uma ampla gama de questões de saúde, abrangendo desde a ansiedade, enxaquecas, insônia, depressão, gripes, problemas hepáticos e biliares, nervosismo, perda de apetite, entre outras (Hui et al., 2010). As variedades de lavanda possuem uma riqueza de metabólitos secundários, como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, diterpenos, triterpenos e taninos. A presença desses compostos fenólicos confere propriedades antioxidantes aos extratos de lavanda, tornando-os valiosos na indústria cosmética (Hawryl et al., 2019).

O cacau tornou-se uma planta medicinal relevante graças à sua composição química singular. Nos últimos dez anos, o consumo de cacau atraiu atenção significativa da pesquisa em função dos diversos benefícios que pode proporcionar à saúde. Além do mais, a atividade antioxidante do cacau tem sido amplamente documentada, assim como a sua capacidade antimicrobiana. O cacau é especialmente rico em polifenóis, incluindo ácidos fenólicos e flavonoides. O conteúdo total de polifenóis no cacau compreende uma parte substancial de flavonoides. Dada a existência significativa desses compostos bioativos, o cacau tem potencial bastante benéfico à saúde (Todorovic et al., 2017).

Como já é sabido, o eucalipto demonstra atividade farmacológica, especialmente no que diz respeito ao tratamento do cancro e condições inflamatórias, além de exibir propriedades antioxidantes e antimicrobianas. As folhas dessa planta contêm uma variedade de compostos fenólicos, tais como o ácido siríngico, epicatequina, quercetina e ácido gálico, juntamente com outros polifenóis. Os flavonoides e outros compostos fenólicos são notáveis pelos seus efeitos antioxidantes, e muitos deles demonstram

também atividade antimicrobiana. Atualmente, foi estabelecida uma relação próxima entre o teor de polifenóis, a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana (Vitta et al., 2020).

4.4.6. Determinação do fator de proteção solar (FPS)

Outro fator a ter em conta no que diz respeito à caracterização dos extratos é a determinação do fator de proteção solar (FPS). Como já foi mencionado anteriormente, o FPS é uma medida que serve para medir a capacidade de um produto em proteger a pele contra a radiação ultravioleta (UV), sendo por isso um objeto de estudo importante. O fator de proteção solar foi determinado em todos os extratos estudados e os resultados são apresentados na **Figura 46**.

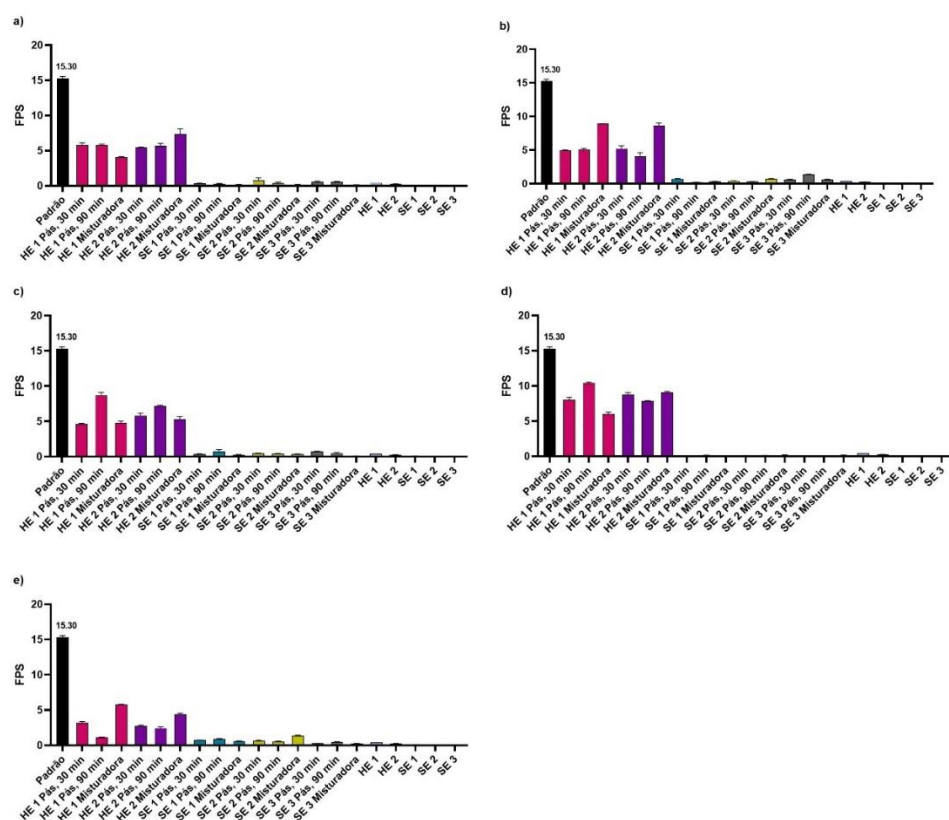


Figura 46. Determinação do fator de proteção solar do extrato de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau. Os valores apresentados resultam da média de 2 ensaios.

Os resultados obtidos, quanto ao que apresenta maior fator de proteção solar, apresentam-se detalhadamente, de acordo com o método e solvente, na **Tabela 12**.

Tabela 12. Determinação do fator de proteção solar do extrato de a) lavanda; b) tomilho; c) eucalipto; d) cortiça; e) cacau, apresentando o maior FPS de acordo com o método e solvente

Fator de proteção solar (FPS)	
Extratos	Métodos e solventes
	Maior FPS
Lavanda	5,769 (pás 30 min, HE 1)
Tomilho	8,912 (misturadora planetária, HE 1)
Eucalipto	8,696 (pás 90 min, HE 1)
Cortiça	10,427 (pás 90 min, HE 1)
Cacau	5,758 (misturadora planetária, HE 1)

Em resumo, no geral, os extratos obtidos com o solvente HE 1 apresentam maior FPS em comparação com os extratos obtidos com o solvente HE 2, uma vez que apresentam valores globalmente mais elevados de FPS. Em particular, o extrato de lavanda, obtido com o solvente HE 1 apresenta maior FPS do que obtido com o solvente HE 2, com exceção com o método da misturadora planetária. O mesmo padrão repete-se nos extratos de cacau e tomilho, com algumas exceções, como com o método das pás durante 90 minutos para o extrato de cacau e com o método das pás durante 30 minutos para o extrato de tomilho. No caso dos extratos de eucalipto e cortiça, obtidos com o solvente HE 2 apresentam maior FPS do que obtidos com o solvente HE 1, com exceção com o método das pás durante 90 minutos. Nos extratos obtidos com os solventes HE, com o método da misturadora planetária apresentam maior FPS, embora não aconteça, com o extrato de eucalipto e com o extrato da cortiça obtido com o solvente HE 1. No contexto dos extratos obtidos com os SE, em geral, os obtidos com o SE 2 obtém-se maior FPS. No entanto, ao avaliar cada extrato individualmente, observamos as que no extrato de lavanda, obtido com o SE 2 obtém-se maior FPS, seguido obtido com o SE 3 e, por último obtido com o SE 1, nos extratos de cortiça e cacau, os obtidos com o SE 2 obtém-se maior FPS, depois os obtidos com o SE 1 e, por último, os obtidos com o SE 3, no extrato de tomilho, o maior FPS é obtido com o SE 3, depois obtido com o SE 2 e em seguida obtido com o SE 1, finalizando com o extrato de eucalipto, maior FPS obtido com o SE 1, seguido obtido com o SE 3 e, por fim, obtido com o SE 2. Os extratos obtidos com o método das pás apresentam maior FPS quando comparados com os extratos obtidos com o método da misturadora planetária, com algumas exceções notáveis como o caso do extrato de cortiça obtido com o SE 1 com o método das pás durante 30 minutos e obtido com o SE 2 e obtido com o SE 3, e os extratos de cacau e tomilho obtidos com o SE 2. Os extratos da cortiça e eucalipto demonstraram ser os melhores, porque são os que apresentam maior fator de proteção solar, sendo que também foram os que

apresentaram maior conteúdo em fenólicos e flavonoides e maior atividade antioxidante. Os extratos obtidos com solventes HE demonstraram maior FPS quando comparados com os extratos obtidos com os SE.

Na literatura consta resultados promissores no que diz respeito aos extratos de eucalipto, sendo que consideram que apresentam propriedades de “boa a excelente proteção UV” (Mongkholrattanasit et al., 2011).

4.4.1 Inibição da tirosinase na presença dos extratos naturais

De modo a perceber se a enzima tirosinase era inibida na presença dos extratos naturais, foi realizado o ensaio da inibição com todos os extratos estudados e os resultados são apresentados nas **Figura 47 a 51**.

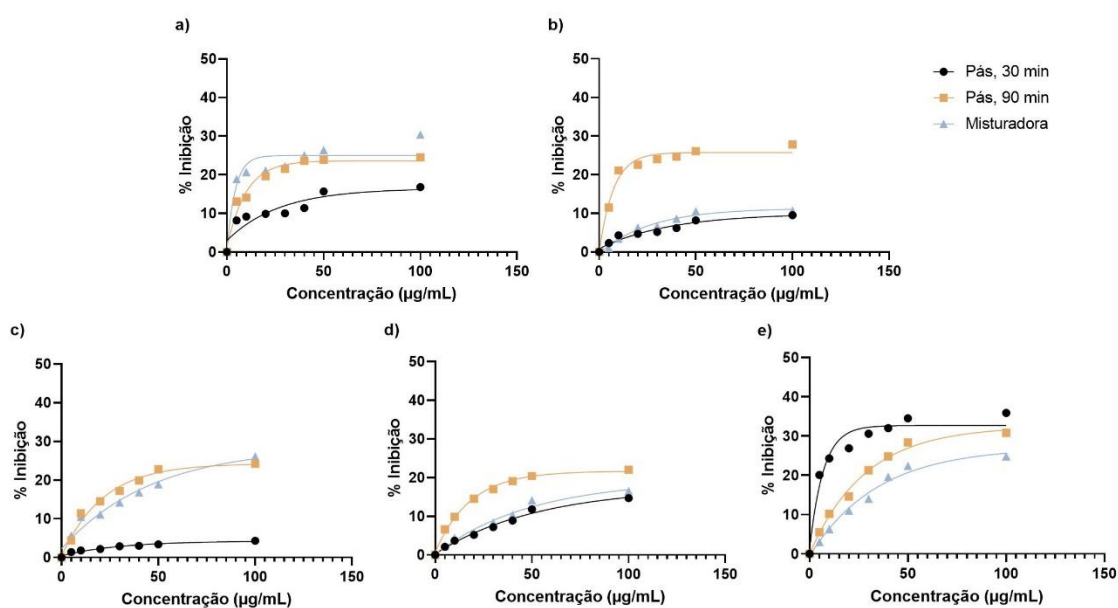


Figura 47. Inibição da tirosinase pelo extrato de **lavanda** obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.

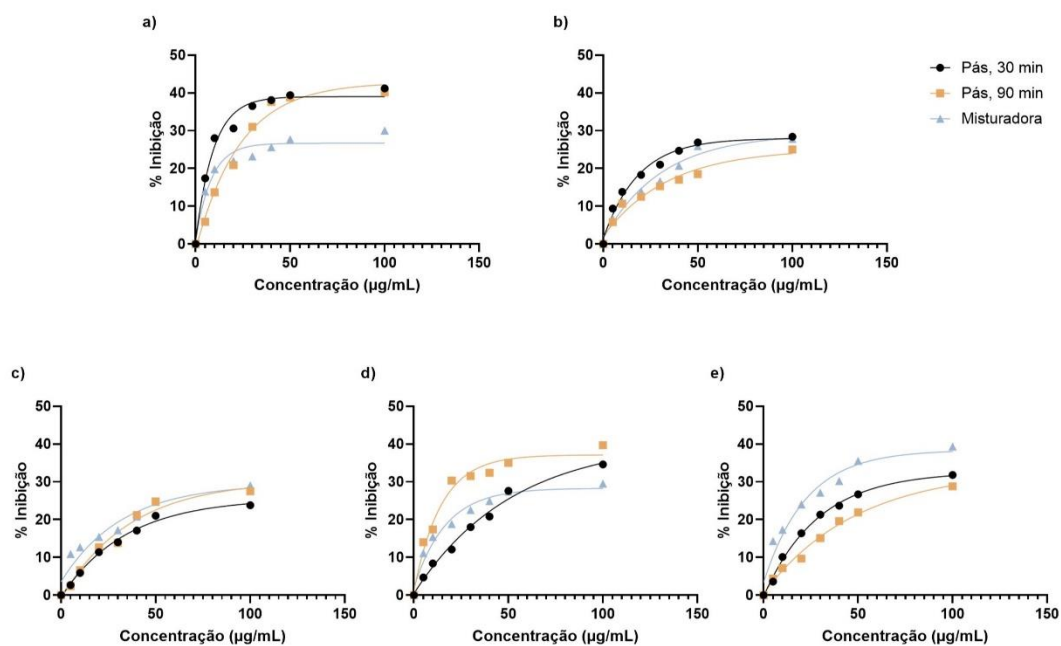


Figura 48. Inibição da tirosinase pelo extrato de **cacau** obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.

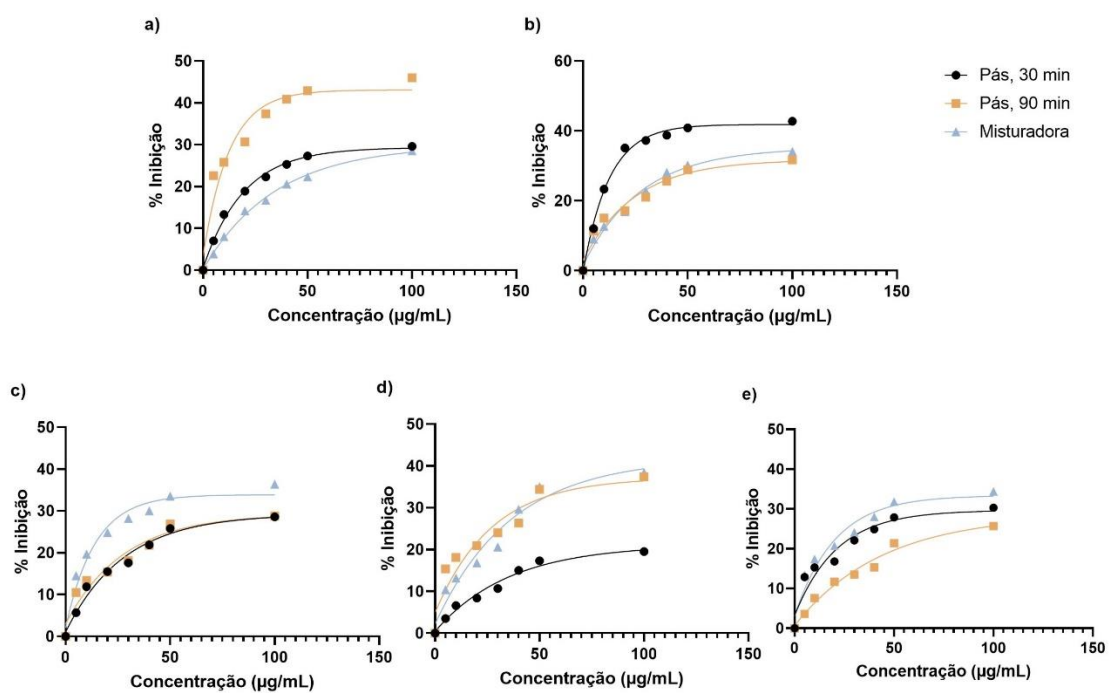


Figura 49. Inibição da tirosinase pelo extrato de **tomilho** obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.

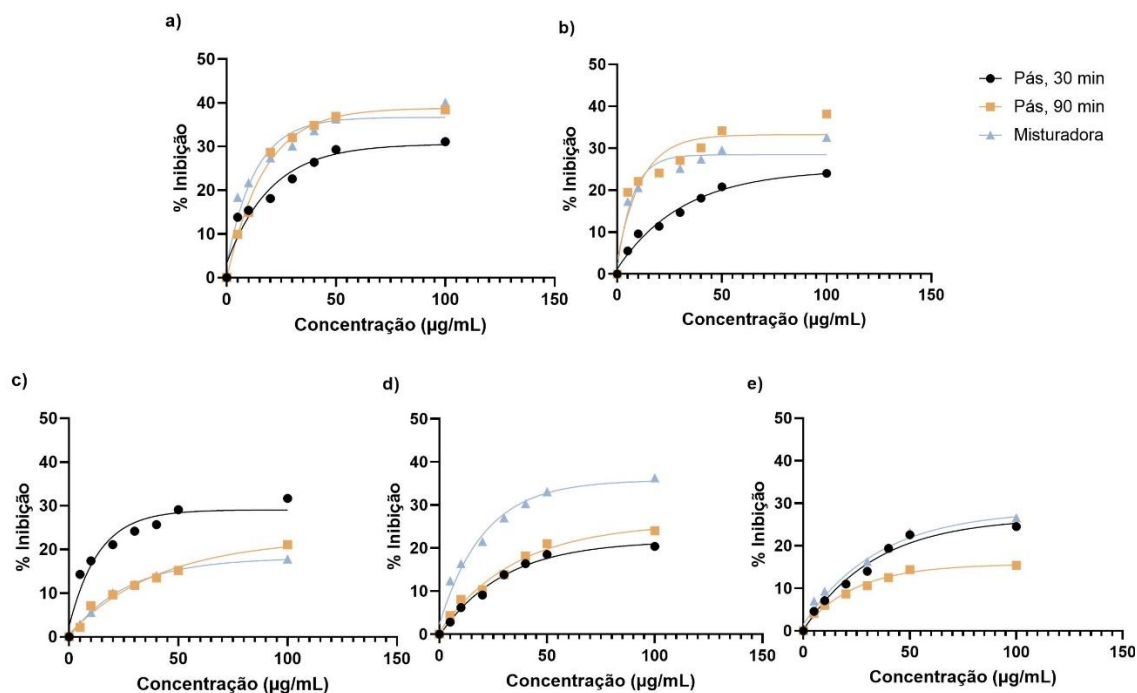


Figura 50. Inibição da tirosinase pelo extrato de **eucalypto** obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.

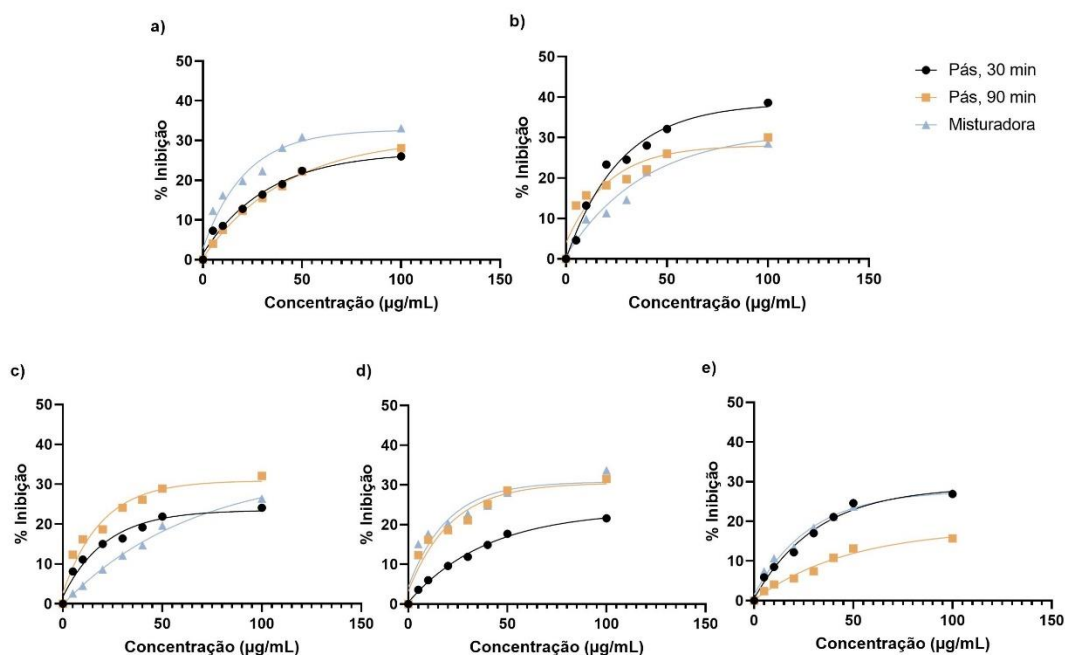


Figura 51. Inibição da tirosinase pelo extrato de **corticea** obtido com diferentes solventes e diferentes métodos de extração.

Os resultados obtidos, no que diz respeito à maior percentagem de inibição de cada extrato, apresentam-se detalhadamente na **Tabela 13**.

Tabela 13. Inibição da tirosinase pelos extratos obtidos com diferentes solventes e diferentes métodos de extração, apresentando a maior % de inibição

Inibição (%)	
Extrato	Métodos e solventes
	Maior % inibição
Lavanda	35,9 (pás 30 min, SE 3)
Tomilho	46 (pás 90 min, HE 1)
Eucalipto	40,1 (misturadora planetária, HE 1)
Cortiça	38,6 (pás 30 min, HE 2)
Cacau	41,2 (pás 30 min, HE 1)

Na generalidade os extratos obtidos com solventes HE (27,8% - 46%) apresentam maior percentagem de inibição que os extratos obtidos com os SE (22% - 39,7%), sendo que os extratos extraídos com o método das pás apresentam maior percentagem de inibição do que os extratos extraídos com o método da misturadora planetária. O extrato que apresenta maior percentagem de inibição é o tomilho e o que apresenta menor é a lavanda. Os resultados obtidos (42,8-46% de inibição) corroboram estudos anteriores de inibição da atividade da tirosinase com extratos de tomilho obtidos por extração hidroetanólica que demonstraram percentagens de inibição de cerca de 42% (Silva et al., 2021). Este resultado demonstra a capacidade inibitória do extrato de tomilho e o seu potencial para ser introduzido em formulações cosméticas anti-manchas.

Estudos anteriores referem também o uso de extratos de lavanda como inibidores da tirosinase com resultados de inibição entre 15-70% (Hsu et al., 2007) sendo que os resultados obtidos com este extrato encontram-se dentro da menor gama de inibição reportada (22-36%).

4.5. Produção de nanopartículas de quitosano com extratos encapsulados

4.5.1. Caracterização físico-química das nanopartículas

A **Figura 52**, diz respeito aos gráficos obtidos pelo DLS, apresentando o tamanho, a carga e PDI de nanopartículas de quitosano encapsulando os extratos.

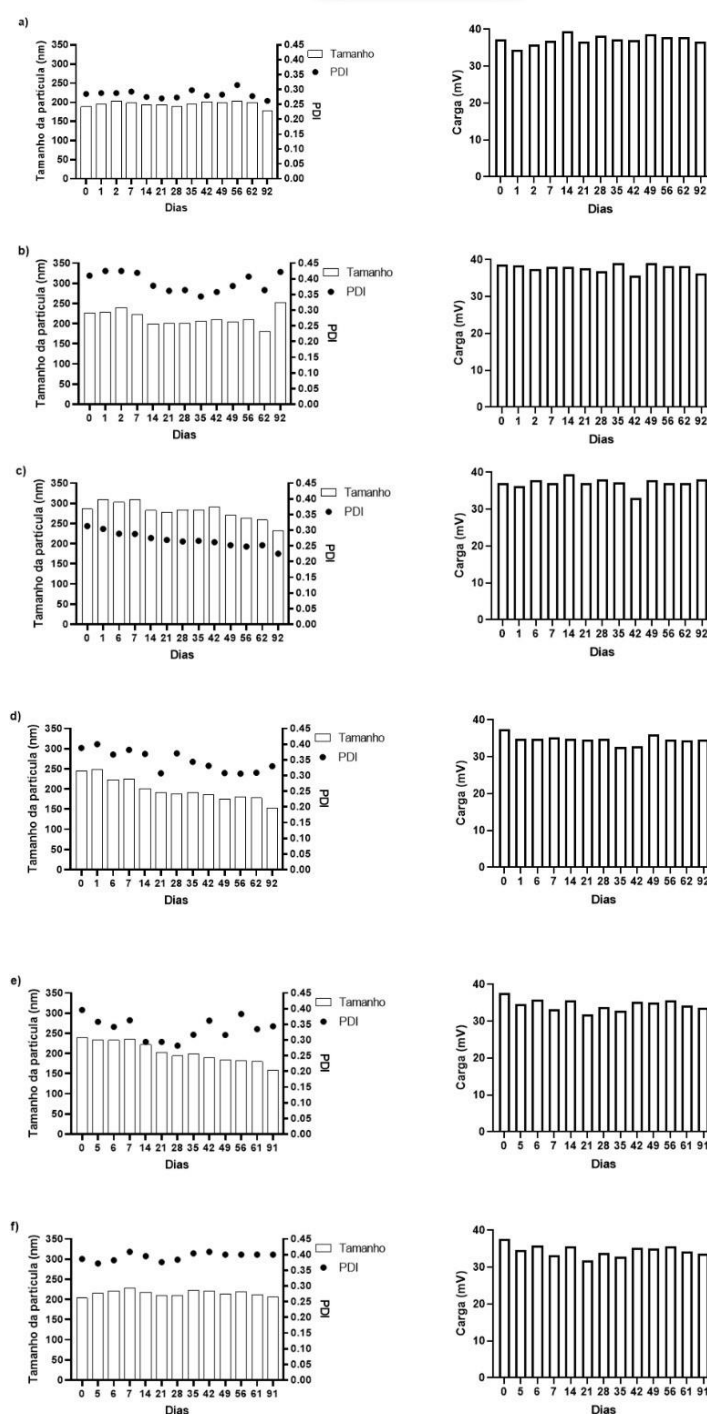


Figura 52. Tamanho, carga e PDI de nanopartículas de quitosano encapsulando extrato de: a) vazias, b) cacau, c) eucalipto, d) lavanda, e) tomilho e f) cortixa.

Na **figura 53** está presente uma ilustração que retrata uma nanopartícula de quitosano com o extrato encapsulado, sendo que o círculo com a cor azul representa o extrato, os pequenos círculos com a cor castanha representam o Tween 80, os pequenos círculos com a cor laranja representam o TPP e os pequenos círculos com a cor verde representam o quitosano.

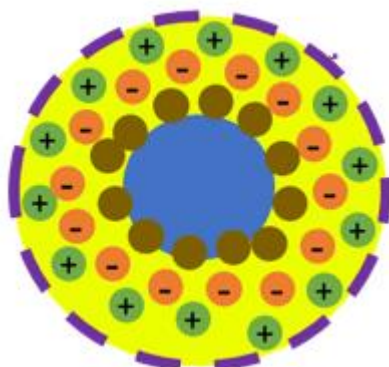


Figura 53. Ilustração de uma nanopartícula de quitosano com o extrato encapsulado.

Com base na análise dos gráficos e dos resultados obtidos para os diversos extratos é possível determinar o tamanho, o índice de polidispersão (PDI) e a carga referente às nanopartículas contendo os diferentes extratos. As nanopartículas demonstraram-se estáveis durante os 91 dias em que foram avaliadas. As nanopartículas de quitosano vazias apresentaram um valor médio de tamanho de 195 nm, PDI de 0,284 e carga 37 mV. No que diz respeito às nanopartículas de quitosano, com os extratos encapsulados, o tamanho varia entre 199 nm e 281 nm, a PDI varia entre 0,270 a 394 e a carga varia entre 35 e 38 mV.

Os sistemas de liberação e administração controlada de medicamentos são muito interessantes pois o fármaco é encapsulado e, em seguida, o sistema transporta e liberta o medicamento no alvo local. Nesse contexto, existe um interesse específico na utilização de nanopartículas (Egil et al., 2020).

As nanopartículas apresentam inúmeras vantagens de entre as quais, o seu pequeno tamanho, e permitem aumentar a superfície disponível para interação com o alvo biológico e penetrar nos tecidos através dos capilares, para que sejam diretamente internalizadas pelas células e sua concentração seja assim promovida e mais eficaz (Zambito et al., 2020). O quitosano, derivado da desacetilação da quitina, um polímero natural abundante, é um polissacarídeo natural que se destaca por não ser tóxico, ser biocompatibilidade e biodegradabilidade. O uso de nanopartículas preparadas a partir desse biopolímero tem despertado grande interesse em diversos campos, abrangendo desde a engenharia de tecidos até aplicações na distribuição de medicamentos, imobilização de enzimas. Diversas abordagens têm sido usadas para a produção de nanopartículas de quitosano, incluindo processos como emulsificação/evaporação de solvente, secagem por pulverização, reticulação de emulsões, ocorrência

por coacervação e o método de gelificação ionotrópica. A gelificação ionotrópica ainda se mantém como um dos métodos mais eficazes e simples, permitindo a produção de nanopartículas e micropartículas através de interações eletrostáticas entre duas espécies iônicas, especificamente quitosano e tripolifosfato (TPP), sob condições controladas. Nesta reação em específico, os grupos amino carregados positivamente de quitosano ligam-se aos grupos fosfato carregados negativamente, resultando na formação de nanopartículas derivadas desse biopolímero (Benamer Oudih et al., 2023). O quitosano apresenta diversas vantagens, como a ausência de toxicidade, capacidade de aderência ao muco, notável biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de propriedades antibacterianas e antioxidantes. Essas características fazem com que o quitosano seja uma escolha específica como um veículo à base de quitosano para aplicações na área da medicina (Granata et al., 2021). Conforme a literatura, as nanopartículas compostas de quitosano apresentam um tamanho entre 55-167 nm, uma baixa polidispersidade com um índice de 0,111 e exibem um potencial zeta com valor entre 16-22 mV (Egil et al., 2020; Nair et al., 2019), sendo que em comparação com os resultados obtidos estes demonstraram valores um pouco superiores. No que diz respeito às dimensões das nanopartículas quando com um extrato encapsulado, é aconselhável que incluam a faixa de tamanho de 100 a 600 nm, com uma preferência especial para tamanhos entre 200 e 400 nm, sendo que os resultados obtidos estão dentro destes valores. Essas dimensões podem ser medidas usando a técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS). Além disso, que as nanopartículas apresentem um índice de polidispersidade (PDI) dentro da faixa de 0,1 a 0,8, preferencialmente entre 0,1 e 0,4, o que também se verifica nos resultados do presente estudo. Essas dimensões mostraram-se particularmente vantajosas para o propósito, uma vez que permitem um equilíbrio eficaz entre a quantidade de extrato encapsulado nas nanopartículas e a manutenção das características desejadas, incluindo os efeitos técnicos associados às dimensões nanométricas. Esses efeitos incluem uma superfície significativamente maior disponível para interação com o alvo biológico, a capacidade de penetrar em tecidos através dos capilares e a potencial internalização das nanopartículas pelas células, o que não é possível com partículas maiores. As nanopartículas são também definidas pelo seu potencial zeta, medido por meio da técnica de dispersão de luz, entre 10 e 25 mV, preferencialmente entre 15 e 20 mV (Zambito et al., 2020), sendo que os resultados obtidos neste estudo demonstram valores superiores. O potencial zeta é a carga superficial que desempenha um papel crucial na estabilidade de partículas em suspensão, através da força de repulsão elétrica entre elas. Quando as partículas no meio apresentam um potencial zeta grande, seja positivo ou negativo, elas têm uma tendência a se repelir, o que impede sua aglomeração. Geralmente, considere que partículas com potencial zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são consideradas

estáveis (Benamer Oudih et al., 2023). Essas nanopartículas demonstram estabilidade num solvente aquoso e mantêm essa estabilidade numa ampla faixa de pH, geralmente variando de 1 a 8, com uma ênfase particular em manter a estabilidade em níveis de pH ácido, que são geralmente compreendidos entre 1 e 5. A utilização dessas nanopartículas que encapsulam um extrato contendo polifenóis para a elaboração de formulações nutracêuticas, farmacêuticas, cosméticas ou alimentares, podem abranger uma variedade de produtos, como cápsulas, comprimidos, bebidas, cremes faciais ou corporais, soros e pastas de dentes, entre outros (Zambito et al., 2020).

Através da técnica de caracterização morfológica de microscopia transmissão eletrônica de varrimento (STEM) consegue-se caracterizar a morfologia das nanopartículas, imagens obtidas presentes na **Figura 54**.

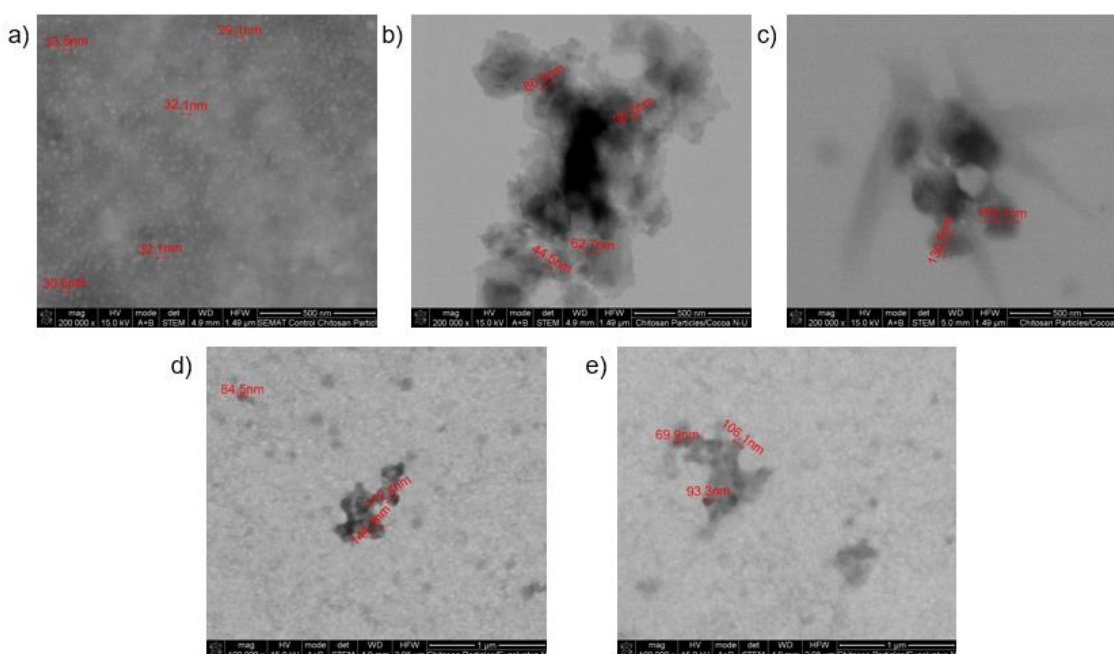


Figura 54. a) Partículas de quitosano (controle); b) e c) Partículas de quitosano com extrato de cacau encapsulado; d) e e) Partículas de quitosano com extrato de eucalipto encapsulado.

A morfologia das nanopartículas de quitosano, com extratos encapsulados como as vazias, foi examinada usando a microscopia transmissão eletrônica de varrimento. Na literatura consta que uma análise STEM revelou que o tamanho médio das nanopartículas de quitosano, em ambos os casos, estava em torno de 50 nanômetros, o que não se verificou nos presentes resultados. As nanopartículas de quitosano devem, idealmente, apresentar uma população uniformemente distribuída, não havendo evidência de aglomeração, a sua forma deve ser esférica e uniforme, o que não se verifica na totalidade dos resultados do presente estudo. Na técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), o diâmetro medido das nanopartículas é chamado de diâmetro hidrodinâmico, pois essa técnica leva em

consideração também os iões circundantes às nanopartículas que estão sujeitos ao movimento browniano. Nesse contexto, o diâmetro hidrodinâmico é determinado com base na taxa de difusão das partículas, o que geralmente resulta num tamanho de partícula um pouco maior em comparação com as obtidas por STEM, o que se verificou no presente estudo. As diferenças nos tamanhos das partículas resultam dos métodos de medição das análises DLS e STEM (Egil et al., 2020).

Através da caracterização morfológica STEM, é possível observar que no que diz respeito às nanopartículas de quitosano sozinhas, estas apresentam tamanhos entre 29,1-33,5 nm, no caso das nanopartículas com extrato de cacau o tamanho varia entre 39,2-153,1 nm e, por último, ao nível do tamanho, as nanopartículas com extrato de eucalipto oscilam entre 69,9-144,3 nm. Comparando com os valores obtidos pelo DLS são todos inferiores ao reportado anteriormente.

4.6. Avaliação do perfil de libertação dos extratos encapsulados nas nanopartículas de quitosano

Posteriormente, foi avaliado o perfil de libertação dos extratos encapsulados nas nanopartículas (com uma membrana de 14 kDa), sendo que para isso inicialmente foi traçada a curva de calibração, e medida a absorbância, no comprimento de onda de absorção máxima determinado anteriormente, a diferentes tempos: 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h e 72h, substitui-se os valores obtidos na curva de calibração para determinação da concentração. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 14**, abaixo apresentada.

Tabela 14. Avaliação da libertação controlada dos extratos que são libertados das nanopartículas de cacau, de tomilho, de cortiça, de lavanda e de eucalipto, e medição da concentração (%)

Extrato/Tempo (h)	% Libertação de extrato									
	0	1	2	3	4	6	8	24	48	72
Cacau	0	6	7	12	26	26	26	26	26	26
Tomilho	0	4	5	6	8	9	10	13	13	16
Cortiça	0	2	6	13	17	17	17	18	18	18
Lavanda	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Eucalipto	0	14	14	19	24	24	24	32	40	42

Através da análise da tabela é possível verificar que os extratos que obtiveram maiores valores de concentração libertada, em percentagem, foram os extratos do eucalipto e do cacau, alcançando respetivamente 42% e 26%. Estes extratos mostram-se promissores para serem encapsulados e aplicados em formulações cosméticas que requeiram uma maior penetração na pele do material e um perfil de libertação mais controlado. Os estudos de libertação na pele foram realizados, no entanto a quantificação do material que atravessou a pele foi prejudicada pela presença de material da própria pele. Os resultados não foram, portanto, apresentados nesta tese.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Os resultados experimentais deste estudo revelaram que, ao nível dos rendimentos de extração, os extratos obtidos com os solventes eutéticos demonstraram melhores rendimentos do que os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos, como era expectável, sendo que o melhor extrato foi o do tomilho obtido com SE 1 com o método pás durante 30 min com um rendimento de 0,74 g de extrato/g de material inicial.

No que diz respeito ao teor do conteúdo em fenólicos e flavonoides, os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos apresentaram valores superiores, sendo que os extratos obtidos com o HE 2 apresentam valores mais elevados que os obtidos com o HE 1 nos extratos da lavanda e da cortiça, contrariamente, aos extratos do tomilho, eucalipto e cacau. No geral, no que diz respeito ao teor de conteúdo em fenólicos, nos extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos, o melhor extrato foi o da cortiça (362,09 mg de EAG/ g de extrato), e nos extratos obtidos com os solventes eutéticos foram os extratos de tomilho (32,02 mg de EAG/g de extrato) e eucalipto (33,36 mg de EAG/ g de extrato). No que diz respeito ao conteúdo em flavonoides, nos extratos obtidos com solventes hidroetanólicos, o extrato que obteve maior valor foi da cortiça (1448,16 mg de EQ/ g de extrato), sendo que nos extratos obtidos com solventes eutéticos, o que apresentou maior valor foi o extrato do tomilho (204,31 mg de EQ/ g de extrato).

No caso da atividade antioxidante, esta foi medida por três métodos diferentes, DPPH, ABTS e FRAP. No método DPPH, os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos apresentam maior atividade antioxidante, sendo que no geral, os extratos obtidos com o HE 1 apresentam valores da atividade mais elevados que os obtidos com o HE 2. Nos extratos obtidos com os solventes eutéticos os que apresentaram maior atividade foram os obtidos com o SE 2. Nos extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos, os que apresentaram maior poder antioxidante foram o extrato da cortiça (EC_{50} de 0,346 mg/mL) e do eucalipto (EC_{50} de 0,551 mg/mL) e nos extratos obtidos com os solventes eutéticos, os que apresentaram maior poder antioxidante foram o extrato de cacau (EC_{50} de 1,769 mg/mL) e de eucalipto (EC_{50} de 0,796 mg/mL). No método ABTS, os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos apresentaram maior atividade antioxidante, sendo que no geral, os obtidos com o HE 1 a atividade foi superior aos obtidos com o HE 2. Nos extratos obtidos com os solventes eutéticos os que apresentaram maior atividade foi os obtidos com o SE 3. Nos extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos os que apresentaram maior poder antioxidante foi o extrato da cortiça (EC_{50} de 28,840 mg/mL) e do eucalipto (EC_{50} de 33,931 mg/mL) e nos extratos obtidos com os solventes eutéticos, o extrato que apresentou

maior poder antioxidante foi o extrato de eucalipto (EC_{50} de 98,886 mg/mL). Por último, no ensaio FRAP, os extratos obtidos com o HE 2 a atividade foi superior face aos obtidos com a HE 1. Nos extratos obtidos com os solventes eutéticos os que apresentaram maior atividade foram os obtidos com o SE 3. Nos extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos os que apresentaram maior poder antioxidante foram o extrato de lavanda (9,964 mg de ET/ g de extrato) e de cacau (7,221 mg de ET/ g de extrato) e nos extratos obtidos com os solventes eutéticos, os extratos que apresentaram maior poder antioxidante foram o extrato de tomilho (6,988 mg de ET/ g de extrato) e de eucalipto (9,124 mg de ET/ g de extrato). No fator de proteção solar, os extratos obtidos com solventes hidroetanólicos apresentaram maior fator de proteção solar, sendo que no geral, os obtidos com o HE 1 foram superiores aos obtidos com o HE 2. Nos extratos obtidos com solventes eutéticos os que apresentaram maior fator de proteção solar foram os obtidos com o SE 2. Os extratos que obtiveram maior fator de proteção solar foram os extratos da cortiça (FPS de 10,427) e do eucalipto (FPS de 8,696). Na inibição da atividade da tirosinase, os extratos obtidos com os solventes hidroetanólicos foram melhores, com a exceção do extrato da lavanda. O extrato de tomilho foi o que apresentou maior percentagem de inibição (34,4 - 46%), seguido do extrato do cacau (28,4 - 41,2%), depois o extrato de eucalipto (26,6 - 40,1%), posteriormente o extrato de cortiça (27,2 - 38,6%) e, por fim, o extrato de lavanda (22 - 35,9%).

Por fim, foi possível produzir nanopartículas estáveis durante 91 dias, sendo que estas apresentaram os valores esperados, pelo que consta na literatura, no que diz respeito ao tamanho (195 a 281 nm) e ao índice de polidispersividade (0,270 a 0,394). No caso da carga (35 a 38 mV), os resultados obtidos no presente estudo foram superiores aos que constam na literatura. Posteriormente, foi possível fazer a libertação controlada dos extratos, tendo-se destacado os extratos do eucalipto (42%) e do cacau (26%).

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou a eficácia dos solventes eutéticos, em conjugação com métodos de extração alternativos e inovadores, na extração de compostos bioativos de diferentes fontes naturais. Os extratos obtidos mostraram conteúdo em fenólicos e flavonoides significativo, atividade antioxidante relevante e propriedades fotoprotetoras. Adicionalmente, os extratos demonstraram elevada percentagem de inibição da tirosinase, a enzima crucial no processo da síntese de melanina, o que revela potencial para a sua aplicação no tratamento de doenças pigmentares.

Foi ainda possível utilizar os extratos obtidos com solventes eutéticos no desenvolvimento de uma alternativa promissora e amiga do ambiente na encapsulação dos diversos extratos nas nanopartículas de quitosano de modo a promover a entrega e aumentar a biodisponibilidade dos bioativos presentes no extrato.

Com base nos resultados obtidos, e perspectivando trabalhos experimentais futuros, propõem-se:

- Incorporar os extratos em formulações cosméticas e avaliar do seu desempenho final, através de testes de estabilidade, atividade antimicrobiana e efeito antioxidante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade protetora anti-UV dos extratos naturais encapsulados nas nanopartículas de quitosano, de modo a poder adicioná-las a cremes ou loções;
- Testar a inibição da enzima nas nanopartículas de quitosano com os extratos encapsulados;
- Avaliar a permeação transdérmica;
- Otimizar a encapsulação dos extratos;
- Estudar outros meios de libertação controlada.

6. Referências Bibliográficas

- A COMPREHENSIVE REVIEW ON HERBAL COSMETICS / INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH*. (2017, novembro 30). <https://ijpsr.com/bft-article/a-comprehensive-review-on-herbal-cosmetics/>
- Abideen, F., Balakrishnan, S., Sindhu, C. B., George, S., & Sanker, A. (2021). A unique case of borderline lepromatous leprosy presenting with both hypopigmented and hyperpigmented macules. *Leprosy Review*, *92*(4), 412–420. <https://doi.org/10.47276/lr.92.4.412>
- Afaq, F., & Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *11*(14), 1200–1215. <https://doi.org/10.2174/13895575111091200>
- Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Rostamkalaei, S. S., Asadi, M., Asare-Addo, K., & Nokhodchi, A. (2016). The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *145*, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.064>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Amico, S., Barnette, T., Dequidt, L., Fauconneau, A., Gérard, E., Boursault, L., Boniface, K., Darrigade, A.-S., & Seneschal, J. (2020). Characteristics of postinflammatory hyper- and hypopigmentation in patients with psoriasis: A survey study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *83*(4), 1188–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.02.025>
- An, Q., Ren, J.-N., Li, X., Fan, G., Qu, S.-S., Song, Y., Li, Y., & Pan, S.-Y. (2021). Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food & Function*, *12*(21), 10370–10389. <https://doi.org/10.1039/D1FO02120F>
- Andrew, J., Masetlwa, J., Tesfaye, T., & Sithole, B. (2020). Beneficiation of eucalyptus tree barks in the context of an integrated biorefinery – Optimisation of accelerated solvent extraction (ASE) of polyphenolic compounds using response surface methodology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *18*, 100327. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100327>
- Aneklaphakij, C., Chamnanpuen, P., Bunsupa, S., & Satitpatipan, V. (2022). Recent Green Technologies in Natural Stilbenoids Production and Extraction: The Next Chapter in the Cosmetic Industry. *Cosmetics*, *9*(5), Artigo 5. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9050091>
- Anitha, S., Krishnan, S., Senthilkumar, K., & Sasirekha, V. (2021). A comparative investigation on the scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical by the natural antioxidants (+) catechin and (-) epicatechin. *Journal of Molecular Structure*, *1242*, 130805. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130805>
- Ashawat, M., Banchhor, M., Saraf, S., & Saraf, S. (2009). Herbal Cosmetics: Trends in Skin Care Formulation. *Pharmacognosy Reviews*, *5*, 82–89.
- Baek, S. H., Cao, L., Jeong, S. J., Kim, H.-R., Nam, T. J., & Lee, S. G. (2021). The Comparison of Total Phenolics, Total Antioxidant, and Anti-Tyrosinase Activities of Korean *Sargassum* Species. *Journal of Food Quality*, *2021*, e6640789. <https://doi.org/10.1155/2021/6640789>
- Balogh, T. S., Velasco, M. V. R., Pedriali, C. A., Kaneko, T. M., & Baby, A. R. (2011). Ultraviolet radiation protection: Current available resources in photoprotection. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, *86*(4), 732–742. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000400016>
- Baranwal, A., Aggarwal, P., Rai, A., & Kumar, N. (2022). *Pharmacological Actions and Underlying Mechanisms of Catechin: A Review* [Text]. Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/1389557521666210902162120>
- Becker, L. C., Akinsulie, A., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C.,

- Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Heldreth, B. (2023). Safety Assessment of Eucalyptus globulus (Eucalyptus)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 42(1_suppl), 57S-92S. <https://doi.org/10.1177/10915818231164354>
- Benamer Oudih, S., Tahtat, D., Nacer Khodja, A., Mahlous, M., Hammache, Y., Guittoum, A.-E., & Kebbouche Gana, S. (2023). Chitosan nanoparticles with controlled size and zeta potential. *Polymer Engineering & Science*, 63(3), 1011–1021. <https://doi.org/10.1002/pen.26261>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bernatoniene, J., Masteikova, R., Davalgienė, J., Peciūra, R., Gauryliene, R., Bernatoniene, R., Majiene, D., Lazauskas, R., Civinskiene, G., Velziene, S., Muselik, J., & Chalupova, Z. (2011). Topical application of Calendula officinalis (L.): Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 868–877.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brugè, F., Damiani, E., Marcheggiani, F., Offerta, A., Puglia, C., & Tiano, L. (2015). A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(2), 879–885. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.033>
- Cadoná, F. C., Dantas, R. F., de Mello, G. H., & Silva-Jr, F. P. (2022). Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(26), 7222–7241. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1913091>
- Carr, M. K. V., & Lockwood, G. (2011). THE WATER RELATIONS AND IRRIGATION REQUIREMENTS OF COCOA (THEOBROMA CACAO L.): A REVIEW. *Experimental Agriculture*, 47(4), 653–676. <https://doi.org/10.1017/S0014479711000421>
- Carriço, C., Ribeiro, H. M., & Marto, J. (2018). Converting cork by-products to ecofriendly cork bioactive ingredients: Novel pharmaceutical and cosmetics applications. *Industrial Crops and Products*, 125, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.092>
- Crişan, I., Ona, A., Vârban, D., Muntean, L., Vârban, R., Stoie, A., Mihăiescu, T., & Morea, A. (2023). Current Trends for Lavender (Lavandula angustifolia Mill.) Crops and Products with Emphasis on Essential Oil Quality. *Plants*, 12(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/plants12020357>
- Datta, H. S., & Paramesh, R. (2010). Trends in aging and skin care: Ayurvedic concepts. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 1(2), 110–113. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.65081>
- Daussin, F. N., Heyman, E., & Burelle, Y. (2021). Effects of (–)-epicatechin on mitochondria. *Nutrition Reviews*, 79(1), 25–41. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa094>
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149.
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), Artigo 17. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Dini, I., & Laneri, S. (2021). The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules*, 26(13), Artigo 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26133921>
- Dong, J., Wu, G., Dong, Z., Yang, D., Bo, Y., An, M., & Zhao, L. (2021). Natural deep eutectic solvents

- as tailored and sustainable media for the extraction of five compounds from compound liquorice tablets and their comparison with conventional organic solvents. *RSC Advances*, *11*(59), 37649–37660. <https://doi.org/10.1039/D1RA06338C>
- Ebrahimpzadeh, M. A., Enayatifard, R., Khalili, M., Ghaffarloo, M., Saeedi, M., & Yazdani Charati, J. (2014). Correlation between Sun Protection Factor and Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of some Medicinal Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, *13*(3), 1041–1047.
- Egil, A. C., Ozdemir, B., Gok, B., Kecel-Gunduz, S., & Budama-Kilinc, Y. (2020). Synthesis, characterization, biological activities and molecular docking of Epilobium parviflorum aqueous extract loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *161*, 947–957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.066>
- El Achkar, T., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *19*(4), 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Anahi Dandlen, S., Majdoub, N., Lyoussi, B., Raposo, S., Dulce Antunes, M., Gomes, V., & Graça Miguel, M. (2019). Antioxidant Activity of Thyme Waste Extract in O/W Emulsions. *Antioxidants*, *8*(8), Artigo 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8080243>
- Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X., & Gong, D. (2017). Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Research International*, *100*, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.010>
- Felice, F., Fabiano, A., De Leo, M., Piras, A. M., Beconcini, D., Cesare, M. M., Braca, A., Zambito, Y., & Di Stefano, R. (2020). Antioxidant Effect of Cocoa By-Product and Cherry Polyphenol Extracts: A Comparative Study. *Antioxidants*, *9*(2), 132. <https://doi.org/10.3390/antiox9020132>
- Feng, D., Fang, Z., & Zhang, P. (2022). The melanin inhibitory effect of plants and phytochemicals: A systematic review. *Phytomedicine*, *107*, 154449. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154449>
- Freitas, D. S., Rocha, D., Castro, T. G., Noro, J., Castro, V. I. B., Teixeira, M. A., Reis, R. L., Cavaco-Paulo, A., & Silva, C. (2022). Green Extraction of Cork Bioactive Compounds Using Natural Deep Eutectic Mixtures. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *10*(24), 7974–7989. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01422>
- Glass, G. E. (2020). Cosmeceuticals: The Principles and Practice of Skin Rejuvenation by Nonprescription Topical Therapy. *Aesthetic Surgery Journal Open Forum*, *2*(4), oja038. <https://doi.org/10.1093/asjof/ojaa038>
- Gokce, E. H., Korkmaz, E., Deller, E., Sandri, G., Bonferoni, M. C., & Ozer, O. (2012). Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: Evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 1841–1850. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29710>
- González, S., Fernández-Lorente, M., & Gilaberte-Calzada, Y. (2008). The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*, *26*(6), 614–626. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.09.010>
- Granata, G., Stracquadanio, S., Leonardi, M., Napoli, E., Malandrino, G., Cafiso, V., Stefani, S., & Geraci, C. (2021). Oregano and Thyme Essential Oils Encapsulated in Chitosan Nanoparticles as Effective Antimicrobial Agents against Foodborne Pathogens. *Molecules*, *26*(13), Artigo 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26134055>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, *11*(8), Artigo 8. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Muneke, P. E. S., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2020). Value-Added Compound Recovery from Invasive Forest for Biofunctional Applications: Eucalyptus Species as a Case Study. *Molecules*, *25*(18), Artigo 18. <https://doi.org/10.3390/molecules25184227>

- Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2018). Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules*, 23(7), Artigo 7. <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>
- Hanamura, T., Uchida, E., & Aoki, H. (2008). Skin-lightening effect of a polyphenol extract from Acerola (Malpighia emarginata DC.) fruit on UV-induced pigmentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(12), 3211–3218. <https://doi.org/10.1271/bbb.80421>
- Hapsari, S., Yohed, I., Kristianita, R. A., Jadid, N., Aparamarta, H. W., & Gunawan, S. (2022). Phenolic and flavonoid compounds extraction from Calophyllum inophyllum leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 103666. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103666>
- Hawrył, A., Hawrył, M., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2019). Liquid chromatography fingerprint analysis and antioxidant activity of selected lavender species with chemometric calculations. *PLOS ONE*, 14(7), e0218974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218974>
- Healey, A. L., Shepherd, M., King, G. J., Butler, J. B., Freeman, J. S., Lee, D. J., Potts, B. M., Silva-Junior, O. B., Baten, A., Jenkins, J., Shu, S., Lovell, J. T., Sreedasyam, A., Grimwood, J., Furtado, A., Grattapaglia, D., Barry, K. W., Hundley, H., Simmons, B. A., ... Henry, R. J. (2021). Pests, diseases, and aridity have shaped the genome of *Corymbia citriodora*. *Communications Biology*, 4(1), Artigo 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02009-0>
- Hernández-Hernández, C., Fernández-Cabanás, V. M., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Prior, Á., & Morales-Sillero, A. (2022). Rapid screening of unground cocoa beans based on their content of bioactive compounds by NIR spectroscopy. *Food Control*, 131, 108347. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108347>
- Hoang, H. T., Moon, J.-Y., & Lee, Y.-C. (2021). Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics*, 8(4), Artigo 4. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>
- Hojerová, J., Medovčíková, A., & Mikula, M. (2011). Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1–2), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.040>
- Hsu, C.-K., Chang, C.-T., Lu, H.-Y., & Chung, Y.-C. (2007). Inhibitory effects of the water extracts of *Lavendula* sp. On mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry*, 105(3), 1099–1105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.008>
- Hui, L., He, L., Huan, L., Xiaolan, L., & Aiguo, Z. (2010). Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4.
- Hussein, M. R. (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: Molecular mechanisms. *Journal of Cutaneous Pathology*, 32(3), 191–205. <https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2005.00281.x>
- Janádia, P., & Fernandes, F. (2019). *Mechanisms of action of dermocosmetic assets involved in the process of skin stainless clarification*.
- Ji, F., Guo, Y., Wang, M., Wu, Z., Shi, Y., Zhao, X., Wang, H., Feng, X., & Zhao, G. (2021). Excited state electronic structures and photochemistry of different oxidation states of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 253, 119503. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119503>
- Kale, S., Kavade, E., & A.V.Yadav. (2012). Formulation and In-vitro Evaluation for Sun Protection Factor of *Crinum asiaticum* Linn flower (Family-Amaryllidaceae) Extract Sunscreen Creams. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 46(2). <https://www.ijper.org/article/123>
- Kambayashi, H., Yamashita, M., Otake, Y., Takada, K., Funasaka, Y., & Ichihashi, M. (2001). Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *Journal of Dermatological Science*, 27, 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(01\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(01)00113-X)

- Kang, T. H., Park, H. M., Kim, Y.-B., Kim, H., Kim, N., Do, J.-H., Kang, C., Cho, Y., & Kim, S. Y. (2009). Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.022>
- Karabörklü, S., & Ayvaz, A. (2023). A comprehensive review of effective essential oil components in stored-product pest management. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130(3), 449–481. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00712-0>
- Katiyar, S. K. (2007). UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: Chemoprevention by dietary botanical agents. *Cancer letters*, 255(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.02.010>
- Kaur, C. D., & Saraf, S. (2010). In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*, 2(1), 22–25. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60586>
- Kelidari, H. R., Saeedi, M., Akbari, J., Morteza-Semnani, K., Gill, P., Valizadeh, H., & Nokhodchi, A. (2015). Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.046>
- Kelidari, H. R., Saeedi, M., Hajheydari, Z., Akbari, J., Morteza-Semnani, K., Akhtari, J., Valizadeh, H., Asare-Addo, K., & Nokhodchi, A. (2016). Spironolactone loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of mild and moderate acne vulgaris: A randomized, double-blind, prospective trial. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.042>
- Kharraf, S. E., El-Guendouz, S., Farah, A., Mateus, M. C., Hadrami, E. M. E., & Miguel, M. G. (2023). Impact of fifteen combinations of the main components of rosemary, lavender and citrus essential oils on in vitro biological activities. *South African Journal of Botany*, 156, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.02.034>
- Khezri, K., Saeedi, M., & Maleki Dizaj, S. (2018). Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1499–1505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.084>
- Kosakowska, O., Bączek, K., Przybył, J. L., Pawełczak, A., Rolewska, K., & Węglarz, Z. (2020). Morphological and Chemical Traits as Quality Determinants of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the Example of ‘Standard Winter’ Cultivar. *Agronomy*, 10(6), Artigo 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060909>
- Kullavanijaya, P., & Lim, H. W. (2005). Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(6), 937–958; quiz 959–962. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>
- Küpeli Akkol, E., Genç, Y., Karpuz, B., Sobarzo-Sánchez, E., & Capasso, R. (2020). Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. *Cancers*, 12(7), Artigo 7. <https://doi.org/10.3390/cancers12071959>
- Lafhal, S., Bombarda, I., Dupuy, N., Jean, M., Ruiz, K., Vanlout, P., & Vanthuyne, N. (2020). Chiroptical fingerprints to characterize lavender and lavandin essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1610, 460568. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460568>
- Lautenschlager, S., Wulf, H. C., & Pittelkow, M. R. (2007). Photoprotection. *Lancet (London, England)*, 370(9586), 528–537. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60638-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60638-2)
- Lee, S. Y., Liang, Y. N., Stuckey, D. C., & Hu, X. (2023). Single-step extraction of bioactive compounds from cruciferous vegetable (kale) waste using natural deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 317, 123677. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123677>
- Li, J., Li, C., Peng, X., Li, S., Liu, B., & Chu, C. (2023). Recent discovery of tyrosinase inhibitors in traditional Chinese medicines and screening methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 303, 115951. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115951>

- Li, Y., Liu, X., & Zhang, R. (2017). Sensitive and selective colorimetric detection of glutathione in human plasma with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and Ag⁺ ion. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 880–885. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.10.048>
- Lin, C.-W., Yu, C.-W., Wu, S.-C., & Yih, K.-H. (2020). DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(5). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2594>
- Lin, J. Y., & Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130), 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature05660>
- Liu, X., Fu, Q., Xu, P., Zhu, P., Yang, Z., & Crittenden, J. C. (2022). Rapid determination of monopersulfate with bromide ion-catalyzed oxidation of 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). *Chemical Engineering Journal*, 433, 133551. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133551>
- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., & Jiang, Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.001>
- Madireddy, S., & Crane, J. (2023). Hypopigmented Macules. *StatPearls*. <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/23283>
- Maleki Dizaj, S., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M., Adibkia, K., & Lotfipour, F. (2015). Calcium carbonate nanoparticles; Potential in bone and tooth disorders. *Pharmaceutical Sciences*, 20, 175–182. <https://doi.org/10.5681/PS.2015.008>
- Maleki Dizaj, S., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.-H., & Adibkia, K. (2015). Box-Behnken experimental design for preparation and optimization of ciprofloxacin hydrochloride-loaded CaCO₃ nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 29, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.06.015>
- Maleki Dizaj, S., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.-H., & Adibkia, K. (2016). Application of Box–Behnken design to prepare gentamicin-loaded calcium carbonate nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(6), 1475–1481. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1042108>
- Maleki Dizaj, S., Mennati, A., Jafari, S., Khezri, K., & Adibkia, K. (2015). Antimicrobial Activity of Carbon-Based Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(1), 19–23. <https://doi.org/10.5681/apb.2015.003>
- Miao, J., Du, Y.-Z., Yuan, H., Zhang, X.-G., & Hu, F.-Q. (2013). Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 110, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.037>
- Moazeni, M., Kelidari, H. R., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Nabili, M., Gohar, A. A., Akbari, J., Lotfali, E., & Nokhodchi, A. (2016). Time to overcome fluconazole resistant *Candida* isolates: Solid lipid nanoparticles as a novel antifungal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.013>
- Mokhtari, R., Kazemi Fard, M., Rezaei, M., Moftakharzadeh, S. A., & Mohseni, A. (2023). Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of Phenolic Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Thyme–Sage Mixture Extracts. *Journal of Food Quality*, 2023, e2602454. <https://doi.org/10.1155/2023/2602454>
- Momtaz, S., Lall, N., & Basson, A. (2008). Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. *South African Journal of Botany*, 74(4), 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.02.005>
- Mongkhlorattanasit, R., Kryštůfek, J., Wiener, J., & Víková, M. (2011). UV protection properties of silk fabric dyed with eucalyptus leaf extract. *The Journal of The Textile Institute*, 102(3), 272–279.

- <https://doi.org/10.1080/00405001003722369>
- Moreiras, H., Seabra, M. C., & Barral, D. C. (2021). Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4466. <https://doi.org/10.3390/ijms22094466>
- Mota, S., Pinto, C., Cravo, S., Rocha e Silva, J., Afonso, C., Sousa Lobo, J. M., Tiritan, M. E., Cidade, H., & Almeida, I. F. (2022). Quercus suber: A Promising Sustainable Raw Material for Cosmetic Application. *Applied Sciences*, 12(9), Artigo 9. <https://doi.org/10.3390/app12094604>
- Mukhriani, M., Rifai, Y., Djabir, Y. Y., Fawwaz, M., & Alam, G. (2023). Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activity of Paederia foetida L. *Indonesian Journal of Pharmacy*. <https://doi.org/10.22146/ijp.4486>
- Munekata, P. E. S., Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Jambrak, A. R., Gavahian, M., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2020). Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. *Food Research International*, 134, 109242. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109242>
- Nair, R. S., Morris, A., Billa, N., & Leong, C.-O. (2019). An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 20(2), 69. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1279-6>
- Niu, C., & Aisa, H. A. (2017). Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules*, 22(8), Artigo 8. <https://doi.org/10.3390/molecules22081303>
- Oomen, W. W., Begines, P., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2020). Natural Deep Eutectic Solvent Extraction of Flavonoids of Scutellaria baicalensis as a Replacement for Conventional Organic Solvents. *Molecules*, 25(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.3390/molecules25030617>
- Oracz, J., & Nebesny, E. (2016). Antioxidant Properties of Cocoa Beans (Theobroma cacao L.): Influence of Cultivar and Roasting Conditions. *International Journal of Food Properties*, 19(6), 1242–1258. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1071840>
- Palm, M. D., & O'Donoghue, M. N. (2007). Update on photoprotection. *Dermatologic Therapy*, 20(5), 360–376. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00150.x>
- Palma, A., Díaz, M. J., Ruiz-Montoya, M., Morales, E., & Giraldez, I. (2021). Ultrasound extraction optimization for bioactive molecules from Eucalyptus globulus leaves through antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105654. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105654>
- Papakostas, D., Rancan, F., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., & Vogt, A. (2011). Nanoparticles in dermatology. *Archives of Dermatological Research*, 303(8), 533–550. <https://doi.org/10.1007/s00403-011-1163-7>
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.-S., Cho, C., Hong, M.-C., Shin, M.-K., & Bae, H. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research: PTR*, 20(11), 921–934. <https://doi.org/10.1002/ptr.1954>
- Peixoto, R. F. (2015). JANAINA NOGUEIRA DOS SANTOS1, SUZANA ESTER NASCIMENTO OGAVA2.
- Pissavini, M., Alard, V., Heinrich, U., Jenni, K., Perier, V., Tournier, V., Lutz, D., Meloni, M., Kockott, D., Ferrero, L., Gonzalez, B., Zastrow, L., & Tronnier, H. (2007). In vitro assessment of water resistance of sun care products: A reproducible and optimized in vitro test method. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(6), 451–460. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00407.x>
- Prakash, M., Basavaraj, B. V., & Chidambara Murthy, K. N. (2019). Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. *Journal of Functional Foods*, 52, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.021>

- Pries, R., Jeschke, S., Leichtle, A., & Bruchhage, K.-L. (2023). Modes of Action of 1,8-Cineol in Infections and Inflammation. *Metabolites*, 13(6), Artigo 6. <https://doi.org/10.3390/metabo13060751>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Revisão da Atividade Terapêutica do Pineno (C10H16): Um Óleo Essencial | Jornal Internacional de Pesquisa Avançada em Farmácia e Educação.* (2020). <http://medicaljournalshouse.com/index.php/ADR-Pharmacy-Education/article/view/421>
- Rodríguez De Luna, S. L., Ramírez-Garza, R. E., & Serna Saldivar, S. O. (2020). Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *The Scientific World Journal*, 2020, e6792069. <https://doi.org/10.1155/2020/6792069>
- Roy, A., Sahu, R. K., Matlam, M., Deshmukh, V. K., Dwivedi, J., & Jha, A. K. (2013). In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 97–106. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120507>
- Salehi, B., Upadhyay, S., Erdogan Orhan, I., Kumar Jugran, A., L. D. Jayaweera, S., A. Dias, D., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., C. Cho, W., & Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*, 9(11), Artigo 11. <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- Sales, A., Felipe, L. de O., & Bicas, J. L. (2020). Production, Properties, and Applications of α -Terpineol. *Food and Bioprocess Technology*, 13(8), 1261–1279. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02461-6>
- Sampaio, T., Gonçalves, E., Patrício, M. S., Cota, T. M., & Almeida, M. H. (2019). Seed origin drives differences in survival and growth traits of cork oak (*Quercus suber* L.) populations. *Forest Ecology and Management*, 448, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.05.001>
- Sankhyan, A., & Pawar, P. (2012). Recent Trends in Niosome as Vesicular DrugDelivery System. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, .(Issue), 20–32. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2625>
- Santos, S. A. O., Pinto, P. C. R. O., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, 31(3), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.02.001>
- Saraf, S., & Kaur, C. D. (2010). Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. *Pharmacognosy Reviews*, 4(7), 1–11. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.65319>
- Satooka, H., & Kubo, I. (2011). Effects of Thymol on Mushroom Tyrosinase-Catalyzed Melanin Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8908–8914. <https://doi.org/10.1021/jf2014149>
- Seo, E., Shin, Y. K., Hsieh, Y. S., Lee, J.-M., & Seol, G. H. (2021). Linalyl acetate as a potential preventive agent against muscle wasting in rheumatoid arthritis rats chronically exposed to nicotine. *Journal of Pharmacological Sciences*, 147(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.05.003>
- Sgarbi, F. C., Carmo, E. D. do, & Rosa, L. E. B. (2007). Radiação ultravioleta e carcinogênese. *Rev. ciênc. méd., (Campinas)*, 245–250.
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Castillo, C. M. S., Caroca, R., Lazo-Vélez, M. A., Antonyak, H., Polishchuk, A., Lysiuk, R., Oliinyk, P., De Masi, L., Bontempo, P., Martorell, M., Daştan, S. D., Rigano, D., Wink, M., & Cho, W. C. (2022). Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, e3848084. <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>

- Sharma, V. K., Choi, J., Sharma, N., Choi, M., & Seo, S.-Y. (2004). In vitro anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. *Phytotherapy Research*, *18*(10), 841–844. <https://doi.org/10.1002/ptr.1428>
- Shrotriya, S., Ranpise, N., Satpute, P., & Vidhate, B. (2018). Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *46*(7), 1471–1482. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1373659>
- Silva, A. M., Félix, L. M., Teixeira, I., Martins-Gomes, C., Schäfer, J., Souto, E. B., Santos, D. J., Bunzel, M., & Nunes, F. M. (2021). Orange thyme: Phytochemical profiling, in vitro bioactivities of extracts and potential health benefits. *Food Chemistry: X*, *12*, 100171. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100171>
- Singh, S., Sharma, N., Zahoor, I., Behl, T., Antil, A., Gupta, S., Anwer, M. K., Mohan, S., & Bungau, S. G. (2023). Decrypting the Potential of Nanotechnology-Based Approaches as Cutting-Edge for Management of Hyperpigmentation Disorder. *Molecules*, *28*(1), Artigo 1. <https://doi.org/10.3390/molecules28010220>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research*, *19*(6), 550–571. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x>
- Soleimani, M., Arzani, A., Arzani, V., & Roberts, T. H. (2022). Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme. *Journal of Herbal Medicine*, *36*, 100604. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100604>
- Stanfield, J., Osterwalder, U., & Herzog, B. (2010). In vitro measurements of sunscreen protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *9*(4), 489–494. <https://doi.org/10.1039/b9pp00181f>
- Svobodova, A., Walterova, D., & Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, *150*(1), 25–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Tanase, C., Nicolescu, A., Nisca, A., Ștefănescu, R., Babotă, M., Mare, A. D., Ciurea, C. N., & Man, A. (2022). Biological Activity of Bark Extracts from Northern Red Oak (*Quercus rubra* L.): An Antioxidant, Antimicrobial and Enzymatic Inhibitory Evaluation. *Plants*, *11*(18), Artigo 18. <https://doi.org/10.3390/plants11182357>
- Tasneem Husain, Gulafsha Kassab, Darakhshan Khan, & Sharique A Ali. (2022). Insights into the treatment strategies for hypopigmentation disorders by natural herbs: Current updates and future prospects. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, *12*(3), 183–193. <https://doi.org/10.30574/wjbphs.2022.12.3.0228>
- Todorovic, V., Milenkovic, M., Vidovic, B., Todorovic, Z., & Sobajic, S. (2017). Correlation between Antimicrobial, Antioxidant Activity, and Polyphenols of Alkalized/Nonalkalized Cocoa Powders. *Journal of Food Science*, *82*(4), 1020–1027. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13672>
- Vaezi, M. (2023). Structure and inhibition mechanism of some synthetic compounds and phenolic derivatives as tyrosinase inhibitors: Review and new insight. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *41*(10), 4798–4810. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2069157>
- Vitta, Y., Figueroa, M., Calderon, M., & Ciangherotti, C. (2020). Synthesis of iron nanoparticles from aqueous extract of *Eucalyptus robusta* Sm and evaluation of antioxidant and antimicrobial activity. *Materials Science for Energy Technologies*, *3*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.10.014>

- Wang, K.-H., Lin, R.-D., Hsu, F.-L., Huang, Y.-H., Chang, H.-C., Huang, C.-Y., & Lee, M.-H. (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.010>
- Wijayadi, L. J., & Kelvin, K. (2023). The Effect of Natural Essential Oil Depigmenting Agent for Alternative Treatment of Melasma. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 770–779. <https://doi.org/10.22146/jfps.6131>
- Wojtunik-Kulesza, K. A. (2020). Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. *Molecules*, 25(22), Artigo 22. <https://doi.org/10.3390/molecules25225267>
- Yang, B., Wang, J., Zhao, M., Liu, Y., Wang, W., & Jiang, Y. (2006). Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities. *Carbohydrate Research*, 341(5), 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.01.004>
- Yasui, H., & Sakurai, H. (2003). Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. *Experimental Dermatology*, 12(5), 655–661. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2003.00033.x>
- Yeo, J., & Shahidi, F. (2019). Revisiting DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay as a useful tool in antioxidant evaluation: A new IC100 concept to address its limitations. *Journal of Food Bioactives*, 7. <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.7196>
- Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020). Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules*, 25(9), Artigo 9. <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>
- Yukuyama, M. N., Ghisleni, D. D. M., Pinto, T. J. A., & Bou-Chacra, N. A. (2016). Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics – a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 13–24. <https://doi.org/10.1111/ics.12260>
- Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., & Naaz, I. (2014). Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. *Biochemistry Research International*, 2014, e854687. <https://doi.org/10.1155/2014/854687>
- Zambito, Y., Fabiano, A., Beconcini, D., Di Stefano, R., & Santoni, T. (2020). *Nanoparticles of Cocoa Extract and Use Thereof as Antioxidants*. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=W02020128988>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zou, C., Huang, W., Zhao, G., Wan, X., Hu, X., Jin, Y., Li, J., & Liu, J. (2017). Determination of the Bridging Ligand in the Active Site of Tyrosinase. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 1836. <https://doi.org/10.3390/molecules22111836>
- Zubaydah, W. O. S., Sartinah, A., Nuralifah, Waelti, Sabarudin, & Yamin. (2022). In vitro antioxidant activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L) peel. *Food Research*, 6(4), 287–294. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(4\).477](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(4).477)