

 M 2021

U. PORTO
FEUP FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

VALORIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PROVENIENTES DE FONTES NATURAIS PARA APLICAÇÃO EM COSMÉTICA

SARA MOURA FERREIRA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Valorização de compostos bioativos provenientes de fontes naturais para aplicação em cosmética

Dissertação de Mestrado em Engenharia Química

Especialização em Biotecnologia

de

Sara Moura Ferreira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

LEPABE



Orientador na FEUP: Professora Doutora Lúcia Santos



Porto, julho de 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Lúcia Santos, pela oportunidade que me deu para desenvolver este projeto, assim como pela disponibilidade, atenção, ajuda e dedicação ao longo dos últimos meses.

Gostaria de agradecer ainda à Inês Vilarinho, por toda a ajuda e colaboração ao longo da realização deste projeto, assim como à Zizina Falé, por estarem sempre dispostas a experimentar os meus cremes e pelo apoio que me deram.

Gostaria de agradecer a todos os elementos pertencentes aos laboratórios E201, do Departamento de Engenharia Química, pelo seu apoio e disponibilidade, assim como pelo material e equipamento emprestado.

Também, gostaria de agradecer à Tânia Tavares, do laboratório F301 do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, pela sua ajuda a nível dos testes antioxidantes e a pelos reagentes

Um agradecimento especial aos técnicos de laboratório – Fátima, Joana, Sílvia, Carla e Zé Luís – pela constante disponibilidade e ajuda.

Um agradecimento também à estudante do MIEQ, Joana Cancela, que gentilmente forneceu as amostras de grainha de uva.

À minha mãe e ao meu pai, por todo o apoio e motivação, por estarem sempre do meu lado e por todas as oportunidades que sempre me proporcionaram. À minha irmã, Maria, por estar sempre lá para mim, por ser a pessoa que mais acredita que eu consigo e por ser o meu exemplo. Aos três, obrigada por tudo.

Ao Marcelino, por toda a paciência que tem comigo e por toda a ajuda e motivação que sempre me deu.

Aos meus amigos e familiares, por todo o carinho, apoio e companheirismo.

Por fim, à minha avó por acreditar sempre em mim, por estar sempre ao meu lado e por toda a força que sempre me deu.

Este trabalho foi financiado por: Financiamento Base - UIDB/00511/2020 da Unidade de Investigação - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE - financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).

Resumo

O principal objetivo do trabalho realizado consistiu no desenvolvimento de um creme de rosto rico em ingredientes de origem natural, pelos seus benefícios em termos de sustentabilidade ambiental, social e económica.

A grainha de uva e as cascas de limão são subprodutos gerados na indústria agro-alimentar, cujo tratamento inadequado, descarte e acumulação gera problemas socioeconómicos e ambientais. No entanto, é possível a valorização destes subprodutos, obtendo extratos dos seus compostos bioativos, como os compostos fenólicos (antioxidantes), vitamina E e ácidos gordos, da grainha e óleo essencial das cascas de limão.

O projeto compreendeu quatro etapas. Na primeira, procedeu-se à extração dos compostos bioativos. Assim, obteve-se o extrato fenólico e o óleo de grainha de uva, pelo método de extração sólido-líquido usando extrator Soxhlet, cujos rendimentos obtidos foram, respetivamente, de 16,65 % e 12,46 %. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, obtendo-se um rendimento de extração de 0,76 %.

A segunda etapa consistiu na determinação da capacidade antioxidante, pelo ensaio com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o método da capacidade antioxidante total (TAC), e antimicrobiana. O extrato e o óleo de grainha apresentaram, respetivamente, 89,90 % e 20,90 % de inibição de DPPH e IC_{50} de $65,14 \mu\text{g}_{\text{extrato}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$ para o extrato e de $437,28 \mu\text{g}_{\text{óleo}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$ para o óleo. Pelo método TAC, o extrato fenólico apresentou capacidade antioxidante de $57,52 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{solução}}$. A capacidade antimicrobiana do extrato e dos óleos foi avaliada, verificando-se que, com exceção do óleo de grainha, inibiam o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

A última etapa consistiu no desenvolvimento de uma formulação preliminar de um creme facial composta por ingredientes naturais. Foram produzidos 7 cremes com ligeiras alterações na composição/quantidade dos estabilizadores de formulação (extrato e óleo de grainha, óleo essencial de limão e ainda o antioxidante sintético, BHT, usado como padrão). As formulações foram testadas quanto à sua estabilidade durante 21 dias e averiguou-se que se mantiveram estáveis no período de estudo.

Por último, com base nas formulações anteriores, produziu-se um creme de valor acrescentado pela adição de extrato e óleo de grainha e o óleo essencial da casca de limão. Obteve-se assim um creme de rosto com aroma cítrico e capacidade antioxidante, devido à presença de antioxidantes naturais que podem substituir a utilização dos compostos sintéticos. O produto foi avaliado e aprovado de forma manifestamente positiva por um painel composto por 44 pessoas em resposta a um inquérito.

Palavras-Chave: Grainha de Uvas; Cascas de Limão; Compostos Fenólicos; Antioxidantes; Cosméticos

Abstract

The primary purpose of this dissertation was the development of a face moisturizer rich in natural ingredients, due to their benefits in terms of environmental, social and economic sustainability.

Both grapeseed and lemon peels are agro-industrial by-products, whose inadequate treatment, disposal and accumulation generates socioeconomic and environmental concerns. Nevertheless, it is possible to valorise these by-products by obtaining extracts from their bioactive compounds, such as antioxidants (phenolic compounds), vitamin E, fatty acids from the grapeseed and essential oils from the lemon peels.

This project consisted in four different phases. The initial one, involved the extraction of the bioactive compounds. Thereby, the phenolic extract and the oil from grapeseed were extracted using solid-liquid extraction, with a Soxhlet extractor, whose yields were, respectively, 16.55 % and 12.46 %. The essential oils were obtained by hydrodistillation, achieving a yield of 0.76 %.

The second phase consisted in the determination of the antioxidant capacity by the assay with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the total antioxidant capacity (TAC), and antimicrobial capacity. The extract and oil from grapeseed showed, respectively, 89.90 % and 20.90 % of inhibition of DPPH and IC_{50} of $65.14 \mu\text{g}_{\text{extract}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$ for the extract and $437.28 \mu\text{g}_{\text{oil}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$ for the oil. By TAC method, the extract displayed antioxidant capacity of $57.52 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \cdot \text{mL}_{\text{solution}}^{-1}$. The antimicrobial capacity of the extract and oils was evaluated, revealing that, with exception of the grapeseed oil, inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.

The last stage involved the development of a preliminary formulation of a face moisturizer composed by natural ingredients. Seven formulations were produced with slight modifications in composition/quantities of formulation stabilizers (extract and oil from grapeseed, lemon essential oils and the synthetic antioxidant, BHT, used as standard). The formulations were studied towards their stability during 21 days and remained stable during the study period.

Finally, based on the previous formulations, an added-value moisturizer was produced, due to the addition of extract and oil from grapeseed and essential oils from lemon peels. The result was a face moisturizer with a citric aroma and an antioxidant capacity, due to the presence of natural antioxidants that can replace the use synthetic compounds. This product was evaluated and approved manifestly positively by a sample composed by 44 people, in response to an inquiry.

Key words: Grapeseed; Lemon peels; Phenolic Compounds; Antioxidants Cosmetics

Resumo Gráfico



Declaração

Eu, Sara Moura Ferreira, declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

SARA MOURA FERREIRA

(Sara Moura Ferreira)

Porto, 5 de julho de 2021

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Resumo</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>Resumo Gráfico</i>	<i>vii</i>
1 <i>Introdução</i>	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2 Organização da Dissertação	2
2 <i>Contexto e Estado da Arte</i>	3
2.1 Produtos Cosméticos	3
2.1.1 <i>Produtos de Hidratação da Pele</i>	3
2.2 Antioxidantes.....	5
2.3 Óleos Essenciais	6
2.4 Subprodutos Agrícolas.....	6
2.4.1 <i>Bagaço e Grainha de Uva</i>	7
2.4.1.1 Extrato Fenólico	10
2.4.1.2 Óleo de Grainha de Uva	11
2.4.2 <i>Cascas de Limão</i>	12
2.5 Extração dos Compostos Fenólicos da Grainha de Uva	13
2.5.1 <i>Extração Sólido-Líquido</i>	13
2.5.2 <i>Extração Assistida por Ultrassons</i>	14
2.6 Capacidade Antioxidante.....	16
2.7 Estabilidade do Creme de Rosto	17
3 <i>Design do Produto</i>	19
4 <i>Materiais e Métodos</i>	23
4.1 Reagentes	23
4.2 Equipamento	24

4.3	Obtenção e Tratamento das Grainhas de Uva.....	24
4.4	Obtenção do Extrato Fenólico e do Óleo de Grainha	24
4.5	Extração de Óleo Essencial da Casca de Limão	25
4.6	Capacidade Antioxidante.....	25
4.6.1	DPPH.....	25
4.6.2	TAC	25
4.7	Produção do Creme de Rosto	26
4.8	Testes de Estabilidade	27
4.8.1	Teste de pH	27
4.8.2	Viscosidade.....	27
4.8.3	Compatibilidade com a Pele.....	27
4.8.4	Teste de Capacidade de Espalhamento	27
4.8.5	Teste de Centrifugação.....	27
4.8.6	Teste de Estabilidade Térmica.....	27
4.9	Capacidade Antimicrobiana	28
4.10	Estabilidade Lipídica.....	28
4.11	Acondicionamento, destino e tratamento de resíduos	28
5	Resultados e Discussão	29
5.1	Obtenção do Extrato Fenólico e Óleo de Grainha.....	29
5.2	Obtenção do Óleo Essencial de Limão	31
5.3	Capacidade Antioxidante.....	32
5.4	Capacidade Antimicrobiana	34
5.5	Produção do Creme Hidratante	36
5.6	Ensaio de Estabilidade	37
5.7	Oxidação Lipídica	39
5.8	Avaliação do Produto Final.....	42
6	Conclusões	43
7	Avaliação do trabalho realizado.....	45

7.1	Objetivos Realizados	45
7.2	Trabalho Futuro	45
7.3	Apreciação Final	45
8	Referências.....	46
<i>Apêndice A - Procedimentos Experimentais</i>		<i>52</i>
A.1	Análise Estatística.....	52
A.2	Extração dos Compostos Bioativos da Grainha de Uva	52
A.3	Extração do Óleo Essencial de Cascas de limão	55
A.4	Produção do Creme de Rosto	55
<i>Apêndice B - Capacidade Antioxidante</i>		<i>57</i>
B.1	Método DPPH.....	57
B.2	Método TAC.....	60
<i>Apêndice C - Desenvolvimento e Avaliação da Formulação.....</i>		<i>61</i>
C.1	Desenvolvimento do Produto	61
C.2	Avaliação da Estabilidade dos Cremes	62
C.3	Oxidação Lipídica	63
<i>Apêndice D - Capacidade Antimicrobiana</i>		<i>64</i>
<i>Apêndice E - Questionário.....</i>		<i>66</i>

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Alguns exemplos de ingredientes presentes em formulações de cremes e, respetiva função.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Componentes do bagaço de uva e exemplos da sua aplicação e incorporação em diferentes indústrias. (Adaptado de A. Teixeira et al., 2014).</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3. Classificação das principais classes e compostos fenólicos presentes no bagaço de uva. (Adaptado de M. L. Soto et al., 2015)</i>	<i>10</i>
<i>Figura 4. Principais propriedades dos compostos fenólicos.</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5. Esquema da reação entre o DPPH e o agente antioxidante, AH, (A) e molécula de Trolox, usada para normalizar os resultados (B).</i>	<i>17</i>
<i>Figura 6. Esquema de um possível design da embalagem do creme. A – Design do frasco; B – Design da embalagem de cartão para armazenamento do creme, com o respetivo rótulo.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7. Esquema representativo das principais etapas do projeto.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8. Formulações desenvolvidas ao longo do projeto, F1 a F7, da esquerda para a direita.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 9. Resultados obtidos para os diferentes ensaios de estabilidade realizados. A – Teste de centrifugação; B – Teste de estabilidade térmica; C – Teste antimicrobiano.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 10. Resultados obtidos para os diferentes ensaios de estabilidade. A – Teste de pH; B - Teste da viscosidade; C - Teste da capacidade de espalhamento.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 11. Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos incluindo o BHT, e respetivas massas molares.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura A 2.1. Montagem da extração sólido-líquido pelo método Soxhlet, para a obtenção do extrato fenólico e do óleo grainha de uva. A principal diferença foi o solvente usado.</i>	<i>53</i>
<i>Figura A.2.2. Equipamento utilizado para a realização da extração do extrato fenólico. A - pelo método de extração sólido-líquido convencional; B - pelo método de extração assistida por ultrassons.</i>	<i>54</i>
<i>Figura A.3.1. Equipamento utilizado para a extração do óleo essencial das cascas de limão, pelo método de hidrodestilação.</i>	<i>55</i>
<i>Figura A.4.1. Equipamento utilizado para a produção dos cremes de rosto. A - Banho termostático; B – Homogeneização das duas fases do creme, com auxílio do homogeneizador de alta performance.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura B.1.1. Esquema da microplaca utilizada para a realização do método DPPH e respetiva legenda. .</i>	<i>57</i>

<i>Figura B.1.2. Representação das retas de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para o extrato fenólico e para o óleo de grainha.</i>	58
<i>Figura B.1.3. Representação das retas de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para o extrato fenólico e para o óleo de grainha.</i>	59
<i>Figura B.2.1. Esquema da microplaca utilizada para a realização do método TAC e respetiva legenda.</i>	60
<i>Figura B.2.2. Representação da reta de calibração de Trolox, para o método TAC.</i>	60
<i>Figura C.2.1. Equipamentos utilizados para a realização dos ensaios de estabilidade. A – Centrifuga; B – Medidor de pH; C – Viscosímetro.</i>	62
<i>Figura D.1. A – Efeito do extrato fenólico e do óleo de grainha de uva na inibição do crescimento dos três microrganismos em estudo; B – Efeito do óleo essencial de limão na inibição do crescimento dos três microrganismos em estudo.</i>	64
<i>Figura E.1. Distribuição da amostra. A – Relativamente ao género; B – Relativamente à idade.</i>	66
<i>Figura E.2. Respostas relativas às perguntas 3 a 6, relativas à utilização de creme de rosto e à interferência de certos aspetos na aquisição do mesmo, como cor, cheiro e a ser constituído por ingredientes de origem natural.</i>	66
<i>Figura E.3. Pergunta número 7, sobre a disponibilidade dos inquiridos em experimentar o creme de rosto desenvolvido e responder a um inquérito sobre o mesmo e, respetivas respostas.</i>	67
<i>Figura E.4. Respostas relativas às características do creme de rosto produzido. A – Cor; B – Textura; C – Capacidade de espalhamento; D – Oleosidade; E – Homogeneidade; F – Capacidade de Hidratação.</i>	67
<i>Figura E.5. Resposta à questão número 14, relativa à exigência de reações secundárias.</i>	68
<i>Figura E.6. Respostas à questão número 15, sobre a possibilidade de aquisição do creme de rosto produzido.</i>	68

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Exemplos dos principais ingredientes da formulação de produtos de hidratação da pele e respectivas funções.</i>	<i>4</i>
<i>Tabela 2. Aplicações gerais dos compostos fenólico do óleo de grainha de uvas, na indústria cosmética e marcas que os incorporam nos seus produtos.</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 3. Exemplos de artigos científicos que estudam a influência dos compostos fenólicos em formulações de cremes.</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 4. Vantagens e desvantagens associadas aos diferentes métodos de extração.</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 5. Vantagens e desvantagens das metodologias de determinação da capacidade antioxidante. ...</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 6. Alguns dos testes de estabilidade que devem ser realizados e respectivas considerações.</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 7. Requisitos, especificações, métrica e rank para a performance do produto.</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 8. Requisitos, especificações, métrica e rank para a percepção do produto.</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 9. Requisitos, especificações, métrica e rank para as propriedades de escoamento.</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 10. Requisitos, especificações, métrica e rank para a legislação do produto.</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 11. Requisitos, especificações, métrica e rank para a comercialização do produto.</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 12. Formulação e composição dos diferentes cremes produzidos.</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 13. Rendimento da extração dos compostos fenólicos e óleo da grainha, usando extração sólido líquido (método Soxhlet), para um tempo de extração de 105 minutos.</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 14. Rendimento da extração de óleos essenciais por hidrodestilação.</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 15. Capacidade antioxidante do extrato fenólico e do óleo de grainha, pelos métodos DPPH e TAC.</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 16. Média dos diâmetros dos halos de inibição do extrato fenólico, óleo de grainha, óleo essencial e controlos, após 24h de incubação.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 17. Valores da absorvância e índice de peróxidos (IP), em miliequivalentes (meq) de O₂ por quilograma de amostra, para as formulações avaliadas.</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 18. Capacidade antioxidante do extrato fenólico obtido e do sintético (BHT), pelo método DPPH.</i>	<i>41</i>
<i>Tabela A 2.1. Rendimentos obtidos para a extração sólido-líquido convencional e extração assistida por ultrassons, para diferentes tempos.</i>	<i>54</i>

<i>Tabela A.4.1. Diferentes formulações preliminares (FP) estudadas, alterações efetuadas entre os ensaios, resultado final e análise em microscópio do creme obtido.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela B.1.1. Percentagem de inibição de DPPH para o extrato fenólico e para o óleo de grainha, para as diferentes concentrações em cada poço.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela B.1.2. Percentagem de inibição de DPPH para o extrato fenólico e para o BHT, para as diferentes concentrações em cada poço.</i>	<i>59</i>
<i>Tabela B.2.1. Média da absorbância dos padrões obtidos para o primeiro e segundo ensaio.</i>	<i>60</i>
<i>Tabela B.3.2. Valores de atividade antioxidante obtidos pelo método TAC, em $\mu\text{mol TE}\cdot\text{mL}^{-1}$, para as diluições que permitiram obter valores dentro da curva de calibração.</i>	<i>60</i>
<i>Tabela C.1.1. Ingredientes utilizados na formulação base do creme de rosto, respetiva função e justificação da escolha.</i>	<i>61</i>
<i>Conclusão Tabela C.1.1. Ingredientes utilizados na formulação base do creme de rosto, respetiva função e justificação da escolha.</i>	<i>62</i>
<i>Tabela C.2.1. Valores de pH, espalhamento (cm) e viscosidade (Pa·s), ao longo de 21 dias, para os diferentes cremes produzidos.</i>	<i>63</i>
<i>Tabela D.1. Valores dos halos de inibição, em mm, do extrato fenólico, óleo de grainha, óleo essencial de limão, ácido ascórbico, ácido fórmico e água ultrapura, para os três microrganismos estudados.</i>	<i>65</i>

Notação e Glossário

P	Pressão	Pa
s	Espalhamento	cm
t	Tempo	s / min / hr / dia
T	Temperatura	°C
\bar{x}	Média	

Letras gregas

μ	Viscosidade	mPa·s
σ	Desvio padrão	
λ	Comprimento de onda	nm

Lista de Siglas

AO	Antioxidantes
A/O	Água em Óleo
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BHT	Butil Hidroxitolueno
CBA	Compostos Bioativos
CF	Compostos Fenólicos
CFT	Conteúdo Fenólico Total
CUPRAC	<i>Cupric Reducing Antioxidant Capacity</i>
DAD	Detetor de Díodos
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAU	Extração Assistida por Ultrassons
ESL	Extração Sólido-Líquido
F	Formulação
FP	Formulação Preliminar
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC/FID	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IP	Índice de Peróxidos
MDA	Malondialdeído
O/A	Óleo em Água
OE	Óleo Essencial
OIV	<i>International Organisation of Vine and Wine</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TE	Equivalentes de Trolox
TEAC	Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox
UV	Ultravioleta

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A indústria cosmética é um negócio próspero a nível global. De acordo com a *Cosmetics Europe – The Personal Care Association*, 450 milhões de europeus utilizam diariamente uma variedade de produtos cosméticos como sabões, cremes de rosto, shampoos, desodorizantes, pastas de dentes, entre outros. Ao longo das últimas duas décadas, esta indústria tem evoluído de forma exponencial, sobretudo no desenvolvimento de produtos (como os cremes de rosto) que protegem e hidratam a pele de modo a combater as imperfeições e os sinais de envelhecimento. Atualmente, a procura de cosméticos com ingredientes de origem natural é cada vez maior, o que potenciou o aperfeiçoamento da indústria cosmética. Esta nova ideologia tem promovido o uso e a incorporação de extratos naturais como ingredientes bioativos (por exemplo, antioxidantes e fragrâncias) em produtos cosméticos. Dentro dos compostos bioativos, os compostos fenólicos constituem um dos principais grupos, encontrando-se em diversas fontes, tais como plantas e até em subprodutos da exploração agrícola (Rodrigues *et al.*, 2018).

O aumento do processamento alimentar tem contribuído massivamente para a produção de resíduos agroindustriais. Estes são gerados em todas as etapas do ciclo: desde a produção agrícola, a produção industrial, o processamento e a distribuição. Felizmente, alguns destes resíduos são ricos em compostos bioativos, tendo promovido a investigação no âmbito das metodologias de extração. Os principais benefícios apresentados por estes compostos passa pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, o que os torna bastantes apelativos para as indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética, pois podem substituir os equivalentes sintéticos (Sirohi *et al.*, 2020).

A indústria do vinho é das principais responsáveis pela geração de subprodutos, como a grainha. Estas são ricas em compostos bioativos, nomeadamente em compostos fenólicos, que apresentam bastantes vantagens para a saúde e bem-estar do ser humano. Estes apresentam potencial bioativo devido às suas propriedades antioxidantes, facto que justifica o interesse da indústria cosmética pelas propriedades de antienvhecimento e proteção contra a radiação solar, que podem oferecer. Adicionalmente, o óleo de grainha de uva é rico em vitamina E, o que reforça capacidade antioxidante, e contém ainda ácidos gordos, com capacidades emolientes (Sirohi *et al.*, 2020). De acordo com Tournour *et al.*, (2015), o número de publicações com palavras-chave “antioxidante” e “grainha de uva” aumentou nos últimos anos, o que demonstra o interesse e a relevância do tema para a comunidade científica. A produção de limão também é uma indústria que gera elevadas quantidades de subprodutos, pois cada fruto origina cerca de 50 a 60 % de resíduos, sendo a casca o maioritário. Estes resíduos podem ser valorizados pela extração dos óleos essenciais, ricos em D-limoneno, que possuem aroma cítrico e apresentam propriedades antimicrobianas.

A incorporação destes óleos em produtos cosméticos permite a sua valorização e acrescenta propriedades benéficas, além de aroma agradável às formulações (Mahato *et al.*, 2020).

Aliando o desenvolvimento da indústria cosmética ao conceito de economia circular e sustentabilidade lança-se o desafio da utilização de extratos obtidos a partir da grainha de uva e de cascas de limão em produtos cosméticos, a fim de desenvolver produtos de valor acrescentado e com menor impacto ambiental.

O trabalho realizado no âmbito da dissertação consistiu na produção de um creme de rosto sustentável de valor acrescentado pela incorporação de ingredientes de origem natural, obtidos a partir de subprodutos agrícolas. Assim, os principais objetivos do trabalho foram:

- O desenvolvimento do produto: “Creme de rosto de valor acrescentado”;
- Valorização de resíduos agrícolas produzidos em elevada escala em Portugal:
 - Grainha de uva - rica em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes e em óleo com vitamina E e ácidos gordos (emolientes);
 - Cascas de limão para obtenção de óleos essenciais.
- Incorporação, no creme, dos extratos da grainha de uva ricos em compostos fenólicos (agente antioxidante), avaliação da sua capacidade antioxidante e avaliação da possibilidade destes substituírem antioxidantes sintéticos. Adição do óleo essencial das cascas de limão para avaliar a capacidade antimicrobiana.
- Avaliar a estabilidade do creme, realizando ensaios de estabilidade.

1.2 Organização da Dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em seis capítulos. O primeiro capítulo corresponde à “Introdução” constituído pelo enquadramento do tema de uma forma geral e a apresentação do projeto. No segundo capítulo, “Contexto e Estado da Arte”, é apresentado o tema, fazendo-se referência aos produtos cosméticos, às suas principais categorias, expondo o conceito de antioxidantes e óleos essenciais. Inclui a problemática dos subprodutos agrícolas, referindo os diferentes métodos de extração do extrato fenólico da grainha de uva, assim como das metodologias para a determinação da sua capacidade antioxidante. O terceiro capítulo, “Design do Produto”, apresenta as principais considerações durante o desenvolvimento do creme de rosto. No quarto capítulo, “Materiais e Métodos”, encontram-se os materiais e equipamentos utilizados para a realização do projeto, tal como os procedimentos efetuados. O capítulo cinco, “Resultados e Discussão”, apresenta os resultados obtidos e a discussão destes, analisando possíveis problemas e dificuldades na execução do trabalho. O sexto capítulo diz respeito às conclusões da dissertação e o sétimo é referente às limitações e sugestões de trabalho futuro. Finalmente, contém a secção de “Referências” e a secção “Apêndices” onde podem ser encontradas informações adicionais sobre determinados conteúdos.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Produtos Cosméticos

A aparência pessoal é um requisito de grande importância levando a população atual a valorizá-la mais e a procurar meios para alcançá-la. Uma das principais estratégias adotada para atingir esses objetivos é a utilização de produtos cosméticos. Um produto cosmético é definido como uma preparação que, quando aplicada no corpo humano, tem a capacidade de embelezar, conservar, proteger, limpar, colorir ou hidratar a pele, cabelo, unhas, lábios ou olhos. A palavra "cosmético" deriva do grego Kosmetos (Κοσμητός), que significa "adorno" ou "ornamento". Os produtos cosméticos podem ser divididos em diversas categorias, contudo, os produtos de cuidado da pele – como é o caso produtos de hidratação da pele - apresentam particular destaque. Estes cosméticos ajudam a restabelecer e/ou manter a hidratação da pele, permitindo que esta pareça mais bonita, suave e cuidada. Efetivamente é devido à associação entre uma pele bonita e saudável, que estes cosméticos são deveras populares (Britannica, 2020).

2.1.1 Produtos de Hidratação da Pele

Os produtos de hidratação da pele são cosméticos que têm como finalidade aumentar o conteúdo de água na camada exterior da pele. Estes podem atuar de duas formas: por hidratação – em que os agentes hidrofílicos atraem a água de camadas inferiores para camadas superiores da pele – ou por oclusão – onde os agentes hidrofóbicos criam um filme oclusivo na superfície da pele, impedindo a evaporação da água (Santos, 2019). Os produtos de hidratação da pele mais comuns são os cremes hidratantes. Na sua forma mais simples estes são uma emulsão de duas fases líquidas imiscíveis – uma fase aquosa e uma fase oleosa – na qual um dos líquidos encontra-se disperso no outro na forma de micelas (Lodén, 2005). A fase aquosa é constituída por um solvente e agentes hidrofílicos, enquanto a fase oleosa é composta por ingredientes oleosos e que conferem características relevantes para a emulsão, nomeadamente o espalhamento e a absorção na pele (Santos, 2019). Os cremes hidratantes mais comuns são emulsões do tipo óleo em água (O/A), pois, como apresentam menor conteúdo de óleo são menos gordurosas, tornando-as mais apelativas para o consumidor. Porém, em termos dermatológicos, é preferível emulsões água em óleo (A/O), visto que o filme oclusivo formado na superfície da pele além de impedir a evaporação da água, ajuda a absorção dos compostos lipossolúveis na pele (Epstein, 2009). De notar que, a escolha destes produtos depende também do tipo de pele; no caso de uma pele oleosa é preferível uma emulsão O/A, devido ao menor conteúdo de óleo, garantindo na mesma a hidratação da pele. Por outro lado, existem também loções hidratantes, caracterizadas por serem menos viscosas, que são emulsões maioritariamente constituídas pela fase contínua. Neste caso, as emulsões são, de forma geral, O/A (Epstein, 2009). A Tabela 1 apresenta as principais classes de ingredientes presentes na composição base de produtos de hidratação da pele, assim como a respetiva função. Na Figura 1 encontram-se algumas das estruturas dos principais ingredientes presentes nestes produtos.

Tabela 1. Exemplos dos principais ingredientes da formulação de produtos de hidratação da pele e respetivas funções.

Função	Ingredientes (Exemplos)	Observações
Solvente/veículo	Água, Isohexadecano	Dilui e dispersa os ingredientes
Emolientes	Cera de abelha, Lanolina, Álcool cetílico, Poliisobuteno, Óleo de rícino, Ácido esteárico	Formam um filme oclusivo, impedindo a evaporação da água
Humectantes	Glicerina, Sorbitol, Propileno glicol, Ácido láctico, Ácido hialurónico	Atraem água das camadas inferiores da pele e do vapor de água do ar, para a superfície da pele
Surfactantes (Emulsificantes) ^a	Betaína, Alcoois gordos, Álcool esterearílico	Estabilizam a emulsão
Espessantes	Goma xantana, Carboximetil celulose, Acrilatos	Permitem atingir as propriedades reológicas desejadas
Neutralizantes ^b	Hidróxido de sódio, Ácido cítrico, Ácido acético	Ajustam o pH da formulação
Estabilizadores das Formulações^c		
Quelantes ^b	Ácido Cítrico, Metafosfato de sódio, Turpinal, EDTA	Ajudam a prevenir a formação de depósitos de cálcio e magnésio
Conservantes ^b	Metilparabeno, Quaternium 15, Benzoato de sódio	Evitam o crescimento de microrganismos
Antioxidantes	BHT, Tocoferol, Acetato de tocoferol	Previnem a oxidação da formulação
Atributos Estéticos		
Corantes e pigmentos	Mica, Índigo, Dióxido de titânio	Melhoram a aceitação do produto
Fragrâncias	Óleo essenciais, <i>Musks</i> , Álcool Benzílico	Disfarçam odores desagradáveis de certos produtos da formulação e oferecem um aroma específico

a – Designação muito usada em cosmética que significa surfactante; b – Classes importantes nas formulações cosméticas, no entanto, estes são adicionados em percentagens muito reduzidas (< 0,5 % (m/m)); c - Auxiliam a manter a integridade da formulação. EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético; BHT - Butil Hidroxitolueno

Fontes: Lodén, 2005; Epstein, 2009; Santos, 2019.

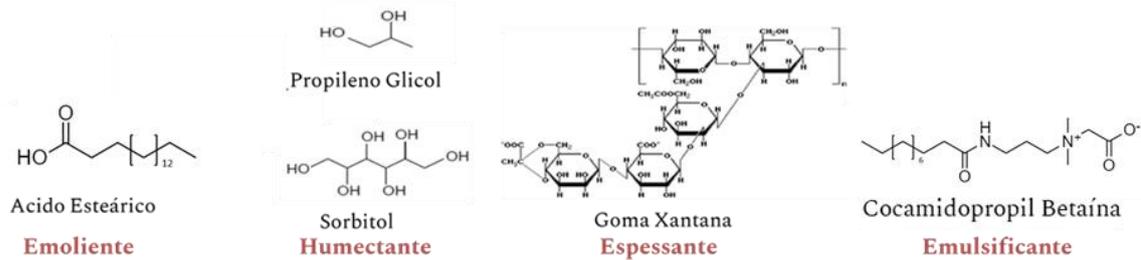


Figura 1. Alguns exemplos de ingredientes presentes em formulações de cremes e, respectiva função.

De notar que, para além dos ingredientes previamente apresentados, por vezes também são adicionados compostos bioativos (CBA) de origem natural - nomeadamente obtidos a partir de subprodutos agrícolas, plantas, entre outros – que permitem tornar estes cosméticos em produtos de valor acrescentado, uma vez que os torna mais sustentáveis, e assim mais apelativos para o consumidor.

Os cremes hidratantes podem ser classificados relativamente à sua função como: cremes de limpeza de rosto, cremes de dia, cremes de noite, cremes de mãos e corpo e cremes multifunção. Os cremes de rosto ajudam a restaurar a pele do rosto, fazendo-a parecer mais jovem, aumentam a hidratação e criam uma camada protetora na superfície do rosto (Sethi *et al.*, 2016). Na presente dissertação, foi produzido um creme de rosto de dia, com emulsão O/A. A pele da cara encontra-se exposta as condições ambientais, como o frio, o calor, a humidade, pó, poluição e radiação ultravioleta (UV). Os cremes de dia são essenciais numa rotina de cuidado de pele e, na maioria dos casos, são emulsões do tipo O/A, desenvolvidas para serem não gordurosas, hipoalergénicas, enfatizando o seu objetivo na estética e nos benefícios para a pele. Estes cremes oferecem propriedades emolientes à pele, permitindo a sua hidratação e protegem-na de agressões ambientais, como a radiação UV, devido à presença de agentes antioxidantes (AO) (Sharma *et al.*, 2018). Os AO são essenciais nos produtos de rosto, visto que são moléculas capazes de evitar a oxidação, protegendo desta forma a pele e a própria formulação (Santos, 2019).

2.2 Antioxidantes

No âmbito da indústria cosmética, os AO são bastante utilizados uma vez que o corpo humano encontra-se constantemente exposto a agentes oxidantes provenientes da radiação UV e de poluentes ambientais. A existência destes compostos pode ser prejudicial para a saúde humana e pode levar à degradação de macromoléculas essenciais, como lípidos, proteínas e até mesmo moléculas de DNA (Sharma *et al.*, 2018). Os AO são agentes que apresentam capacidade de captar radicais livres, estabilizando-os, impedindo a interação dos mesmos com a pele, o que evita o envelhecimento prematuro das células, ao mesmo tempo que estimula a geração de novas células (Epstein, 2009). A presença de AO em cremes hidratantes é importante devido aos agentes emolientes, como óleos e ceras, que se encontram sujeitos à oxidação. Portanto, a adição destes componentes à formulação ajuda a prevenir e a atrasar a

oxidação dos ingredientes previamente referidos, o que, para além de prevenir a formação de odores desagradáveis, impede também a degradação do próprio creme (Santos, 2019).

Apesar de existirem AO sintéticos – como é o caso do BHT (Butil Hidroxitolueno), muito usado em formulações cosméticas - existe uma preocupação cada vez maior em desenvolver cosméticos sustentáveis; deste modo, nos últimos tempos, existe, por parte da indústria cosmética, uma tendência na incorporação AO de origem natural obtidos a partir de plantas, frutos e até subprodutos, como é o caso a grainha de uva (Britannica, 2020). Assim, surge a oportunidade de aproveitar as propriedades AO apresentadas pelos compostos fenólicos (CF) presentes na grainha de uva (que serão abordadas na Subsecção 2.4.1), incorporando-os em cremes hidratantes, aumentando assim o seu valor comercial.

2.3 Óleos Essenciais

De acordo com a ISO (*International Organisation for Standardization*), os óleos essenciais (OE) são definidos como “o produto obtido através de uma destilação com água ou vapor ou a seco ou por processos mecânicos, de uma parte ou partes de uma planta” (Sarkic e Stappen, 2018). A composição dos OE pode variar conforme a espécie da planta utilizada e da zona geográfica onde é plantada, uma vez que adquire características diferentes conforme o clima, tipo de solo e métodos de produção. Também o método de extração selecionado apresenta influência na composição do OE. A incorporação de OE em cosméticos tem vindo aumentar pois, além de serem ingredientes de origem natural, também ajudam a criar um odor agradável; por outro lado, apresentam propriedades bastante interessantes para estes produtos, visto que muitas vezes têm capacidade antifúngica, antimicrobiana e antisséptica, o que permite reduzir a utilização de conservantes sintéticos (Campos *et al.*, 2020).

2.4 Subprodutos Agrícolas

A produção agrícola e o processamento agroindustrial geram elevadas quantidades de subprodutos e resíduos. A formação destes apresenta impactos a nível social, económico e ambiental; por exemplo, a nível ambiental, estes contribuem para o aumento das emissões de gases com efeito de estufa. No caso da produção de fruta, os subprodutos como as sementes, as peles, entre outros, representam cerca de 50 % da fruta original e, muitas vezes, apresentam teor nutricional e funcional superior ao do produto final. Assim, tendo em conta as possíveis características destes resíduos, em conjunto com a ideologia de sustentabilidade e de economia circular, há uma grande preocupação na procura de novas oportunidades para aproveitar estes subprodutos (Campos *et al.*, 2020). Ao longo dos anos, o consumo de vinho tem aumentado, e conseqüentemente a sua produção tem crescido. A grainha de uva, um dos principais constituintes do bagaço, é um subproduto da produção de vinho e possui na sua constituição um conjunto de CBA, como os CF, que apresentam efeitos benéficos para a saúde. O bagaço de uva é um dos principais resíduos gerados mundialmente, o que gera preocupação em valorizar este resíduo, tirando

proveito das propriedades dos CBA e incorporando-os em diversas aplicações biotecnológicas (Torres *et al.*, 2018).

Também as cascas de citrinos, assim como as sementes e polpa, gerados a partir da produção de sumos de limão e laranja, são dos principais subprodutos nível mundial. Por cada fruto gera-se cerca de 50 a 60 % de subprodutos, na sua maioria cascas, que são descartados como resíduos criando um desafio na sua gestão (Gavahian *et al.*, 2019). Estes subprodutos apresentam compostos, considerados na sua maioria OE, ricos em compostos voláteis com aroma cítrico, sendo um dos seus principais constituintes o D-limoneno, que podem ser incorporados como aditivos em formulações cosméticas (Mahato *et al.*, 2020).

2.4.1 Bagaço e Grainha de Uva

Uma das principais atividades agro económica responsável pela produção de subprodutos, é o cultivo de uvas, cuja produção anual mundial excede as 60 mil toneladas. De acordo com a OIV (*International Organisation of Vine and Wine*), Espanha, China, França, Itália e Turquia são responsáveis pela produção de 50 % das uvas a nível mundial. Atualmente, Portugal encontra-se em décimo oitavo lugar, relativamente à produção de uvas, e em décimo primeiro em termos de produção de vinho (IOV,2020). Cerca de 80 % da produção de uvas é utilizada para a produção de vinho, todavia, existem diversos produtos no mercado provenientes desta matéria-prima, como os sumos de uva, as compotas e as uvas passa (Teixeira *et al.*, 2014). A produção de vinho encontra-se associada à geração de elevadas quantidades de resíduos orgânicos e inorgânicos, águas residuais e gases que provocam o efeito de estufa.

O principal resíduo relacionado a esta atividade é o bagaço de uva - caracterizado por ser um material sólido dividido em duas frações: o bagaço sem sementes – constituído pela polpa, pele e hastes - e a grainha da uva, o subproduto utilizado no trabalho realizado nesta dissertação. Este é gerado após as etapas de prensagem e da fermentação, representando aproximadamente 20 % do peso original da uva (Kalli *et al.*, 2018). De acordo com a literatura, é estimado que a produção de 6 litros de vinho origina 1 kg de bagaço de uva, o que implica que sejam produzidas entre 10,5 – 13,1 mil toneladas anuais de bagaço, daí a importância na exploração destes subprodutos (Teixeira *et al.*, 2014).

A composição do bagaço pode variar, visto que a proporção em cada fase pode ser diferente, sendo que a fração de grainha varia entre 38 – 52 %. No que respeita à composição macro nutricional, esta encontra-se dependente da variedade de uva em questão, no entanto, apresenta teor de humidade elevado, que varia entre 50 – 72 %, o teor de lignina que altera entre 17 – 24 % e o conteúdo de proteínas é superior a 4 %. Os subprodutos gerados após o processo de vinificação apresentam bastantes CBA, como ácidos gordos, vitaminas e AO naturais, nomeadamente na forma de CF (como os ácidos fenólicos, os flavonoides, as procianidinas) (Teixeira *et al.*, 2014; Kalli *et al.*, 2018).

Na Figura 2 encontra-se uma representação esquemática, dos principais CBA encontrados no bagaço de uva.

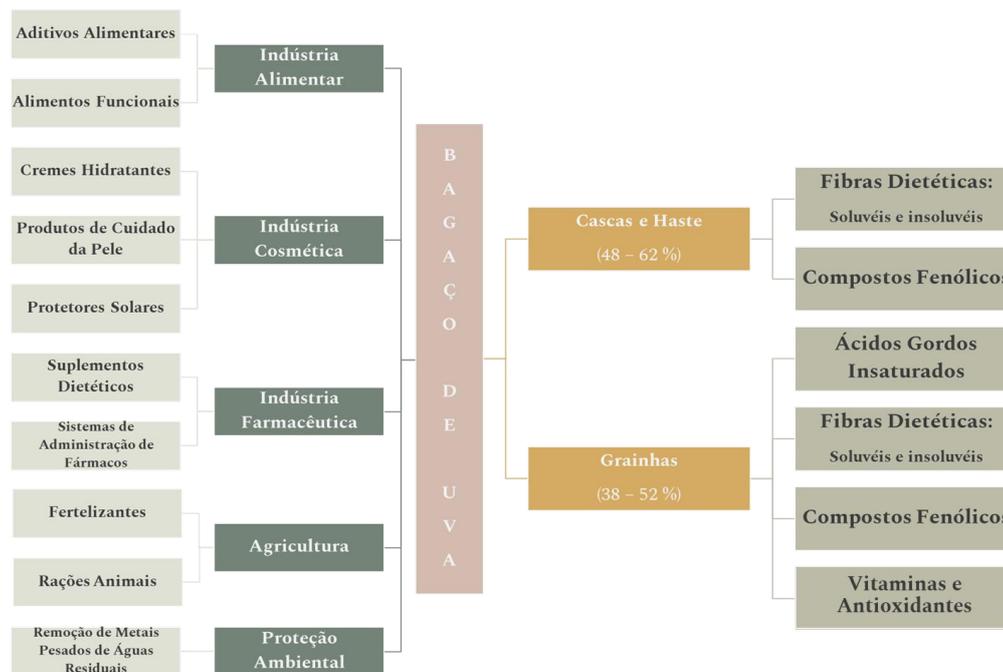


Figura 2. Componentes do bagaço de uva e exemplos da sua aplicação e incorporação em diferentes indústrias. (Adaptado de A. Teixeira et al., 2014).

A literatura revela que o bagaço de uva é aplicado em diversas indústrias – como a indústria cosmética e alimentar – com diversas finalidades, e estas aplicações têm vindo a aumentar tal como evidenciado na Figura 2. De facto, a indústria cosmética tem evoluído no sentido de criar e desenvolver produtos denominados “cosméticos verdes”, isto é, produtos cujas formulações sejam de origem natural, ou com ingredientes maioritariamente naturais (Chanchal e Swarnlata, 2008; Kalli *et al.*, 2018). Efetivamente, estes ingredientes apresentam vantagens face aos compostos sintéticos, pois são biodegradáveis e apresentam propriedades terapêuticas e funcionais que são benéficas para o ser humano. Assim, os extratos de bagaço e grainha de uva são incorporados em bastantes produtos cosméticos, principalmente em produtos de cuidados da pele – exemplo dos hidratantes– visto que esta categoria apresenta a maior cota de mercado, atingindo, no ano de 2018, os 135 mil milhões de euros. Além disso, este segmento continua a crescer, sendo que a taxa de crescimento anual até ao ano de 2025 é de 4,4 % (Grand View Research, 2019).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos estudos no sentido de criar formulações de cosméticos naturais e valorizados, através da incorporação dos CBA presentes nas grainhas de uva (Nunes *et al.* 2017). Na Tabela 2 são apresentadas alguns dos principais exemplos de formulações onde são incorporados os compostos/extratos da grainha de uva. São ainda realçadas algumas marcas que os incorporam nas suas formulações.

Tabela 2. Aplicações gerais dos compostos fenólicos do óleo de grainha de uvas, na indústria cosmética e marcas que os incorporam nos seus produtos.

Aplicações Gerais			
Compostos	Função	Classe de Cosméticos	
Antocianinas, ácido gálico, catequina, epicatequina, flavonoides, proantocianidinas, resveratrol, melanina	- Antioxidante e capacidade de eliminar radicais; - Estimulação do crescimento celular.	- Cremes de rosto	
Ácido ferúlico, ácido caféico, ácido gálico, proantocianidinas, resveratrol	- Fotoprotetor.	- Protetores solares; - Cremes <i>After-sun</i> ; - Batons de cíeiro.	
Ácido tartárico	- Esfoliante; - Despigmentação; - Regulador de pH.	- Cremes e géis esfoliantes; - Cremes de rosto.	
Ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, Vitaminas C e E	- Antioxidante; - Propriedades emolientes.	- Antienvhecimento; - Cremes de rosto.	
Produtos Comerciais			
Marca	Produto	Ingredientes	Resultados
Caudalie	Creme Sorvete Hidratante	- Água de Uva; - Extrato de Polifenóis.	- 77 % dos consumidores referiram uma redução das vermelhidões da pele; - 90 % dos consumidores, consideraram que a pele se encontrava mais hidratada.
DVINE	Creme de Dia Poder Dinâmico de Uva	- Óleo de Grainha de Uva; - Resveratrol.	- 93 % dos consumidores afirmaram que a pele se encontrava mais firme e mais elástica; - 29 % dos consumidores verificou diminuição das rugas da pele
DC-Dermoteca Cosmetics	DC-Dermoteca Cosmetics Nutri-Reparador	- Óleo de Grainha de Uva; - Extrato de Polifenóis. - Resveratrol.	-

Fonte: Nunes *et al.* 2017; Caudalie, n.d.; Dermoteca DC, n.d.; DVINE, n.d.

Na Tabela 3, encontram-se apresentados estudos científicos relativos ao desenvolvimento de produtos cosméticos contendo extrato fenólico (extrato rico em CF) obtido a partir da grainha de uva e os respetivos resultados.

Tabela 3. Exemplos de artigos científicos que estudam a influência dos compostos fenólicos em formulações de cremes.

Objetivo do Estudo	Parâmetros Avaliados	Conclusões	Referência
Comparação entre de um sérum cosmético com fitossomas de extrato de grainha de uva e um extrato de grainha de uva	- Conteúdo Fenólico Total; - Cor; - Cheiro; - Homogeneidade; - pH; - Viscosidade.	- $CFT_{extrato} = 568,89 \text{ mgGAE} \cdot g_{extrato}^{-1}$ - Cor: vermelho acastanhado - Cheiro: aroma típico a extrato de grainha de uva - Homogeneidade: formulação homogénea - pH = 4,87 - $\mu = 465 \text{ cps}$	Surini <i>et al.</i> (2018)
Avaliação da capacidade antioxidante de um creme de rosto contendo extrato de grainha de uva	- Cor; - pH; - Espalhamento; - Viscosidade; - Irritabilidade; - Capacidade Antimicrobiana; - Capacidade Antioxidante.	- Cor: castanho claro - pH = 6,5 - $s = 31,21 \text{ cm} \cdot s^{-1}$ - $\mu = 38 \text{ 166 cps}$ - Não irritante - $d_{halo \text{ de inibição}} = 12 \text{ mm}$ - $IC_{50} = 0,0072 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Kawarkhe, <i>et al.</i> (2016)

CFT – Conteúdo fenólico total; μ – viscosidade; s - espalhamento; IC_{50} – concentração de amostra necessária para diminuir em 50% a concentração inicial dos radicais DPPH

Ainda que a grainha de uva apresente bastantes CBA, os CF destacam-se devido às suas propriedades funcionais.

2.4.1.1 Extrato Fenólico

Os CF são metabolitos secundários das plantas, cuja quantidade presente na planta depende de diferentes fatores tais como: a técnica de cultivo utilizada, as condições de crescimento, o processo de colheita, de processamento e de armazenamento. Além disso, o conteúdo de CF na planta pode aumentar quando estas se encontram em situações de *stress* – infecção por agentes patogénicos e parasitas, excesso de radiação UV, poluição do ar, entre outros -, para que esta se consiga proteger e manter saudável (Anastasiadi *et al.*, 2012; Višnjevec *et al.*, 2020). A formação dos CF é feita por duas vias metabólicas: a via chiquimato e a via acetato. Relativamente à sua estrutura, estes apresentam pelo menos um anel aromático e têm um ou mais substituinte hidroxilo. Estes compostos fazem parte de um grupo bastante diverso e grande de compostos químicos, geralmente divididos em duas categorias, os fenóis simples e os polifenóis (Soto *et al.*, 2015). A Figura 3 apresenta a classificação das diferentes classes de CF.

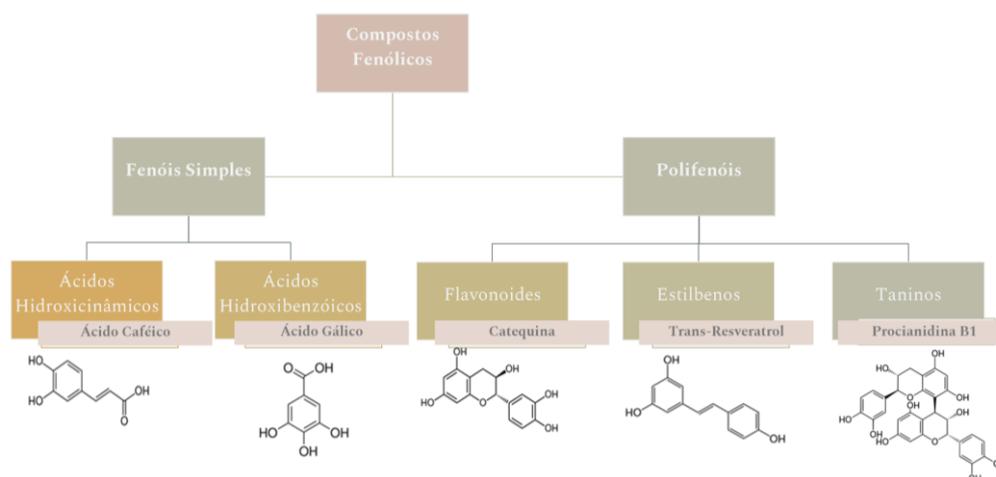


Figura 3. Classificação das principais classes e compostos fenólicos presentes no bagaço de uva. (Adaptado de M. L. Soto *et al.*, 2015)

O bagaço de uva é caracterizado por apresentar quantidades significativas de flavonoides, nomeadamente flavan-3-óis e a cianidina, encontrados na forma livre; apresenta ainda ácidos fenólicos, como o hidroxibenzóico e o hidroxicinâmico, que podem aparecer tanto na forma livre como na forma conjugada e ainda possui estilbenos e taninos (Gharras, 2009; Teixeira *et al.*, 2014; Soto *et al.*, 2015). No caso da grainha de uva, esta contém cerca de 60 a 70 % dos CF totais extraíveis da uva; os principais CF encontrados na composição do extrato são os flavonoides - principalmente os flavan-3-óis monoméricos (catequina, epicatequina), ácidos fenólicos, dímeros e trímeros de procianidina e proantocianidinas. Estes compostos podem atuar como AO pois são capazes de neutralizar o *stress* oxidativo, através da inibição da formação de radicais livres, da interrupção de reações de auto-oxidação em cadeia, entre outras (Soto *et al.* 2015).

Os flavonoides são os CF mais abundantes presentes em frutas e vegetais e apresentam capacidade antioxidante elevada devido ao seu alto potencial redox, possibilitando a sua atuação como agentes redutores (Gharras, 2009). Por outro lado, os estilbenos apresentam propriedades antienvhecimento pois ativam os recetores de estrogénio, o que aumenta a produção de ácido hialurónico e colagénio e atrasa o processo de envelhecimento da pele (Kusumawati e Indrayanto, 2013). No caso dos taninos, além da capacidade antioxidante, um estudo realizado por Smeriglio *et al.* (2017), provou que as proantocianidinas apresentam propriedades antimicrobianas – inibindo o crescimento de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Campylobacter jejun*. Contudo, os mecanismos de ação destes compostos não são compreendidos na sua totalidade. Alguns autores sugerem que estes podem interferir no crescimento de microrganismos através de diferentes mecanismos, como são exemplo a modificação da permeabilidade da membrana celular, alterações em funções intracelulares, entre outros. Para além das propriedades suprarreferidas, os CF apresentam também características anti-inflamatórias, anticancerígenas, antialérgicas e propriedades que ajudam a prevenir doenças cardiovasculares (Wong-Paz *et al.*, 2017). As principais propriedades dos CF encontram-se na Figura 4.



Figura 4. Principais propriedades dos compostos fenólicos.

2.4.1.2 Óleo de Grainha de Uva

O óleo extraído a partir da grainha de uva é constituído, maioritariamente, por ácidos gordos insaturados – como o ácido linoleico (o principal ácido gordo, entre 70 a 75 %), o ácido oleico e o ácido palmíco – que são bastante importantes para os produtos cosméticos devido às suas propriedades emolientes. Uma vantagem da utilização deste óleo é a baixa concentração de ácido linolênico, que em quantidades elevadas pode originar odores desagradáveis e diminuir a estabilidade do óleo (Durazzo *et al.*, 2019). Os ácidos gordos presentes no óleo de grainha de uva, além das propriedades hidratantes, apresentam ainda propriedades antienvhecimento. Por outro lado, este óleo é rico em vitamina E, apresentando também elevadas quantidades de tocoferóis (α , β , γ e δ) e tocotrienóis (α , β , γ e δ).

A vitamina E revela-se um composto de interesse para a indústria cosmética pois, para além da sua capacidade de prevenir o *stress* oxidativo e a oxidação dos produtos, facilita a cicatrização de feridas na pele e protege o colagénio e a elastina de degradação (Sieniawska, 2015).

A obtenção do óleo pode ser realizada através da técnica de prensagem a frio, o que é vantajoso pois é uma técnica que pode ser realizada a temperaturas baixas e origina óleos com níveis elevados de AO. No entanto, a extração com solventes é a técnica mais utilizada para a sua extração mesmo a nível industrial devido à facilidade de realizar e de replicar. Os solventes de extração mais usuais são o n-hexano e o éter de petróleo, uma vez que os compostos presentes no óleo são lipofílicos e como tal devem ser seleccionados solventes apolares (Sieniawska, 2015; Durazzo *et al.*, 2019).

2.4.2 Cascas de Limão

O limão é um fruto que contém uma grande variedade de compostos químicos naturais, como CF – na sua maioria flavonoides –, vitaminas, minerais, fibras dietéticas, OE e carotenoides. Estes compostos apresentam efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente a vitamina C e flavonoides, que apresentam propriedades AO (Lopresto *et al.*, 2014). As cascas de limão são ricas em OE; contudo, a sua composição pode variar consoante a variedade de limão, a distribuição geográfica, entre outros fatores. O constituinte mais abundante nos OE de limão é o D-limoneno, seguido do citral, que se encontra sobre a forma dos estereoisómeros neral e geranial, e o linalol, porém em quantidades reduzidas. De acordo com a literatura, o neral e o linalol são os compostos que apresentam aroma mais forte. O D-limoneno é um monoterpene monocíclico que apresenta um aroma cítrico e é considerado seguro pela FDA (*Food and Drug Administration*) para utilização como agente aromatizante (González *et al.*, 2010).

Os OE apresentam capacidade antimicrobiana e antifúngica, o que possibilita a sua utilização como conservantes face ao uso de conservantes sintéticos. Assim, os OE são bastante utilizados na indústria cosmética e perfumaria (como agentes antibacterianos, conservantes e aromatizantes), na indústria farmacêutica (como agentes antibacterianos e anti-inflamatórios) e na indústria alimentar (atuam como agentes aromatizantes e conservantes) (Sarkic e Stappen, 2018). Estes OE encontram-se em reservatórios no interior do flavedo da fruta. A extração dos óleos pode ser feita através de métodos tradicionais como a prensagem a frio ou por destilação através de contacto com a água (hidrodestilação) ou com vapor ou ainda usando a extração sólido líquido. A hidrodestilação é o método mais utilizado para a produção de OE a nível industrial. No entanto, estes métodos apresentam desvantagens relacionadas com os elevados custos energéticos, tempos de extração longos, consumo de solvente elevado e a possibilidade de perda de compostos devido à hidrólise e oxidação durante a extração. Deste modo, têm sido desenvolvidas novas tecnologias consideradas verdes e sustentáveis, como a extração supercrítica, a extração assistida por ultrassons ou micro-ondas (Teixeira *et al.*, 2014).

Portugal é um dos principais produtores de limão a nível europeu, encontrando-se em 4^o lugar, e no ano 2018, produziu 16 mil toneladas métricas de limão (USDA,2018).

Assim, existe a possibilidade de aproveitar este subproduto, extraindo os compostos na casca de limão, de modo a produzir OE, que podem ser incorporados em formulações cosméticas, visto que conferem não só um aroma agradável, mas apresentam também propriedades funcionais – capacidade antimicrobiana e antifúngica.

2.5 Extração dos Compostos Fenólicos da Grainha de Uva

Os CF presentes nas plantas apresentam elevada diversidade em termos estruturais o que torna praticamente impossível o desenvolvimento de um método de extração adequado a todos estes compostos (Baydar *et al.*, 2007). Atualmente, têm sido desenvolvidos diversos estudos com a finalidade de estudar os diferentes métodos existentes aplicados na extração de CF. A principal técnica aplicada é a extração sólido-líquido que, apesar de alcançar rendimentos elevados, tem algumas desvantagens, como o elevado consumo de solvente. Contudo, as tendências recentes de técnicas de extração têm-se focado na procura de soluções que protejam o meio ambiente e os consumidores, enquanto permitem uma produção económica de extratos de alta qualidade. Assim, surge a aplicação de técnicas de extração consideradas mais “limpas” e “verdes”, como é o caso da extração supercrítica e da extração assistida por ultrassons, entre outras (Kalli *et al.*,2018).

2.5.1 Extração Sólido-Líquido

A extração sólido-líquido (ESL) é uma técnica convencional e clássica para a extração de CF da grainha de uva. Este método é caracterizado como um fenómeno de transferência de massa no qual os CBA presentes na grainha de uva, migram para o solvente. A eficiência da ESL é influenciada por diversos fatores, como o solvente de extração utilizado, a temperatura e tempo de extração, a razão sólido-líquido e pelo tamanho das partículas (Ignat *et al.*, 2011).

De facto, o solvente utilizado na ESL influencia bastante a eficiência da extração e, por este motivo, este parâmetro é o mais estudado. Os solventes mais usuais para a extração de CF são o metanol, o etanol, a acetona e a água (Spigno *et al.*,2007). De acordo com Pekić *et al.*, (1998), o acetato de etilo foi considerado um dos melhores solventes para extrair CF das grainhas de uva, pois apresenta seletividade para extrair proantocianidinas. Também os álcoois, como o etanol e o metanol são comumente utilizados, pois permitem obter rendimentos de extração elevados. Vários estudos mostraram que, para a extração de CBA de resíduos vinícolas, a utilização de misturas de solventes orgânicos com água são mais eficientes do que os sistemas mono-componente, pois a presença de água aumenta a permeabilidade da grainha de uva, melhorando a transferência de massa, assim como a recuperação os CBA solúveis em água (Spigno *et al.*,2007).

Agustin-Salazar *et al.*, (2014) estudaram os melhores sistemas para a extração de CF, concluindo que os melhores solventes são: uma mistura de metanol, água e acetona (com proporção 3:3,5:3,5) e uma solução de água e etanol (com proporção 6:4 ou 7:3). A razão entre o volume de solvente e a massa de amostra também é um parâmetro importante para a eficiência do processo de extração. De acordo com Fontana *et al.* (2013) o aumento desta razão promove o aumento do rendimento da extração; no entanto, para evitar o desperdício de solvente, situações de saturação e equilibrar os custos, é necessária uma razão que não seja nem muito baixa nem muito alta. Adicionalmente, os autores comprovaram que a temperatura e o tempo de extração também são parâmetros importantes. Por um lado, o aumento da temperatura favorece a extração, melhorando a solubilidade do soluto e o coeficiente de difusão. Por outro lado, o aumento da temperatura, diminui a tensão superficial e a viscosidade do solvente, o que facilita a penetração do mesmo em camadas mais internas da matriz sólida. No que diz respeito ao tamanho das partículas, verifica-se que a extração apresenta melhores resultados para partículas de menores dimensões. De facto, com a diminuição da partícula, há um aumento da área de superfície, o que aumenta o tempo de contacto entre o solvente e a matriz e, como consequência, melhora a extração (Ignat *et al.*, 2011).

A ESL usando o extrator Soxhlet é uma das técnicas mais utilizadas para a extração de CF de subprodutos da vinificação. Esta técnica de extração é simples, a amostra é colocada num cartucho de papel no interior do extrator e o solvente é evaporado e condensado, entrando em contacto com a substância sólida. O processo é repetido até a extração estar completa. A extração Soxhlet é um processo fácil de realizar, com elevada reprodutibilidade e eficiência. Por oposição, apresenta alguns inconvenientes, nomeadamente, o consumo de solvente, que dependendo do tipo de solvente, pode conduzir a problemas ambientais, e a utilização de temperaturas elevadas, que pode levar à degradação de alguns compostos de interesse (Baiano *et al.*, 2014).

2.5.2 Extração Assistida por Ultrassons

Outro método de extração de CBA de matrizes naturais é a extração assistida por ultrassons (EAU). Esta técnica permite atingir eficiências elevadas a temperaturas relativamente baixas, o que é vantajoso para compostos sensíveis ao calor. As ondas de ultrassom são ondas mecânicas, capazes de romper as células da matriz vegetal, levando a uma migração dos compostos celulares para o solvente. O aprimoramento na extração pelo ultrassom é atribuído, principalmente, ao efeito de cavitação acústica no solvente - são formados microcanais em direção à matriz da grainha de uva, favorecendo a penetração do solvente. O ultrassom também oferece um efeito mecânico que permite maior penetração do solvente, aumentando a área de superfície de contacto entre a fase sólida e líquida e, como resultado, o soluto difunde-se rapidamente da fase sólida para o solvente. De facto, a extração com ultrassons permite aumentar o rendimento e a taxa de extração, reduzindo significativamente o tempo de extração, devido ao aumento da transferência de massa entre a fase sólida e a fase líquida (Demirdöven *et al.*, 2015).

A literatura revela que a EAU é uma técnica bastante utilizada para extrair CF a partir da grainha de uva, pois permite obter rendimentos elevados, em períodos reduzidos (Kalli *et al.*, 2018).

Para além das técnicas previamente apresentadas, existem ainda outras técnicas de extração denominadas verdes, como a extração supercrítica, a extração assistida por micro-ondas, a extração por líquido pressurizado e a extração por enzimas. Na Tabela 4 encontram-se apresentadas, de forma resumida, as principais vantagens e desvantagens, associadas a cada uma destas técnicas.

Tabela 4. Vantagens e desvantagens associadas aos diferentes métodos de extração.

Método de Extração	Vantagens	Desvantagens
Extração Sólido-Líquido	- Método bastante utilizado, com muito <i>know-how</i> ; - Procedimento simples.	- Possibilidade de extração de compostos indesejáveis; - Não é adequado a compostos termossensíveis.
Extração Assistida por Ultrassons	- Processo rápido; - Método de elevada eficiência; - Adequado a compostos termossensíveis.	- Distribuição das ondas não uniforme; - Diminuição da potência com o tempo.
Extração Supercrítica	- Solvente não tóxicos; - Tempo de extração reduzido; - Adequado a compostos termossensíveis.	- Custos de equipamento elevados; - Custos de operação elevados.
Extração Assistida por Micro-ondas	- Método simples; - Tempo de extração reduzidos; - Menores consumos de solvente.	- Custos de equipamento elevados.
Extração por Líquido Pressurizado	- Técnica rápida; - Baixo consumo de solvente; - Fácil de automatizar.	- Seletividade baixa; - Custo de equipamento elevado.
Extração Assistida por Enzimas	- Rendimentos de extração elevados; - Técnica <i>eco-friendly</i> , pois não necessita de solventes.	- Desempenho das enzimas facilmente afetado pelo pH e pela temperatura.

Fonte: Alija *et al.*, 2011; Kasiri e safapour, 2015.

A seleção do solvente a utilizar na extração é uma etapa importante e existe um conjunto de condições que devem ser consideradas, como a solubilidade, a seletividade, o custo, a segurança e a sustentabilidade – que, atualmente, é um aspeto cada vez mais importante. Efetivamente, os solventes alcoólicos são bastante eficientes para a extração de CF, devido à natureza polar destes compostos. Assim, o etanol é um solvente adequado na extração dos CF, pois é um solvente GRAS (*Generally Recognized As Safe*) aprovado pela FDA, o que faz com que a sua utilização na indústria cosmética seja segura. Além disso, o seu custo é relativamente baixo, é biodegradável e a sua toxicidade é reduzida, cujas características ecológicas o tornam num solvente frequentemente utilizado (Tournor *et al.*, 2015).

Após a realização da extração é importante verificar a sua eficiência na extração de compostos de interesse. Uma das estratégias normalmente utilizadas é a determinação da capacidade antioxidante, dos extratos obtidos. Caso se pretendesse determinar a eficiência de extração de AO específicos, a metodologia mais utilizada é o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), sendo, no entanto, necessário o uso de padrões analíticos, ou seja, dos AO de interesse.

2.6 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante encontra-se relacionada com a aptidão que os compostos AO apresentam em proteger sistemas biológicos contra potenciais reações envolvendo espécies reativas de oxigénio ou azoto. É uma metodologia útil para a avaliação da eficiência de diferentes técnicas de extração de CF (antioxidantes). Os estudos da capacidade antioxidante são realizados, na sua maioria, por dois tipos de ensaios: ensaios associados à peroxidação de lípidos ou ensaios baseados na captura de eletrões ou radicais livres. No caso dos subprodutos da uva, a segunda técnica é a mais usada, sendo os métodos padronizados mais comuns o ensaio com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e o método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) (Fontana *et al.*, 2013). Apesar destes serem os mais usuais, existem outros como o método capacidade antioxidante em equivalentes de trolox (TEAC), também conhecido como método do ácido 2,2-azino-bis (3- etilbenzotiazolin) -6-sulfónico (ABTS) e o método CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), uma metodologia mais recente (Zulueta *et al.*, 2008). Na Tabela 5, encontram-se apresentadas as principais vantagens e desvantagens de cada uma das metodologias de determinação da capacidade antioxidante previamente apresentadas.

Tabela 5. Vantagens e desvantagens das metodologias de determinação da capacidade antioxidante.

Metodologia	Vantagens	Desvantagens
DPPH	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica fácil, simples e rápida; - Apenas necessita de um espectrofotómetro UV/Vis; - Possibilidade de compra do radical DPPH, logo não é necessário produzi-lo. 	<ul style="list-style-type: none"> - O tempo de reação não é exato; - O radical DPPH nem sempre é muito reativo, devido à sua estabilidade e impedimento estérico.
ORAC	<ul style="list-style-type: none"> - Usa radicais livres biologicamente relevantes; - Método padronizado: permite a comparação de dados entre laboratórios; - Combina a percentagem e o tempo de inibição de reação antioxidante numa única magnitude. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer equipamentos de elevado custo; - A utilização de equipamentos diferentes produz uma alta variabilidade nos resultados; - Sensível ao pH; - Tempo de reação longo.
ABTS	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica barata e fácil de utilizar; - Não é sensível ao pH, permitindo estudar o seu efeito do mesmo na capacidade antioxidante; - Reação rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Etapa extra para formar o radical livre a partir do sal ABTS; - O radical livre não é estável durante períodos longos; - Não é um método padronizado, o que dificulta a comparação de resultados.
CUPRAC	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica simples, rápida e com custos reduzidos; - Consegue detetar todas as classes de antioxidantes; - Aplicável tanto em antioxidantes lipofílicos como os hidrofílicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - O tempo de reação não é exato, varia conforme a solução em análise.

Fonte: Zuleta *et al.*, 2017; Alzagameen *et al.*, 2018.

O ensaio com DPPH é uma técnica espectrofotométrica, que permite determinar a capacidade antioxidante de forma rápida e simples, na qual o DPPH é utilizado como reagente. O DPPH é um composto que apresenta um radical livre estável que, na presença de AO (agente redutor), aceita um átomo de hidrogénio doado pelo AO. Esta reação altera a cor da solução que passa de roxa para amarela.

Deste modo, é possível determinar a capacidade antioxidante da solução através da medição da diminuição da absorvância da mesma ao comprimento de onda (λ) de 517 nm. Uma vez que, a capacidade antioxidante é proporcional ao desaparecimento do DPPH, quanto mais clara for a cor da solução, maior será o poder AO do extrato ou composto analisado (Zulueta *et al.*, 2008). De modo a padronizar os resultados, os resultados devem encontrar-se em equivalente de Trolox – molécula similar à vitamina E, mas solúvel em água. A Figura 5 ilustra a reação que ocorre entre o DPPH e o agente AO.

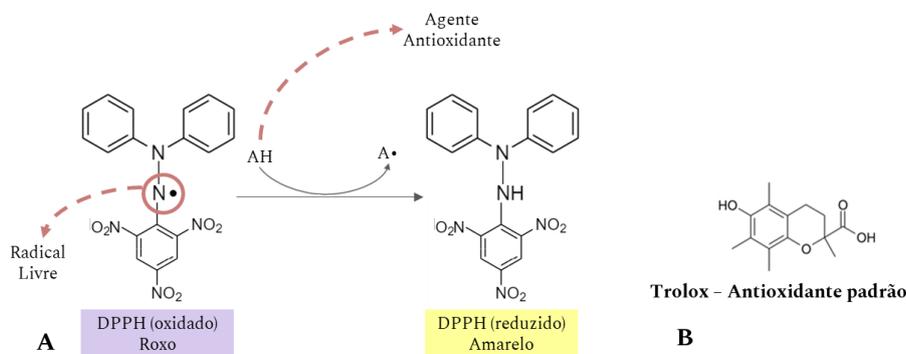


Figura 5. Esquema da reação entre o DPPH e o agente antioxidante, AH, (A) e molécula de Trolox, usada para normalizar os resultados (B).

2.7 Estabilidade do Creme de Rosto

De forma a validar um produto cosmético e tornar possível a sua comercialização, é necessário obter informações sobre a sua estabilidade, para garantir a segurança do consumidor durante a sua utilização. Assim, é necessário que todos estes produtos sejam submetidos a um conjunto de testes de estabilidade, que permitem concluir se os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos estão dentro dos valores padrão. Deve ainda verificar-se se existem fatores que podem comprometer a utilização do produto, ao longo do tempo. A realização destes testes permite determinar o período de prateleira do produto, assim como as condições ideais para transporte, armazenamento e utilização. Existem três categorias principais de testes a ser considerados: testes relativos à embalagem, físico-químicos e microbiológicos (Cosmetics Europe, 2004). Na Tabela 6 são apresentados alguns dos referidos testes.

Tabela 6. Alguns dos testes de estabilidade que devem ser realizados e respectivas considerações.

Teste	Considerações
Físico – Químicos	Propriedades organolépticas
	Deve ser selecionada uma gama de cores e/ou cheiros. Caso o produto se encontre fora dessa gama, deve ser considerado insatisfatório.
	pH
	Verificar se o pH se mantém dentro dos valores aceites (compatível com o pH da pele): 4,5 – 6,0.
	Viscosidade
	Ajuda a garantir que este parâmetro não se altera ao longo do tempo.
Estabilidade térmica - <i>Freeze-thaw cycles</i>	Permite identificar a existência de problemas na suspensão, instabilidade da emulsão e problemas na embalagem.
Mecânicos – Teste da centrífuga	Ajudam a prever se os movimentos durante o transporte vão afetar o produto e permite determinar se haverá a separação da emulsão.
Oxidação lipídica	Possibilita o estudo da suscetibilidade do produto face à oxidação.
Antimicrobiano	Permite prever a capacidade dos microrganismos alvo se desenvolverem e crescerem no creme.
Compatibilidade com a pele - <i>Patch</i>	Permite verificar se o produto não causa irritação aguda cutânea.
Compatibilidade com a pele – Teste de irritação e sensibilização cumulativa	Permite avaliar se o produto provoca ação sensibilizante para a pele.
Hidratação	Permite determinar o período de hidratação do produto.

Fonte: Cosmetics Europe, 2004.

3 Design do Produto

Para a produção de uma formulação cosmética é crucial realizar um *design* do produto. Este envolve um conjunto de passos dos quais se salientam a identificação das necessidades do mercado e do consumidor, geração de ideias e seleção da mais viável para posterior produção. Começa-se por definir os requisitos que o produto deve ter, no sentido de garantir que as necessidades do consumidor são cumpridas. A cada requisito é atribuída uma especificação, que consiste numa “tradução” dos requisitos para uma propriedade específica. A cada especificação é associada uma métrica, que corresponde à unidade de medida da especificação e permite quantificá-la. Contudo, por vezes, as especificações são qualitativas e sensoriais, o que impossibilita a atribuição de uma métrica. Por último, atribui-se o *rank* a cada requisito, que permite avaliar os requisitos de acordo com a sua importância para cumprir as necessidades do consumidor. Este define as prioridades dos diferentes requisitos durante o processo de *design*. O *rank* atribuído aos requisitos pode ser categorizado pelos seguintes níveis: 5 – Obrigatório; 4 – Prioritário; 3 – Recomendado. No caso do creme de rosto em questão, para garantir que as características pretendidas eram cumpridas, os requisitos selecionados foram divididos nas seguintes categorias: *Performance* do Produto; Perceção do Produto; Propriedades de Escoamento; Legislação e Comercialização.

Na Tabela 7 são apresentados os requisitos relacionados com a *performance* do produto. As propriedades hidratantes de um creme de rosto são essenciais e como tal, considera-se este requisito obrigatório (*rank* 5), pois se não fosse cumprido, o produto final não seria o esperado. Além disso, o creme não deve ser irritável, não devendo causar irritações nem vermelhidões na pele, e deve apresentar pH compatível com a mesma; desta forma atribuiu-se o *rank* 5 a estes requisitos. Ainda nos requisitos com *rank* 5, considerou-se a homogeneidade, pois pretende-se ter um creme com textura e aspeto homogéneo. No que diz respeito às características antienvhecimento do creme de rosto, classificou-se o requisito com *rank* 4, uma vez que não é obrigatório para garantir a *performance* do produto, devendo ser considerado como prioritário.

Tabela 7. Requisitos, especificações, métrica e rank para a performance do produto.

<i>Performance</i> do Produto				
Número	Requisito	Especificação	Métrica	Rank
1	Hidratar a pele	Hidratação	Perda de água transdérmica (g·h ⁻¹ ·m ⁻²)	5
2	Antienvhecimento	Concentração	mg _{composto} /g _{amostra}	4
3	Homogeneidade	Tensão Superficial	Pa	5
4	pH compatível com a pele	Valor de pH	-	5
5	Não irrita a pele	Irritabilidade - Teste de irritação e sensibilização cumulativa	-	5

Quanto aos requisitos enumerados para a percepção do produto, representados na Tabela 8, salienta-se a importância do creme de rosto apresentar uma textura cremosa, uma vez que esta é a preferência dos consumidores. Visto que, a percepção do produto dita o sucesso das vendas do produto, considerou-se que, apesar do caráter naturalmente subjetivo desta categoria, a este requisito deve ser atribuído o *rank* 5. O produto deve apresentar cor apelativa e cheiro agradável, pois estes invocam as sensações (visual e ao olfato) do consumidor, tornando a aplicação do produto mais interessante, pelo que foi atribuído *rank* 4 a estes requisitos.

Tabela 8. Requisitos, especificações, métrica e rank para a percepção do produto.

Percepção do Produto				
Número	Requisito	Especificação	Métrica	Rank
6	Cheiro Agradável	Subjetiva	-	4
7	Cor Apelativa	Absorvância	nm	4
8	Textura cremosa	Viscosidade	Pa·s	5

Na Tabela 9, encontram-se os requisitos estabelecidos para as propriedades de escoamento. Estes foram todos considerados de caráter obrigatório, uma vez que se prendem com o desempenho do creme ao longo da aplicação. É necessário que o creme seja fácil de espalhar, tanto para ser mais confortável para o consumidor, como para facilitar a aplicação do produto. O creme deve aderir facilmente à pele, mantendo-se no rosto durante a aplicação do mesmo, para posterior absorção cutânea. Após a abertura da embalagem, é essencial que o creme mantenha as suas propriedades e características.

Tabela 9. Requisitos, especificações, métrica e rank para as propriedades de escoamento.

Propriedades de Escoamento				
Número	Requisito	Especificação	Métrica	Rank
9	Fácil espalhamento	Viscosidade	Pa·s	5
10	Boa aderência à pele	Viscosidade	Pa·s	5
11	Manter-se na pele durante a aplicação	Tensão superficial	Pa	5
12	Manter propriedades após abertura da embalagem	Conteúdo em água	mg/L	5

Na Tabela 10, encontram-se enumerados os requisitos relacionados com a legislação. Nesta categoria, todos os requisitos devem apresentar *rank* de 5, pois são obrigatórios por lei e o seu incumprimento impossibilita a comercialização de um produto no mercado. Como tal, este deve-se mostrar seguro tanto para o consumidor como para o meio ambiente, pelo que deve ser dermatologicamente compatível com a superfície da pele e não deve ser tóxico. É também obrigatório que os componentes do creme estejam de acordo com as concentrações limitadas pelos valores legislados.

Além disso, todos os produtos devem, obrigatoriamente, ser devidamente rotulados, conforme a legislação em vigor, e nesse rótulo deve constar, entre outros pontos importantes, o prazo de validade do produto depois da abertura da embalagem.

Tabela 10. Requisitos, especificações, métrica e rank para a legislação do produto.

Legislação				
Número	Requisito	Especificação	Métrica	Rank
13	Não tóxico	-	-	5
14	Dermatologicamente compatível	-	-	5
15	Composição de acordo com os valores legislados	Concentração	mg _{composto} /g _{amostra}	5
16	Rotulagem	-	-	5
17	Prazo de validade depois de aberto	Tempo	Meses	5
18	Respeitar o regulamento (CE) N.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos	-	-	5
19	Respeitar a diretiva 76/768/EEC da UE: EU <i>Cosmetics Regulations and Registration</i>	-	-	5

Por fim, na Tabela 11 estão discriminados os requisitos referentes à comercialização. Estes estão maioritariamente relacionados com a embalagem, que é o primeiro contacto que o consumidor tem com o produto. Nenhum destes requisitos foi classificado como obrigatório, pois a comercialização do produto é independente dos mesmos. Mesmo assim, uma embalagem esteticamente apelativa, invocando as características distintas do produto, e *eco-friendly* dá maior visibilidade ao produto e capta mais a atenção do consumidor. A embalagem não deve ser muito grande de modo a facilitar o transporte e manuseamento, pelo que se considerou que o creme deveria apresentar um volume de 50 mL – o volume usual em produtos desta categoria. Esta deve ser resistente, para evitar eventuais fugas e a degradação do produto. Assim, foi atribuído o *rank* 4 a estes requisitos, pois devem ser considerados prioritários. Importa definir um preço de venda, o que não só permite a introdução do produto no mercado como define também qual o tipo de consumidor alvo. Assim, estima-se que o preço de venda do creme de rosto em estudo deve situar-se entre os 15 e os 30 €, visto que é um produto constituído, maioritariamente, por produtos de origem natural, valorizado pela adição de subprodutos agrícolas – a grainha de uva e as cascas de limão - que conferem odor agradável e propriedades AO; como o preço influencia a escolha do consumidor, atribuiu-se o *rank* 5 a este requisito.

Tabela 11. Requisitos, especificações, métrica e rank para a comercialização do produto.

Comercialização do Produto				
Número	Requisito	Especificação	Métrica	Rank
20	<i>Eco-friendly</i>	Tipo de embalagem	-	4
21	Embalagem pequena	Volume	mL	3
22	Embalagem esteticamente apelativa	Aparência	Subjetivo	4
23	Embalagem resistente	Tipo de embalagem	-	4
24	Preço de venda entre 15 – 30 €, por uma embalagem de 50 mL	Preço	€	5

A Figura 6 exemplifica um possível design da embalagem do creme de rosto.



Figura 6. Esquema de um possível design da embalagem do creme. A – Design do frasco; B – Design da embalagem de cartão para armazenamento do creme, com o respetivo rótulo.

4 Materiais e Métodos

Neste projeto produziu-se um creme de rosto avaliando a sua estabilidade. Realizou-se a extração de compostos bioativos a partir de resíduos agrícolas, a grainha de uva, para obtenção do extrato fenólico e do óleo. Extraíu-se ainda o OE das cascas de limão. Avaliou-se a capacidade antimicrobiana e a capacidade antioxidante. A Figura 7 resume as várias etapas realizadas ao longo do projeto.

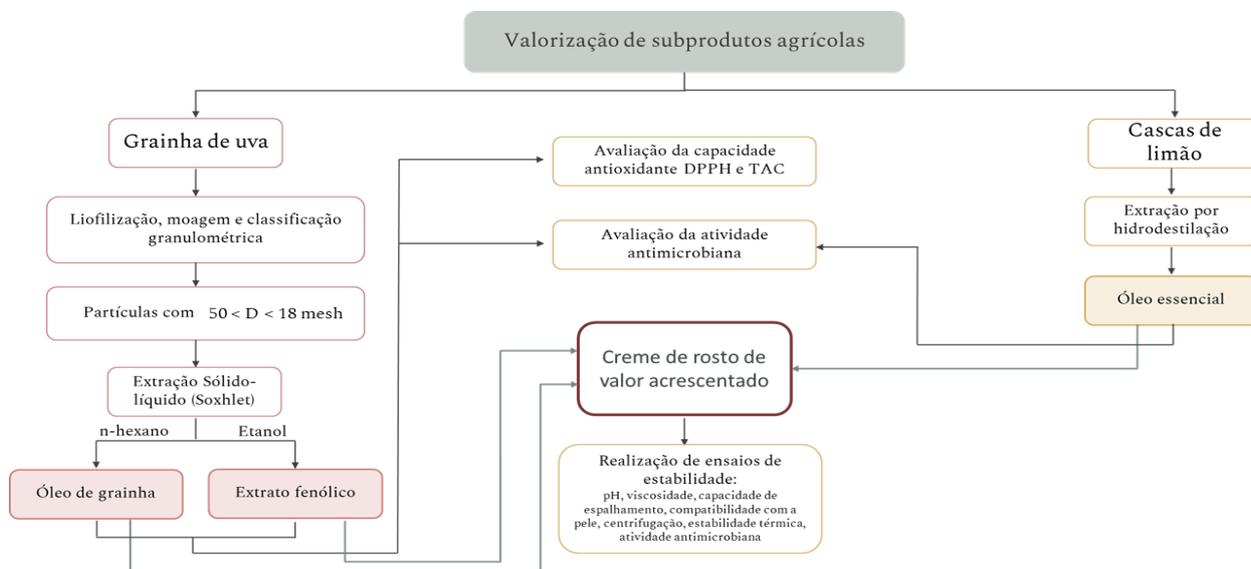


Figura 7. Esquema representativo das principais etapas do projeto.

4.1 Reagentes

A grainha utilizada foi obtida em Alfândega da Fé, Bragança, Portugal, sendo proveniente de uvas de três castas: Touriga nacional, Touriga francesa e Tinta-roriz. As cascas de limão foram obtidas a partir de limões cultivados em Arentim, Braga, Portugal. Os solventes para as extrações foram etanol puro (Ref. 1.02371.1000, C₂H₆O, CAS 64-17-5) a partir de VWR (Fontenay-sous-Bois, França) e n-hexano a 95 % (CH₃(CH₂)₄CH₃, CAS 110-54-3) a partir de Valente e Ribeiro (Idanha, Portugal). Para capacidade antioxidante e antimicrobiana utilizou-se DPPH (Ref. D9132, C₁₈H₁₂N₅O₆, CAS 1898-66-4), Trolox (Ref. 238813, C₁₄H₁₈O₄, CAS 53188-07-1), ácido ascórbico (Ref. PHR1008, C₈H₈O₆, CAS 50-81-7), ácido fórmico (Ref. 5.43804, CH₂O₂, CAS 64-18-6), um kit de análise de capacidade antioxidante total (Ref. MAK187) e BHT (Ref.47168, C₁₅H₂₄O, CAS 128-37-0) adquiridos através de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes utilizados para os cremes foram glicerina (COSM-01216), goma xantana (Ref. GOMA-00762), óleo de coco (Ref. INCOCO-00185), óleo de amêndoas doces (Ref. ACEI-01886), betaína (Ref. COR-COSM-00969) e lecitina de soja (Ref.L0023, CAS 8002-43-5), adquiridos, respetivamente, através de GranVelada (Saragoça, Espanha) e TCI (Tóquio, Japão). Para o teste de oxidação lipídica utilizou-se cloreto de bário dihidratado (Ref.217565, BaCl₂.2H₂O, CAS 10326-27-9) partir de Sigma Aldrich (St. Louis, MO,EUA), sulfato de ferro (II) (Ref. 24244.232, FeSO₄.7H₂O, CAS 7782-63-0), ácido clorídrico (Ref. 20255.290 ,HCl, CAS 7647-01-0) adquiridos de VWR (Fontenay-sous-Bois, França), tiocianato de amónio (Ref.A10632, CH₄N₂S,CAS 1762-95-4) adquirido de Alfa Aesar (Haverhill, MA, EUA), clorofórmio

(Ref.438607, CH₃Cl, CAS 67-66-3) e metanol (Ref. 414816, CH₃OH, CAS 67-56-1) de Carlo Erba (Barcelona, Espanha). A água utilizada foi desionizada e ultrapura com um sistema de purificação de água Millipore™ (Massachusetts, EUA) tendo 18,2 Ω de resistência elétrica.

4.2 Equipamento

A liofilização da grainha realizou-se num liofilizador (SP Scientific, Nova Iorque, EUA). As pesagens foram realizadas numa balança de escala analítica Mettler Toledo AG245 (Columbus, OH, EUA). Utilizou-se um banho de refrigeração (JP Selecta, Barcelona, Espanha), para auxiliar as extrações. A evaporação do solvente de extração efetuou-se num sistema de evaporação (Büchi R-200, Flaiwil, Suíça). Para a medição das absorvâncias, utilizou-se espectrofotómetro UV-Vis V-530 (Jasco, OK, EUA). Para a produção dos cremes utilizou-se um banho termostático (Fontenay-sous-Bois, França), um homogeneizador de alta performance (IKA T18 Digital ULTRA-TURRAX®, Staufen, Alemanha), uma placa de agitação (AREX Digital, VELP Scientifica, Monza, Itália). Utilizou-se um leitor de multiplacas para a leitura de absorvância dos ensaios de capacidade antioxidante (Synergy, HT, Biotek, EUA). Para os ensaios de estabilidade utilizou-se um medidor de pH digital (XS Instruments, Capri, Itália), uma centrífuga (Centrifuge 5424, eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e um viscosímetro (ViscoStar plus, Fungilab, Nova Iorque, EUA).

4.3 Obtenção e Tratamento das Grainhas de Uva

De modo a realizar a extração dos CBA da grainha, foi necessário efetuar a sua limpeza. Assim, as grainhas foram sujeitas a 3 lavagens consecutivas com água destilada, de modo a remover impurezas que estivessem presentes na matéria-prima, tais como peles e cascas. De seguida, as grainhas foram liofilizadas a -90 °C, a uma pressão de 1,3 Pa, durante 3 dias. Posteriormente, a grainha liofilizada foi moída, com auxílio de moedor de grãos de café e, seguidamente foi peneirada, com o objetivo de obter grãos de dimensão semelhantes, optando-se pelas partículas de tamanho intermédio (entre 18 e 50 mesh).

4.4 Obtenção do Extrato Fenólico e do Óleo de Grainha

A extração dos compostos fenólicos e do óleo de grainha foram realizadas através de uma ESL, recorrendo ao método Soxhlet. Utilizou-se 25 mL etanol para 5 g de amostra, ou seja, uma razão solvente amostra de 5:1 (V/m), para a extração do extrato fenólico. Na extração do óleo, usou-se 50 mL de n-hexano para 5 g de amostra, ou seja, uma razão solvente amostra de 10:1 (V/m). Nas duas extrações, o solvente foi colocado num balão de fundo redondo de 100 mL, ao qual foram adicionados reguladores de ebulição, e a amostra foi colocada no interior de um Soxhlet de 25 mL, dentro de um cartucho de papel de filtro. Procedeu-se à montagem do equipamento, colocando o Soxhlet entre o balão de fundo redondo e o condensador, em posição de refluxo. As extrações com etanol e n-hexano foram realizadas a uma temperatura de 80 °C e 70 °C, respetivamente, durante 105 minutos. Após a extração, o solvente foi removido do extrato recorrendo a um evaporador rotativo, cuja temperatura do banho utilizado foi de 45 °C e 35 °C, para o etanol e para o n-hexano, respetivamente. Antes da evaporação total dos solventes,

transferiu-se o conteúdo para frascos de âmbar, previamente pesados. Finalizou-se a evaporação com uma corrente de azoto e os frascos foram posteriormente pesados e armazenados. No Apêndice A encontra-se o esquema da montagem.

4.5 Extração de Óleo Essencial da Casca de Limão

Iniciou-se o processo pela seleção das cascas sem sinais de decomposição. Posteriormente, procedeu-se à sua lavagem de modo a remover impurezas superficiais e melhorar o rendimento da extração e a qualidade dos óleos. A casca superficial do limão foi obtida com o auxílio de um ralador. A extração foi efetuada por hidrodestilação: colocou-se 100 g de casca de limão, 200 mL de água destilada e reguladores de ebulição, num balão de fundo redondo de 1 L. A extração foi realizada a 100 °C. Ao fim de 60 minutos, verificou-se a formação de duas fases no destilado, sendo a fase superior correspondente ao OE. Utilizando de uma micropipeta retirou-se a fase do óleo para ser armazenado num frasco escuro pré-pesado. No Apêndice A encontra-se uma representação da montagem utilizada.

4.6 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi medida recorrendo a 2 métodos, o ensaio com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e Capacidade Antioxidante Total (TAC).

4.6.1 DPPH

A metodologia DPPH foi realizada de acordo com o procedimento referenciado por Prieto (2012) no protocolo “*Prieto’s DPPH microplate assay*”, com algumas modificações. Para a determinação da capacidade antioxidante foi necessário preparar a microplaca de 96 poços. No Apêndice B encontra-se um esquema da microplaca utilizada. De notar que, nos poços das amostras colocou-se 200 µl de amostra no primeiro poço e nos restantes 100 µl de metanol e as diluições foram feitas a partir do primeiro poço com 100 µl. A adição do DPPH foi efetuada no final da preparação da placa, deixando-a a incubar durante 30 minutos. A leitura da absorvância foi medida a $\lambda = 517$ nm.

4.6.2 TAC

O teste TAC foi realizado de acordo com o procedimento apresentado no kit do produto: *Total Antioxidant Capacity Assay* (TAC) da Sigma-Aldrich. Preparou-se da 6 mL de solução de trabalho de Cu^{2+} , colocando 120 µL de Reagente Cu^{2+} e 5880 µL de diluente, misturando a solução com agitação no vortéx. Posteriormente, preparou-se a solução *standard* de Trolox, reconstituindo o Trolox com 20 µL de DMSO (sulfóxido de dimetilo) e 980 µL de água pura, agitando no vortéx. A determinação da capacidade antioxidante foi feita utilizando uma microplaca de 96 poços. A preparação dos padrões para a reta de calibração foi feita pela adição de 0, 4, 8, 12, 16 e 20 µL da solução Trolox nos poços, em duplicado, aos quais se acrescentou água pura até perfazer os 100 µL. De seguida, as amostras diluídas (entre 1:65496 e 1:2183) foram colocadas em duplicado. Adicionou-se 100 µL da solução de Cu^{2+} a todos os poços.

No Apêndice B encontra-se um esquema da microplaca utilizada. Por último, a placa foi colocada num local escuro, durante 90 min, e a absorvância foi medida a $\lambda = 570$ nm.

4.7 Produção do Creme de Rosto

Na Tabela 12 encontram-se apresentadas as concentrações dos diferentes ingredientes selecionados para a formulação do creme. As diferentes formulações foram denominadas de F1 a F7, de acordo com as alterações efetuadas na formulação. A fase A (fase aquosa) - composta por água ultrapura, glicerina e goma xantana - e a fase B (fase oleosa) - constituída por óleo de coco, óleo de amêndoas doces, lecitina de soja e betaína - foram aquecidas até 70 – 75 °C e misturadas, separadamente. Seguidamente, adicionou-se a fase B à fase A, mantendo-se a agitação e a temperatura e, de seguida procedeu-se à homogeneização da mistura, utilizando um homogeneizador de alta *performance*, Ultra Turrax, a uma velocidade de 12000 rpm, durante 2 minutos. Posteriormente, a mistura foi arrefecida até uma temperatura inferior a 40 °C e adicionou-se os estabilizadores de formulação nos ensaios F2 a F7. O ensaio F1 foi utilizado como branco, pelo que não teve adição de ingredientes extra. A F2 adicionou-se antioxidante comercial (BHT) para este creme ser usado como padrão. A F3 e F4 adicionou-se extrato fenólico de grainha de uva, com diferentes concentrações, para avaliar se o aumento da concentração provocava alterações. Aos cremes F5 e F6, para além do extrato fenólico, adicionou-se óleo de grainha e óleo essencial de limão, respetivamente, de modo avaliar a sua influência. Por último, no creme F7 adicionou-se o extrato fenólico e os dois óleos.

De realçar que as quantidades (%) usadas são semelhantes às reportadas na literatura e estão de acordo com a legislação, nomeadamente os estabilizadores de formulações.

Tabela 12. Formulação e composição dos diferentes cremes produzidos.

Ingredientes		Função	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
			(% mássica)						
Fase A	Água Purificada	Veículo	73,6	73,5	73,5	73,4	73,4	73,3	73,2
	Glicerina	Humectante				7,6			
	Goma Xantana	Espessante				0,6			
Fase B	Óleo de Coco	Emoliente				7,6			
	Óleo de Amêndoas Doces	Emoliente				6,8			
	Lecitina de Soja	Emulsificante				3,0			
	Betaína	Emulsificante Secundário				0,8			
Estabilizadores de formulação	Extrato Fenólico de Grainha de Uva	Antioxidante Natural	-		0,1	0,2		0,1	
	BHT	Antioxidante Sintético	-	0,1			-		
	Óleo de Grainha de Uva	Emoliente e Fragrância			-		0,1	-	0,1
	Óleo Essencial de Limão	Conservante e Fragrância			-				0,2

A justificação da escolha dos ingredientes e o equipamento utilizado encontra-se no Apêndice C.1.

4.8 Testes de Estabilidade

Após a produção das várias formulações foi necessário avaliar a estabilidade das mesmas, recorrendo a um conjunto de testes. De referir que todos os testes, com exceção do teste da estabilidade térmica, foram realizados à temperatura ambiente (20 – 25 °C).

4.8.1 Teste de pH

Para a determinação do pH das amostras em estudo, foi utilizado um medidor de pH digital, medindo-se o valor diretamente, isto é, sem dissolver a amostra. Os testes de pH das diferentes amostras foram realizados ao final de 1, 3, 7, 14 e 21 dias após o armazenamento das mesmas (Navarro-Pérez *et al.*, 2021). No Apêndice C.2 encontra-se o equipamento utilizado.

4.8.2 Viscosidade

A viscosidade das amostras foi medida recorrendo a um viscosímetro. A viscosidade das diferentes amostras foi medida ao final de 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a produção das mesmas (Navarro-Pérez *et al.*, 2021). No Apêndice C.2 encontra-se o equipamento utilizado.

4.8.3 Compatibilidade com a Pele

O teste de compatibilidade com a pele foi realizado utilizando o teste do autocolante. Uma pequena quantidade de creme foi colocada na parte interior do braço, previamente lavada, sobre a qual foi colocado um penso rápido. Ao longo de 24 horas, verificou-se se havia algum tipo de reação como comichão, irritação ou vermelhidão (Navarro-Pérez *et al.*, 2021).

4.8.4 Teste de Capacidade de Espalhamento

A determinação do espalhamento foi realizada de acordo com Chen *et al.*, (2016) com algumas adaptações. Colocou-se 0,15 g de amostra entre duas lâminas de vidro, de seguida, colocou-se, cuidadosamente, um peso de 20,0 g no centro da lâmina superior. Após 1 minuto, o peso foi removido, e o diâmetro da amostra espalhada foi medido. Este foi realizado ao final de 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a produção dos cremes.

4.8.5 Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado ao fim de 21^o dias após a produção das formulações. Os testes foram realizados à velocidade de 5000 rpm, durante 10 minutos, a 25 °C, utilizando 0,5 g grama de amostra em cada tubo (Navarro-Pérez *et al.*, 2021). No Apêndice C.2 encontra-se o equipamento utilizado.

4.8.6 Teste de Estabilidade Térmica

O teste de estabilidade térmica foi realizado recorrendo ao método *Freeze-thaw cycles*. As amostras foram colocadas em frascos e foram sujeitas a 4 ciclos, cada um com duração de 24 h, entre um congelador (- 4 ± 3 °C), temperatura ambiente (20 – 25 °C), uma estufa (40,0 ± 0,5 °C) e temperatura ambiente (20 – 25 °C) (Navarro-Pérez *et al.*, 2021).

4.9 Capacidade Antimicrobiana

Para comprovar a capacidade antimicrobiana do extrato fenólico, do óleo de gralha e do OE de limão, foram realizados testes de difusão em disco, utilizando o meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*). Selecionou-se bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. O método foi realizado de acordo com Leal *et al.*, (2018). As suspensões foram feitas a partir de uma cultura pura, em solução com NaCl a 0,9%, em que a turbidez foi ajustada até ao valor de 0,5 na escala de McFarland. Com uma zaragatoa, as estirpes foram inoculadas sobre as placas. De seguida, colocou-se 1 disco de papel de filtro estéril em cada quadrante da placa e um no centro. Definiu-se três controlos, um controlo negativo - água destilada - e dois controlos positivos - o ácido ascórbico e ácido fórmico. Procedeu-se ao teste da ação antimicrobiana colocando 7 µL de amostra, 7 µL de água destilada e 7 µL dos controlos positivos, nos respetivos discos. As placas de PCA foram incubadas numa estufa a 37 °C durante 24 horas e, após incubação, foram avaliados os halos de inibição da atividade dos microrganismos.

4.10 Estabilidade Lipídica

A estabilidade lipídica foi avaliada pela medição do Índice de Peróxidos (IP), utilizando o método descrito por Shantha *et al.*, (1994). Para preparar as soluções de cloreto de ferro (II), dissolveu-se 0,4 g de cloreto de bário dihidratado em 50 mL de água. Esta solução foi adicionada lentamente a uma solução de sulfato de ferro (II) (0,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de água), com agitação constante. Adicionou-se 0,2 mL de ácido clorídrico 10 N, levando à precipitação do sulfato de bário, que foi filtrado, obtendo-se assim a solução de ferro (II). Para a preparação da solução de tiocianato de amónio, dissolveu-se 30 g deste, perfazendo-se o volume até 100 mL, com água. Para avaliar o IP da amostra, colocou-se 0,1 g desta num tubo descartável e misturada com 9,8 mL de clorofórmio:metanol (7:3) utilizando um vortéx durante 2 a 4 segundos, adicionando 50 µL de cada uma das soluções previamente preparadas. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorvância da amostra foi medida a $\lambda = 500 \text{ nm}$ e comparada com a absorvância do branco (que contem todos os reagentes, menos a amostra).

4.11 Acondicionamento, destino e tratamento de resíduos

Os resíduos líquidos gerados consistiram, maioritariamente, em soluções orgânicas contendo etanol, n-hexano, metanol e clorofórmio. Estes resíduos foram recolhidos em recipientes fechados, devidamente etiquetados, e foram armazenados longe da luz e de fontes de ignição para posterior tratamento de resíduos por parte do EcoFEUP (Sistema de Gestão Ambiental da FEUP).

5 Resultados e Discussão

5.1 Obtenção do Extrato Fenólico e Óleo de Grainha

Os CF presentes na grainha de uva foram extraídos recorrendo à técnica de ESL utilizando um extrator Soxhlet, sendo o solvente de extração o etanol puro. Realizaram-se ensaios preliminares de ESL simples e EAU (Apêndice A.2), mas, o método que permitiu obter melhores rendimentos foi o ESL (Soxhlet). Tal como supramencionado, os CF são relativamente polares e, como tal, os solventes alcoólicos são os melhores para a sua extração. Elegeu-se o etanol como solvente pois é reconhecido como GRAS e também por ter ponto de ebulição relativamente baixo, o que diminui os custos energéticos e facilita o processo de eliminação do solvente da amostra. Apesar da literatura referir que soluções de água e etanol permitem alcançar rendimentos superiores, esta opção não foi selecionada, pois a eliminação da água presente na amostra após a extração, é um processo complexo e demorado. De acordo com Fontana *et al.*, (2013), o aumento da razão volume de solvente e massa de amostra, promove o aumento do rendimento da extração. Esta não deve ser demasiado elevada, de modo a facilitar a eliminação do solvente e os custos associados. Assim, foram realizados ensaios em que a razão foi alterada (7:1, 6:1 e 5:1). Optou-se pela razão de 5:1 (V/m) visto que permitiu alcançar rendimentos mais elevados com menor volume de solvente. A temperatura da extração foi de 80 °C, pois temperaturas altas favorecem a extração e é um valor próximo da temperatura de ebulição do etanol.

O óleo da grainha de uva foi extraído também pelo método de ESL, utilizando um extrator Soxhlet, com n-hexano a 95 % como solvente de extração. Este solvente é dos mais usuais para a extração do óleo, devido às suas características apolares, à sua elevada estabilidade e temperatura de ebulição relativamente baixa. De acordo com a literatura, o aumento da razão solvente/amostra permite alcançar rendimentos superiores, em que este pode variar entre 4:1 a 40:1 (V/m) (Baydar *et al.*, 2007). Optou-se por utilizar uma razão de 10:1 (V/m), de modo a diminuir o consumo de solvente. Na Tabela 13 encontram-se os valores dos rendimentos das extrações ESL com extrator Soxhlet, do extrato fenólico, com etanol, e do óleo, com n-hexano. Os cálculos efetuados encontram-se no Apêndice A, subcapítulos A.1 e A.2.

Tabela 13. Rendimento da extração dos compostos fenólicos e óleo da grainha, usando extração sólido líquido (método Soxhlet), para um tempo de extração de 105 minutos.

Ensaio	Extrato Fenólico			Óleo de Grainha		
	Massa Grainha (g)	Massa Extrato (g)	Rendimento (%)	Massa Grainha (g)	Massa Extrato (g)	Rendimento (%)
1	5,00	0,85	16,99	5,00	$5,53 \times 10^{-1}$	11,04
2	5,01	0,83	16,59	5,01	$6,14 \times 10^{-1}$	12,25
3	5,02	0,82	16,38	5,02	$7,08 \times 10^{-1}$	14,10
$\bar{x} \pm \sigma$	$5,01 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,01$	$16,65 \pm 0,25$	$5,01 \pm 0,01$	$6,25 \times 10^{-1} \pm 0,78 \times 10^{-1}$	$12,46 \pm 1,54$

A percentagem de extração de CF foi de 16,65 % (valor médio). Segundo Drosou *et al.*, (2015), nas mesmas condições operatórias às utilizadas, mas com uma razão solvente: amostra de 33:1 e com tempo de extração entre 2 a 3 horas, o rendimento obtido variou entre os 11 e os 16 %. Por sua vez, Pinelo *et al.*, (2005) e Campos *et al.*, (2008), extraíram CF em condições idênticas às utilizadas, contudo o tempo de extração foi superior (6 horas) e o solvente foi etanol a 96 %, alcançando rendimentos de extração de 15,1 e 13,2 %, respetivamente. De facto, o rendimento obtido foi superior aos valores da bibliografia. Uma possível explicação para esta distinção dos resultados pode dever-se às pequenas diferenças no solvente utilizado (etanol puro ou etanol a 96 %), o que resulta na extração de alguns CF ligeiramente mais apolares. Com efeito, a maioria dos CF existentes na grainha de uva são pouco solúveis em água, pois apresentam coeficientes de partição octanol-água ($k_{o/w}$) superiores a 1. Como exemplo, a quercetina e o ácido cafeico apresentam $k_{o/w}$ de 1,48 e 1,15, respetivamente, o que os torna mais solúveis em solventes alcoólicos do que em água (NCBI, n.d.). A utilização de tempos de extração mais elevados, no caso dos autores, poderá conduzir à degradação de alguns CF sensíveis à temperatura e provocar a diminuição no rendimento. A variedade, a origem, o cultivo e a área de crescimento das uvas utilizadas também interfere no rendimento da extração. Burčová *et al.*, (2019) estudaram o conteúdo fenólico total presente no extrato fenólico obtido através de ESL, com extrator Soxhlet utilizando etanol como solvente, com uma razão de 50:1 e uma duração de 6 horas. Os autores constataram que o extrato apresentava 113,7 g equivalentes de ácido gálico (GAE)·kg de extrato⁻¹. O extrato obtido, pelos autores, foi analisado por HPLC e verificou-se que este era constituído por ácido cumárico (11,0 g·kg⁻¹), catequina (2,7 g·kg⁻¹), quercetina (1,4 g·kg⁻¹) e ácido cafeico (0,6 g·kg⁻¹). Assim, atendendo às condições semelhantes, a composição do extrato fenólico poderá ser semelhante à encontrada na bibliografia.

Tal como referido anteriormente, para além da ESL com extrator Soxhlet, foram realizadas mais extrações utilizando métodos diferentes, de modo a verificar qual destes permitia alcançar rendimentos superiores. Assim, efetuou-se três extrações sólido-líquido convencional e nove extrações recorrendo à metodologia EAU, utilizando três tempos de extração diferentes (5, 10 e 15 minutos), todas nas mesmas condições anteriormente especificadas. No Apêndice A.2, encontram-se apresentados os resultados para cada uma das técnicas utilizadas. Verificou-se que os rendimentos médios obtidos foram 11,79 %, 12,75 %, 13,31 % e 13,33 % para a ESL convencional, EAU 5 minutos, EAU 10 minutos e EAU 15 minutos, respetivamente. Os valores obtidos foram ainda analisados pelo teste *t* de Student, onde se observou que o valor-*p* foi inferior a 0,05 em todos os ensaios, o que contraria a hipótese nula. Assim, é possível afirmar que os valores obtidos são significativamente diferentes e que o método ESL utilizando extrator Soxhlet é mais eficiente.

Para o óleo de grainha, a média dos rendimentos obtidos foi de 12,46 %. De acordo com a literatura, os rendimentos obtidos pelo método de ESL, utilizando um extrator Soxhlet, com n-hexano encontram-se no intervalo de 9 a 16 %.

De facto, Baydar *et al.*, (2007) e Dimić *et al.*, (2020), alcançaram rendimentos de 12 a 16 % e 9 a 10 %, respetivamente. Analisando os resultados obtidos, verifica-se que o rendimento se encontra dentro dos valores esperados. A variação entre os resultados pode estar relacionada com o tempo de extração utilizado, visto que o rendimento é superior para tempos de extração elevados (igual ou superior a 6 horas). Com efeito, o aumento do tempo de extração aumenta o tempo de contacto entre a matriz da grainha e o solvente, o que permite melhorar a extração e aumentar o rendimento. Contudo, pode existir a degradação de alguns compostos mais sensíveis à temperatura. Baydar *et al.*, (2007) avaliaram o conteúdo de óleo total de 4 espécies de uva diferentes. Estes comprovaram que o principal constituinte nas 4 amostras era o ácido linoleico ($C_{18:2}, \Delta^{9,12}$) - (63 – 71 %); procedido pelo ácido oleico ($C_{18:1}, \Delta^9$) - (16 – 22 %); ácido palmítico ($C_{16:0}$) - (7 – 10 %); ácido esteárico ($C_{18:0}$) - (3 – 5 %) e o ácido linolênico ($C_{18:3}, \Delta^{9,12,15}$) - em quantidades muito baixas (< 1 %). Burčová *et al.*, (2019) determinaram o conteúdo total em tocoferóis do óleo de grainha, obtendo um valor de 402,3 mg·kg⁻¹ de extrato⁻¹. Os autores verificaram que o constituinte maioritário era o α -tocoferol (265,3 mg·kg⁻¹), seguido do γ -tocoferol (79,1 mg·kg⁻¹), β - tocoferol (35,6 mg·kg⁻¹) e δ -tocoferol (22,3 mg·kg⁻¹).

Deste modo, é esperado que o óleo de grainha obtido apresente composição semelhante à da bibliografia, contudo, a espécie de uva utilizada, assim como as condições e área de cultivo podem provocar diferenças na composição química.

5.2 Obtenção do Óleo Essencial de Limão

A extração do OE a partir das cascas de limão foi realizada pelo método de hidrodestilação, pois é um método convencional, bastante utilizado devido à sua fácil execução e reprodutibilidade; além disso, a utilização de água como solvente torna-o mais ecológico – comparativamente aos solventes orgânicos -, mais barato e seguro. A seleção dos parâmetros de extração foi concretizada com base no estudo de Sikdar *et al.*, (2017). O tempo de extração selecionado foi de 60 minutos e a temperatura de 100 °C. Os autores concluíram que o aumento da razão volume solvente e massa de amostra aumentava o rendimento da extração, verificando que o rendimento máximo foi obtido para 100 gramas de cascas de limão, por 200 mL de água. Assim optou-se por utilizar uma razão 2:1 (V/m). A Tabela 14 apresenta o rendimento das extrações realizadas. Os cálculos efetuados encontram-se no Apêndice A, subcapítulos A.1 e A.3.

Tabela 14. Rendimento da extração de óleos essenciais por hidrodestilação.

Ensaio	Massa Casca de Limão (g)	Massa Óleo (g)	Rendimento (%)
1	100,47	0,81	0,81
2	100,30	0,62	0,63
3	100,20	0,83	0,83
$\bar{x} \pm \sigma$	100,25 \pm 0,11	0,76 \pm 0,09	0,76 \pm 0,09

O rendimento médio das extrações realizadas foi de 0,76 %. Segundo Sikdar *et al.*, (2017), nas mesmas condições operatórias, o rendimento obtido foi de 1,40 %. Golmakani *et al.*, (2016) alcançaram um rendimento de 1,22 %, numa extração com condições operatórias ligeiramente diferentes: o tempo de extração foi de 120 minutos e a temperatura de 100 °C, numa razão de 9:1 (V/m). A principal justificação para a diferença dos resultados pode estar associada com a espécie e a origem do limão utilizado, visto que a composição da casca pode ser diferente, o que causa alterações na composição do óleo e a concentração de OE presentes pode também ser inferior. A diferença de rendimentos face à literatura poderia ser explicada pelo facto do OE ter sido recolhido com auxílio de uma micropipeta, originando perdas. Para diminuir as perdas nesta fase, procedeu-se um ensaio extra, onde a separação do óleo foi realizada através de uma ampola de destilação de 50 mL. Porém, como o rendimento obtido nos dois ensaios foi igual, optou-se pela utilização da micropipeta.

A composição do óleo pode ser realizada através de técnicas como cromatografia gasosa. Sikdar *et al.*, (2017), estudaram a composição química do OE obtido a partir de limões da espécie *Citrus limon*, verificando que este era constituído maioritariamente por D-limoneno (94,13 %), seguido de β -mirceno (3,79 %), α -pineno (1,24 %) e octanol (0,84 %). Uma vez que, o *C. limon* é o limão mais comum a nível europeu, é esperado que a composição do OE obtido seja semelhante à apresentada pelos autores. Todavia, esta pode variar pois a percentagem de ingredientes ativos presentes nos OE depende da zona geográfica em que o limão foi plantado e das características ambientais, como a temperatura, altitude, exposição solar, solo e da chuva (Lopresto *et al.*, 2014).

5.3 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato fenólico e do óleo de grainha de uva foi determinada através de duas metodologias: o método DPPH e o método da capacidade antioxidante total (TAC). Esta última técnica foi utilizada apenas para o extrato fenólico, devido a limitações nos reagentes disponíveis. Foi necessário preparar soluções com as amostras, visto que estas (principalmente o extrato fenólico) apresentam colorações muito opacas, o que faz com que não seja possível ler a absorvância. Deste modo, preparou-se uma solução de extrato fenólico com 500 mL de água, com 2 % de DMSO, e uma solução de óleo de grainha com 50 mL de água, com 2 % de DMSO. O tratamento dos dados encontra-se no Apêndice B. A Tabela 15 apresenta os valores de capacidade antioxidante para o óleo e extrato fenólico pelos métodos DPPH e TAC. Para o método DPPH foram utilizados dois valores de comparação com a literatura: a percentagem de inibição e a concentração de amostra necessária para diminuir em 50% a concentração inicial dos radicais DPPH (IC_{50}). De notar que, quanto menor for o IC_{50} , maior será a percentagem de inibição de DPPH e, consequentemente, a capacidade antioxidante também é maior.

Tabela 15. Capacidade antioxidante do extrato fenólico e do óleo de grainha, pelos métodos DPPH e TAC.

Método	Extrato Fenólico	Óleo de Grainha
DPPH (% de Inibição de DPPH)	89,90	20,90
DPPH (IC ₅₀) (μg _{amostra} ·mL _{DPPH} ⁻¹)	65,14	437,28
TAC (μmol de equivalentes de Trolox·mL ⁻¹)	57,52	-

Os resultados da Tabela 15 mostram que a capacidade antioxidante do extrato fenólico é bastante superior à do óleo de grainha. Com efeito, os resultados estão de acordo com o esperado, pois o extrato é rico em compostos fenólicos (como as catequinas, as antocianinas, entre outros) fator potenciador da capacidade antioxidante. No caso do óleo de grainha, a capacidade antioxidante deve-se à presença de tocoferóis e de tocotrienóis (Kalli *et al.*, 2018).

Gengaihi *et al.*, (2014) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos obtidos de diferentes resíduos da vinificação, utilizando diferentes solventes. Estes verificaram que o extrato obtido a partir da grainha, utilizando etanol como solvente de extração, apresentava entre 90,23 % e 93,91 % de inibição de DPPH, para duas das espécies estudadas. Também Ghafoor *et al.*, (2020) quantificaram a capacidade antioxidante do extrato de grainha de uva de diferentes variedades presentes na Turquia. Os autores constataram que a percentagem de inibição de DPPH variava entre os 79,22 % e 90,24 %. Comparando os resultados obtidos no ensaio laboratorial com os valores da literatura, conclui-se que o valor é semelhante aos dos estudos citados. As ligeiras diferenças detetadas podem dever-se às condições da extração, nomeadamente a técnica selecionada, o solvente utilizado e a temperatura de extração, além das condições de cultivo, a fase de maturação do fruto e pela origem e espécie da uva. No mesmo sentido, Campos *et al.*, (2008) quantificaram a capacidade antioxidante do extrato fenólico obtido a partir do bagaço de uva atingindo um valor de IC₅₀ de 49,50 μg_{extrato}·mL_{DPPH}⁻¹. Este valor é inferior ao obtido na experiência o que pode ser devido ao extrato ser proveniente do bagaço de uva, ao invés de ser apenas da grainha. Adicionalmente, Doshi *et al.*, (2015) quantificaram a capacidade antioxidante dos extratos fenólicos da grainha de uva, extraídos com metanol 80 %, pelo método ABTS, obtendo 1870 μmol_{Trolox}·mL⁻¹_{solução}. Por sua vez, Libera *et al.*, (2020) obtiveram um valor de 514 μmol_{Trolox}·mL⁻¹_{solução} pelo método ABTS, para o extrato fenólico de grainha de uva extraído com etanol 40 %. Os valores encontrados na literatura são superiores ao valor obtido pelo método TAC. Esta discrepância, para além de outros fatores já mencionados, pode dever-se ao facto de os autores utilizarem um método diferente, o método ABTS, que determina a atividade antioxidante pela captura dos radicais ABTS^{•+}.

Fernandes *et al.*, (2013) quantificaram a capacidade antioxidante do óleo de grainha de 10 espécies diferentes de uva, obtendo valores entre 38,70 % e 69,90 %. De facto, o valor obtido foi bastante inferior aos alcançados pelos autores. Possivelmente, por estes utilizarem tempos de extração superiores (24 horas) e éter de petróleo como solvente de extração, que pode ser mais eficiente na extração de tocoferóis e tocotrienóis do que o n-hexano, aumentando a capacidade antioxidante do óleo.

Também Burčová *et al.*, (2019), avaliaram a capacidade antioxidante do extrato de grainha de uva, tendo obtido um valor de $528,0 \mu\text{g}_{\text{extrato}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$. O valor dos autores é ligeiramente superior ao obtido, o que significa que o extrato dos autores apresenta menor capacidade antioxidante do que o extrato obtido no ensaio. A diferença pode dever-se às uvas utilizadas serem de espécies diferentes.

Os resultados obtidos sugerem que o extrato fenólico e o óleo de grainha de uva apresentam capacidade antioxidante (ainda que bastante menor no caso do óleo), o que os torna passíveis de serem utilizados como agentes AO.

5.4 Capacidade Antimicrobiana

A capacidade antimicrobiana foi testada no extrato fenólico, no óleo de grainha e no OE de limão sobre três microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (bactérias do grupo Gram-positivo) e *Escherichia coli* (bactéria do grupo Gram-negativo). A *E.coli* e a *S. aureus* foram selecionadas para a realização destes ensaios, pois são dos patogénicos mais utilizados para avaliar o efeito dos conservantes presentes em cosméticos. Utilizou-se a *S. epidermidis* pois, apesar de ser considerado um microrganismo relativamente inócuo, é geralmente aceite como um patogénico oportunista. Como controlos positivos selecionou-se o ácido ascórbico e o ácido fórmico. Foi utilizada uma solução de ácido ascórbico de 14 % e uma solução de ácido fórmico de 0,2 % segundo os valores recomendados na literatura (Telang *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2016). Os resultados da capacidade antimicrobiana encontram-se na Tabela 16. Cada amostra em estudo foi estudada em triplicado, sendo apresentado o valor médio dos 3 ensaios. No Apêndice D, são apresentados todos os valores obtidos.

Tabela 16. Média dos diâmetros dos halos de inibição do extrato fenólico, óleo de grainha, óleo essencial e controlos, após 24h de incubação.

Microrganismo	d _{halo} (mm)					
	Extrato Fenólico de Grainha	Óleo de Grainha	Óleo Essencial de Limão	Ácido Ascórbico	Ácido Fórmico	Água Ultrapura
<i>S. aureus</i>	16,7	< 5,0	5,5	8,7	< 5,0	< 5,0
<i>S. epidermidis</i>	19,3	< 5,0	7,5	7,0	6,5	< 5,0
<i>E. coli</i>	< 5,0	< 5,0	< 5,0	6,7	< 5,0	< 5,0

Nota: Os ensaios foram realizados em triplicado. A notação < 5,0 é referente aos ensaios onde não foi possível medir o halo de inibição (valor muito pequeno).

Pela análise da Tabela 16, constata-se que a água não apresentou halos de inibição para nenhum dos microrganismos. Isto deve-se ao facto desta solução ser utilizada como controlo negativo e, como tal, não inibe o crescimento de nenhuma estirpe em questão. É possível verificar que o ácido ascórbico apresentou halos de inibição para todas as estirpes, como era esperado pois é usado como controlo positivo e se trata de um conservante bastante utilizado na indústria cosmética. No caso do ácido fórmico, não foi possível medir os halos de inibição contra a *S. aureus* e *E. coli*.

Relativamente ao extrato fenólico, os resultados obtidos foram os expectáveis. Estes são referentes a uma solução de concentração de $300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Verificou-se que o extrato apresenta atividade contra a *S. aureus* e *S. epidermidis* e não contra a *E. coli*, o que era esperado. Os microrganismos Gram-negativos apresentam uma dupla camada fosfolipídica, o que os torna menos suscetíveis à ação do extrato (Silva *et al.*, 2018). A literatura revela que as grainhas são os constituintes da uva com maior capacidade antimicrobiana, existindo uma relação de proporcionalidade direta entre o conteúdo fenólico total e o diâmetro dos halos de inibição, o que demonstra que estes são responsáveis por esta atividade biológica. Xu *et al.*, (2015) estudaram a capacidade antimicrobiana do extrato fenólico obtido a partir do bagaço de uva. Os autores estudaram uma solução de concentração de $300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, verificando que o extrato apresentava atividade antimicrobiana contra a *S. aureus* e não impedia o crescimento da *E. coli*. Silva *et al.*, (2018) comprovaram que a presença de CF no meio não afetava o crescimento das bactérias do grupo Gram-negativo; além disso, apuraram que das bactérias Gram-positivas estudadas, as da espécie *Staphylococcus* (como a *S. aureus* e *S. epidermidis*) eram as mais afetadas pela presença de extrato no meio.

Para o óleo de grainha de uva não foi possível medir o halo de inibição. Este dado não significa que o óleo não apresentou atividade antimicrobiana, uma vez que pode ter havido formação de halo por baixo do disco. Um estudo conduzido por Dabetic *et al.*, (2020) provou que o óleo de grainha extraído com clorofórmio apresentava atividade antimicrobiana contra a *S. aureus*. Os autores relacionaram a capacidade antimicrobiana com o conteúdo de ácidos gordos, nomeadamente o ácido linoleico, o qual pode ser o responsável pela atividade no óleo. Também o conteúdo em tocoferóis apresenta influência na inibição do crescimento de microrganismos, em especial os Gram-positivo.

No caso do OE obtido a partir de cascas de limão, este apresentou capacidade antimicrobiana contra a *S. aureus* e *S. epidermidis*, porém o mesmo não aconteceu com a *E. coli*. Estes resultados encontram-se dentro do esperado, pois o OE de limão é constituído maioritariamente por D-limoneno e este composto apresenta efeito antimicrobiano reduzido, contrariamente ao que acontece com o linolol e o citral, constituintes minoritários do OE (Fisher e Phillips, 2008). Era também previsto que o OE não apresentasse atividade contra a *E. coli*. Com efeito, a literatura revela que os OE apresentam maior capacidade antimicrobiana contra microrganismos Gram-positivo do que contra Gram-negativo. Uma possibilidade para esta disparidade entre os microrganismos pode dever-se à presença de uma membrana dupla na estrutura nos Gram-negativo, que os protege da ação do óleo. Hsouna *et al.*, (2017) realizaram um estudo sobre a capacidade antimicrobiana do OE limão, onde demonstraram que este apresentava capacidade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, com halos de inibição de 22, 16 e 15 mm, respetivamente. De facto, estes valores são superiores aos obtidos, o que pode estar associado à diferença na composição do OE; os autores verificaram que o principal constituinte do óleo era o D - limoneno (39,74 %), seguido β -pineno (25,44 %) e α -terpinol (7,30 %), entre outros compostos minoritários.

Efetivamente, tal como referido anteriormente, a percentagem de ingredientes ativos pode não ser igual nos OE, encontrando-se dependente de vários fatores como a origem e condições de cultivo do limão.

5.5 Produção do Creme Hidratante

Na literatura, encontram-se várias formulações de cremes de rosto. Neste estudo, após 6 ensaios iniciais, designados de formulações preliminares (FP) - onde se testou o tipo de agitação (magnética e mecânica), o tipo de surfactante e a proporção de ingredientes - produziu-se o que passamos a denominar de formulação (F). A Tabela A.4.1 (ver Apêndice A.4) apresenta as formulações de cada ensaio preliminar e o Apêndice C.1 a justificação relativa à seleção de cada ingrediente utilizado.

Os dois primeiros ensaios, FP 1 e FP 2, consistiram na produção de formulações experimentais com betaína como surfactante (emulsificante), uma vez que a lecitina não estava ainda disponível. Estes ensaios permitiram obter informações sobre quantidades e condições experimentais a utilizar nos ensaios posteriores com a lecitina, registando-se as seguintes conclusões: necessidade de incluir o agente espessante (goma xantana) e de aumentar a quantidade de emulsificante (betaína). Em FP 3, as percentagens dos ingredientes usados tiveram por base o artigo de Zhou *et al.*, (2009), com algumas modificações. O produto deste ensaio foi um creme de cor branca, com textura adequada e boa capacidade de espalhamento. Na formulação FP 4, conforme previsto, a lecitina foi utilizada como emulsificante. Os emolientes usados foram o óleo de coco e o óleo de amêndoas doces. A FP 4 foi o ensaio que registou melhores resultados pois apresentava aparência e viscosidade típica de creme, boa capacidade de espalhamento e hidratação, com ausência de grânulos. Contudo, a mistura não era totalmente homogénea verificando-se zonas sem formação de emulsão. Assim, em FP 5 adicionou-se betaína como emulsificante secundário, de modo a melhorar a emulsão produzida. A adição deste ingrediente, ainda que em pequena quantidade, melhorou significativamente a homogeneidade do creme, tal como a cor que passou de amarelo forte para amarelo claro. Por último, produziu-se a FP 6 com a mesma composição de FP 5, alterando-se a agitação. Com efeito, em FP 5 utilizou-se agitação magnética, tal como nos anteriores, e verificou-se que o resultado parecia homogéneo a olho nu. Analisada a amostra em microscópio, constatou-se que esta não era homogénea. Assim, no ensaio FP 6 foi utilizado um homogeneizador de alta *performance*, Ultra Turrax, para a emulsificação da solução. A utilização deste equipamento permitiu obter um creme muito mais cremoso e de cor mais apelativa (bege claro), confirmando-se a homogeneidade inclusive na análise microscópica (confrontar Tabela A.4.1, Apêndice A).

Uma vez determinada a melhor formulação e as condições ideais para a produção do creme desenvolveram-se 7 formulações, tal como descrito no Capítulo 4.7. No creme F2 adicionou-se o AO sintéticos (BHT) numa percentagem de 0,1 %. Este ingrediente foi escolhido, uma vez que era necessário elaborar um ensaio com AO sintéticos, para comparação com o creme com extrato fenólico; além disso, este é dos AO sintéticos mais utilizados na indústria cosmética, sendo aprovado pela FDA (Andersen,2002).

Definida a percentagem de BHT, decidiu-se fazer dois ensaios com o extrato fenólico: um utilizando a mesma percentagem que o AO sintético – 0,1 % – (F3) e outro utilizando o dobro – 0,2 % – (F4), pois o extrato para além dos compostos AO é rico noutros CBA e, como tal, pode ser utilizado em quantidades superiores. Em F5 adicionou-se extrato fenólico (0,1 %) e óleo de grainha. Como este último, também apresenta capacidade antioxidante optou-se por utilizar na mesma percentagem que o BHT (0,1 %). Em F6, adicionou-se 0,2 % de OE de limão e 0,1 % de extrato fenólico. Selecionou-se esta percentagem, visto que os óleos essenciais em quantidades elevadas podem provocar irritação na pele; adicionalmente, estes compostos encontram-se, geralmente, entre os 0,11 % e os 0,38 %, optando-se por um valor intermédio de 0,2 % (IFRA,2020). Por último, na formulação F7, acrescentou-se o extrato fenólico e o óleo de grainha - 0,1 % de cada - e o OE de limão – 0,2 %. Na Figura 8, encontram-se apresentadas todas as formulações desenvolvidas, a designação UT foi a nomenclatura utilizada para descrever os ensaios realizados com o Ultra-Turaxx.



Figura 8. Formulações desenvolvidas ao longo do projeto, F1 a F7, da esquerda para a direita.

5.6 Ensaio de Estabilidade

Após a produção dos cremes (F1 a F7) procedeu-se à avaliação da sua estabilidade. Assim, estes foram sujeitos a diversos tipos de testes, ao longo de 21 dias. No Apêndice C.2 encontram-se os equipamentos utilizados para a realização dos ensaios, assim como os valores dos ensaios de pH, viscosidade e capacidade de espalhamento, ao longo do período de análise.

No caso das propriedades organolépticas, cor e cheiro, verificou-se que estas mantiveram-se praticamente inalteradas ao longo do período de estudo. Todas as formulações apresentaram uma coloração bege, em que F1 e F2 mostravam uma tonalidade mais amarelada que as restantes (tons mais claros). Quanto ao cheiro, os cremes F1 e F2 eram inodoros, os cremes F3 a F5 apresentavam aroma suave de uva e, por último, os cremes F6 e F7 exibiam um perfume bastante agradável, devido à adição do OE de limão. Apenas o creme F1 evidenciou uma ligeira alteração de aroma, de cheiro ligeiramente desagradável, possivelmente devido à oxidação de alguns dos ingredientes da formulação. Nos restantes cremes, esta variação não foi detetada pois já possuíam AO. Relativamente à aparência, todos os cremes mostraram ser homogêneos e não foram detetados grânulos no período de análise.

Com objetivo de avaliar a estabilidade dos cremes, realizaram-se testes de estabilidade acelerados. Na Figura 9 encontram-se os resultados obtidos após o teste da centrifugação e do ensaio de estabilidade térmica. No fim do teste da centrifugação, constatou-se que nenhum dos ensaios apresentou separação de fase demonstrando uma boa estabilidade das emulsões. O ensaio de estabilidade térmica permitiu concluir que não houve alterações na emulsão, com exceção da formulação F3 onde houve uma ligeira separação, possivelmente devido à emulsão não estar totalmente estável. Os cremes foram ainda sujeitos a um teste de capacidade antimicrobiana, seguindo um procedimento semelhante ao efetuado para estudar o extrato fenólico, o óleo de grainha e o OE de limão. Pela Figura 9 é possível observar que apenas as formulações F5 e F6 conseguiram inibir o crescimento dos microrganismos estudados. De facto, as formulações produzidas são constituídas maioritariamente por água, o que as torna mais suscetíveis ao crescimento de microrganismos. Para evitar esta situação, deveria ser realizada uma nova formulação, com maior quantidade de conservantes, nomeadamente o ácido ascórbico, para inibir o crescimento dos microrganismos.



Figura 9. Resultados obtidos para os diferentes ensaios de estabilidade realizados. A – Teste de centrifugação; B – Teste de estabilidade térmica; C – Teste antimicrobiano.

Relativamente às restantes propriedades físico-químicas, como pH, viscosidade e espalhamento, na Figura 10 encontram-se as variações destas propriedades ao longo de 21 dias. Pela análise desta, verifica-se que houve pequenas oscilações relativamente à viscosidade e à capacidade de espalhamento; no entanto, estas não foram muito consideráveis. O valor de pH, diminuiu ligeiramente ao longo do período estudado, porém os valores encontram-se dentro da gama desejável, entre os 4,5 – 6,0.

Finalmente, estudou-se a compatibilidade do creme com a pele, de modo a verificar se o produto desenvolvido não provocava nenhum tipo de reação alérgica, tal como, irritações, vermelhidões, comichões ou inflamações. Inicialmente, o teste foi realizado com 5 pessoas não tendo sido verificado nenhum tipo de reação. Posteriormente, no sentido de estudar uma amostra mais significativa, realizou-se um inquérito/teste a 44 pessoas. 95,5 % dos inquiridos afirmou não apresentar qualquer tipo de reação adversa 24 horas após a utilização do creme. Assim, é possível afirmar que o creme de rosto produzido é compatível com a pele. Este e outros resultados do inquérito encontram-se no Apêndice E.

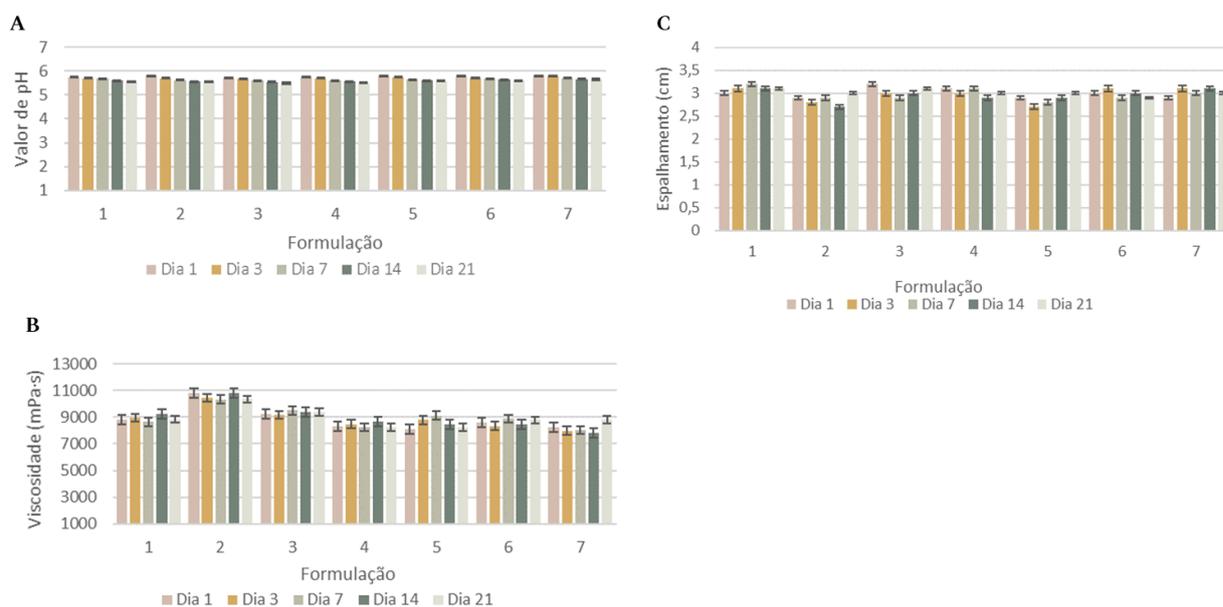


Figura 10. Resultados obtidos para os diferentes ensaios de estabilidade. A – Teste de pH; B - Teste da viscosidade; C - Teste da capacidade de espalhamento.

5.7 Oxidação Lipídica

Os cremes de rosto produzidos contêm óleos que são suscetíveis à oxidação lipídica. De facto, a bibliografia revela que o fenómeno de oxidação lipídica ocorre frequentemente em formulações de produtos de cosmética contendo lípidos insaturados, o que afeta a qualidade do produto final. A oxidação lipídica leva ao desenvolvimento de odores desagradáveis, alterações na cor e afeta a qualidade do produto final. Consequentemente, o tempo de prateleira e a própria *performance* do produto, encontram-se dependentes da estabilidade oxidativa dos lípidos presentes na formulação. Devido à complexidade das análises não existe um método específico descrito na literatura para avaliar o grau de oxidação nos cremes. Contudo, um dos indicadores mais comuns aplicado na indústria cosmética consiste na determinação do índice de peróxidos (IP), relativo à quantificação de hidroperóxidos (produtos de oxidação primária) (Thomsen *et al.* 2018). Assim, a avaliação da extensão da oxidação lipídica foi efetuada pela determinação do IP, cujos resultados se encontram na Tabela 17. No Apêndice C.3, encontra-se a equação utilizada para determinar o IP.

Tabela 17. Valores da absorvância e índice de peróxidos (IP), em miliequivalentes (meq) de O₂ por quilograma de amostra, para as formulações avaliadas.

Creme (formulação)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Absorvância	0,624	0,595	0,598	0,588	0,427	0,605	0,438
Índice de Peróxidos (meq de O ₂ .kg _{amostra} ⁻¹)	0,840	0,732	0,744	0,706	0,108	0,770	0,149

Nota: A absorvância das amostras foi medida a $\lambda = 500$ nm.

É possível verificar que o creme F1 é o que apresenta um valor IP superior. Assim, é possível concluir que este apresentou maior oxidação lipídica face aos restantes, pois quanto maior o IP, maior é a extensão da oxidação do produto (Thomsen *et al.* 2018). Este resultado era esperado, visto que neste creme não foi adicionado nenhum agente AO, tornando a oxidação lipídica mais extensa. Assim, tal como era previsto, o creme F2 apresenta um IP inferior pois contém BHT (AO sintético) que, enquanto agente AO, evita e atrasa a oxidação dos lípidos, protegendo o creme da deterioração. A presença de AO na formulação faz com que estes reajam com os radicais livres, diminuindo a oxidação do produto. Por outro lado, o creme F3, ao qual foi adicionado extrato fenólico, a extensão da oxidação foi superior à do creme F2, o que pode evidenciar uma menor capacidade AO do extrato face ao BHT. Porém, quando a concentração do extrato aumentou para o dobro – 0,2 % – (F4), o valor do IP diminuiu, face a F2 – com 0,1 % de BHT –, o que indica que o aumento da concentração permitiu diminuir a extensão da oxidação dos compostos da formulação. O menor valor de IP foi obtido no ensaio F5, que contem extrato fenólico e óleo de grainha, o que demonstra que estes apresentam efeito antioxidante, prevenindo a oxidação da formulação. O creme F6 apresenta um valor ligeiramente mais elevado do que os restantes (com exceção de F1), o que pode ser justificado pela adição do OE. O ensaio F7 apresentou um valor de IP baixo, o que era esperado devido à combinação entre o extrato fenólico, o óleo e o OE. De acordo com a literatura, ainda que não existam muitos dados, os resultados obtidos revelam que a extensão da oxidação lipídica foi reduzida. Todavia, o facto do IP ser baixo não significa que não tenha ocorrido oxidação. Um IP baixo pode estar relacionado com a conversão rápida dos hidroperóxidos em produtos secundários, que consistem principalmente em aldeídos, como o malondialdeído (MDA). Consequentemente, para a obter informações mais fiáveis e completas do grau de oxidação lipídica nos cremes, a determinação do IP deveria ser combinada com um método de análise de produtos de oxidação secundária. O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) é o método mais comum para a quantificação do MDA, consistindo na medição espectral do complexo cor de rosa formado pela reação de TBA com MDA (Thomsen *et al.* 2018).

Numa fase posterior do projeto, comparou-se a capacidade antioxidante do extrato fenólico obtido da grainha e do AO sintético, BHT. Para tal, recorreu-se ao método DPPH para quantificar a capacidade antioxidante. Assim, preparou-se duas soluções de $3,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, uma de BHT e outra de extrato fenólico. Não foi possível utilizar soluções com a mesma concentração molar, pois a composição exata do extrato fenólico não é conhecida e consequentemente a massa molar dos respetivos componentes. No Apêndice B encontram-se os valores obtidos para o ensaio. Na Tabela 18, encontram-se apresentados os valores da percentagem de inibição de DPPH e de IC_{50} , para o extrato fenólico e para o BHT.

Tabela 18. Capacidade antioxidante do extrato fenólico obtido e do sintético (BHT), pelo método DPPH.

	Extrato Fenólico	BHT
DPPH (% de Inibição de DPPH)	90,03	95,69
DPPH (IC ₅₀) (μg _{amostra} ·mL _{DPPH} ⁻¹)	61,50	33,90

Nota: IC₅₀ é definido como sendo a concentração de amostra necessária para diminuir em 50% a concentração inicial dos radicais DPPH.

Através da análise da Tabela 18, verifica-se que o BHT apresenta uma percentagem de inibição de DPPH ligeiramente maior do que o extrato fenólico. Além disso, a concentração de BHT necessária para inibir 50 % do DPPH é inferior, o que era esperado pois quanto maior a percentagem de inibição, menor será a concentração necessária para inibir 50 % de DPPH. Burčová *et al.*, (2019) quantificaram e compararam a capacidade antioxidante do extrato de grainha, também utilizando etanol como solvente de extração, com a do BHT. Os autores verificaram que o IC₅₀ do extrato obtido era de 29,50 μg_{extrato}·mL_{DPPH}⁻¹, e que este valor era inferior ao do BHT, 39,15 μg_{extrato}·mL_{DPPH}⁻¹, o que demonstra que o extrato fenólico apresenta capacidade antioxidante superior ao BHT. De facto, era esperado que o extrato fenólico apresentasse capacidade antioxidante elevada, pois é constituído por CF. A capacidade antioxidante nestes compostos é explicada pela presença de grupos hidroxilo, aumentando com o aumento no grau de hidroxilação (Teixeira *et al.*, 2014; Nunes *et al.* 2017). A principal razão para esta ligeira disparidade pode dever-se à diferença da quantidade (número de moles) nas duas soluções, uma vez que os compostos nas amostras em estudo podem apresentar compostos diferentes, com massas molares distintas e com menor capacidade antioxidante. Tendo em consideração as massas molares dos CF e do BHT, é possível que a massa molar dos compostos do extrato seja superior à do BHT e, conseqüentemente, o número de moles equivalentes à mesma massa de amostra, será menor, o que pode diminuir a capacidade antioxidante. A Figura 11 apresenta a estrutura química e a massa molar dos compostos fenólicos apresentados no extrato de Burčová *et al.*, (2019) e do BHT. Ou seja, para se fazer a comparação entre o extrato fenólico deste estudo com o da literatura seria necessário também quantificar os principais CF obtidos, o que poderia ser obtido por HPLC.

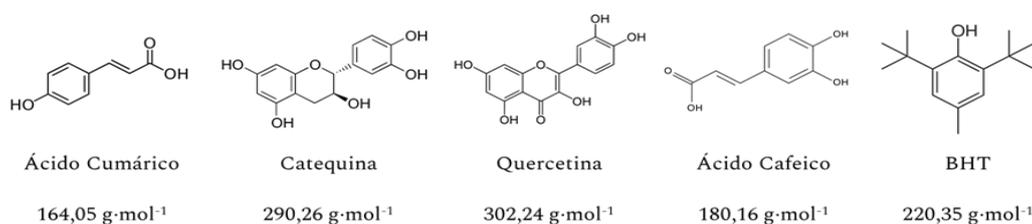


Figura 11. Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos incluindo o BHT, e respetivas massas molares.

Mesmo assim, tendo por base os resultados obtidos, é possível concluir que o extrato fenólico é rico em CBA, que contribuem para as suas propriedades AO. De facto, o extrato obtido apresenta capacidade antioxidante elevada ($50 \mu\text{g}_{\text{amostra}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1} < \text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g}_{\text{amostra}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$), o que demonstra a possibilidade dos resíduos da vinificação, nomeadamente a grainha, poderem ser valorizados através da sua utilização como agente AO de origem de origem natural (Fitrasyah, 2021).

5.8 Avaliação do Produto Final

Por último, produziu-se um creme de rosto, valorizado pela adição do extrato e óleo de grainha, tal como pela adição do óleo essencial de limão, idêntico ao ensaio F7. No sentido de avaliar o produto, realizou-se um inquérito a um painel de 44 pessoas, no qual foram questionados sobre diversos parâmetros relativos ao creme produzido, tais como, cor, textura, capacidade de espalhamento, oleosidade, homogeneidade e capacidade de hidratação. No Apêndice E encontram-se apresentadas as perguntas e as respostas ao inquérito.

De facto, a maioria dos consumidores considerou a cor do creme de rosto apelativa, sendo que 27,3 % dos inquiridos classificaram a tonalidade do creme como relativamente apelativa. No que respeita a textura do creme do rosto, esta foi avaliada como muito agradável pela maioria da amostra.

O creme foi avaliado como sendo fácil de espalhar, pela generalidade da amostra. Relativamente à oleosidade da formulação, o estudo revelou que a maioria da população no estudo considerou que o creme era pouco oleoso, o que se justifica pelo seu elevado conteúdo em água (emulsão O/A).

O creme foi classificado como homogéneo por 36,4 % da população estudada, e como muito homogéneo por 63,6 %. Por último, relativamente à capacidade de hidratação do creme, a maioria dos inquiridos avaliaram-no com boa capacidade hidratante.

No que respeita a possibilidade de reações alérgicas, verificou-se que após um período de 24 horas, 4,0 % do painel apresentou este tipo de reações. Uma das possibilidades associadas a estes efeitos pode estar relacionada com a adição do OE de limão, uma vez que estes óleos podem por vezes provocar irritações e alergias, especialmente em peles mais sensíveis.

Foi realizada também uma pergunta para compreender se a amostra estudada se encontrava disposta a adquirir o creme de rosto em estudo, onde 89,0 % da população respondeu afirmativamente.

Finalmente, foi efetuada uma pergunta relativa a sugestões de melhoria do creme de rosto. Após a sua análise, verificou-se que a maioria das pessoas sugeriu alterar o cheiro, nomeadamente a nível da sua intensidade. Com efeito, uma fração dos inquiridos considerou que o aroma era intenso para um creme de rosto, preferindo um creme com cheiro mais suave ou mesmo sem adição de fragrância. Porém, alguns dos inquiridos sugeriram aumentar a quantidade de fragrância, tentando aumentar o aroma cítrico. A alteração da cor do creme também foi um dos parâmetros referidos, sendo sugerida a produção de um creme de cor branca. A última sugestão foi relativa à viscosidade do creme, uma vez que os consumidores preferem, de forma geral, cremes mais espessos.

Em suma, após a realização do inquérito, verifica-se que a população estudada gostou do creme de rosto produzido, estando disposta a adquiri-lo. Como trabalho futuro deverá ser produzida um novo creme, com uma formulação semelhante, mas que tenha em consideração as opiniões/sugestões dos inquiridos.

6 Conclusões

Com o trabalho realizado na presente dissertação pretendeu-se estudar a possibilidade de valorização de subprodutos agrícolas - a grainha de uva e as cascas de limão - e a sua incorporação em cosmética, num creme de rosto. Realizou-se a extração dos compostos fenólicos da grainha de uva, recorrendo ao método de extração sólido-líquido usando extrator Soxhlet, com etanol puro, e obteve-se um rendimento de 16,65 %. Este valor é superior ao obtido por outras técnicas de extração ensaiadas: a extração sólido-líquido convencional e a extração assistida por ultrassons. Executou-se ainda a extração sólido-líquido do óleo da grainha com extrator Soxhlet com n-hexano, e obteve-se um rendimento de 12,46 %. Ainda que a determinação da composição não tenha sido realizada, prevê-se, com base na literatura, que estes sejam ricos em, respetivamente, flavonoides (catequina e quercetina), ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos; e ácidos gordos como o ácido linoleico e oleico, e em antioxidantes, nomeadamente, em tocoferóis. Na extração de óleos essenciais por hidrodestilação, obteve-se um rendimento de 0,76 %. Mais uma vez, a determinação da composição do óleo não foi determinada, contudo prevê-se que este seja rico em D-limoneno.

Os resultados da capacidade antioxidante do extrato fenólico foram de $57,52 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{solução}}$ pelo método TAC e 89,90 % de inibição de DPPH e IC_{50} de $65,14 \mu\text{g}_{\text{extrato}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$ pelo método DPPH, o que revela que o extrato apresenta capacidade antioxidante elevada. Relativamente ao óleo de grainha, os resultados foram de 20,90 % de inibição de DPPH e IC_{50} de $437,28 \mu\text{g}_{\text{óleo}} \cdot \text{mL}_{\text{DPPH}}^{-1}$. Tal como era esperado, o extrato fenólico apresentou maior capacidade antioxidante. Porém, a adição do óleo nos cremes é importante pois possui ingredientes com funções de emolientes muito relevantes. Assim, verificou-se que o extrato e óleo obtidos apresentam capacidade antioxidante, o que torna possível a sua incorporação como agentes antioxidantes. A nível da capacidade antimicrobiana, verificou-se que tanto o extrato fenólico como o óleo essencial de limão inibiam o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*, porém não foi detetado qualquer efeito contra a *E. coli*.

Adicionalmente, foi possível obter cremes de rosto com texturas semelhantes às existentes no mercado, com cor e aroma apelativo e com valor de pH entre 5 – 6, gama típica para cremes. Por último, com vista a valorizar o creme obtido, incorporou-se o extrato fenólico e óleo de grainha, de modo a atribuir capacidade antioxidante ao creme, assim como, o óleo essencial de casca de limão, de forma a proporcionar um aroma cítrico. Contudo, o creme não apresentou capacidade antimicrobiana, demonstrando a necessidade de produzir uma nova formulação com maior concentração de conservantes. O creme produzido teve uma aceitação muito favorável pelos inquiridos do questionário realizado.

Avaliou-se ainda a extensão da oxidação lipídica dos cremes produzidos verificando-se que os cremes aos quais foram adicionados os extratos, apresentaram menor extensão de oxidação face ao creme sem aditivos.

Por fim, uma comparação entre a capacidade antioxidante, com a mesma quantidade de extrato fenólico obtido e o sintético (BHT), mostrou que estes apresentavam, respetivamente 90,03 % e 95,69 % de inibição de BHT. Este facto demonstra que, o extrato apresenta menor capacidade antioxidante, o que pode ser devido à utilização de concentrações molares dos seus constituintes, ou seja, depende do tipo de compostos existentes no extrato e das massas molares respetivas. Ainda assim, o extrato fenólico apresentou capacidade antioxidante elevada, o que demonstra que a grainha de uva, resultante da produção vinícola, pode ser valorizada, pois permite obter antioxidantes de origem natural.

Concluindo, foi possível produzir um creme facial de valor acrescentado, pela incorporação de extratos e óleos de subprodutos agrícolas, permitindo assim aliar a valorização destes resíduos com a criação de um produto, maioritariamente natural, criando um produto sustentável.

7 Avaliação do trabalho realizado

7.1 Objetivos Realizados

O trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação cumpriu todos os objetivos inicialmente propostos. Foi possível o desenvolvimento de um creme de rosto feito à base de ingredientes naturais, de valor acrescentado. Valorizou-se subprodutos agrícolas, como a grainha de uva e as cascas de limão, através da extração de compostos bioativos, utilizando diversas técnicas de extração. Por último, comprovou-se a capacidade antioxidante do extrato fenólico obtido a partir da grainha de uva, verificando-se que existe possibilidade deste substituir antioxidantes sintéticos.

7.2 Trabalho Futuro

Como trabalho futuro, sugere-se a otimização do processo de ESL dos CF da grainha de uva, através do estudo de diversos parâmetros que influenciam o rendimento da extração. Alguns dos parâmetros a serem avaliados são o tempo de extração, o tamanho das partículas e o tipo de solvente de extração, nomeadamente estudar o efeito de misturas de etanol:água na extração.

Por outro lado, seria interessante analisar o óleo essencial de limão, o óleo de grainha e o extrato obtido através de técnicas de cromatografia, como cromatografia gasosa (GC/FID) para o óleo essencial e a cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC/DAD) para o óleo e extrato de grainha. Para o extrato, os padrões a utilizar devem ser os principais CF presentes no extrato, ácido caféico, catequina, quercetina, epicatequina e procianidina. Para a análise da atividade antioxidante, recomenda-se a utilização de mais métodos, como o método ABTS e ORAC. Seria também importante realizar a microencapsulação do extrato fenólico, pois as suas características antioxidantes, que o tornam atrativo para a indústria cosmética, também são as suas limitações, pois têm tendência a ser facilmente degradados e oxidados. Assim, a utilização desta técnica permitiria aumentar a sua estabilidade e protegê-lo, permitindo também uma libertação controlada dos compostos bioativos. Por fim, recomenda-se a realização de mais estudos de estabilidade dos cremes de rosto produzidos, nomeadamente a nível da oxidação lipídica, como o teste do malondialdeído, estabilidade face à luz e testes de hidratação e compatibilidade com a pele.

7.3 Apreciação Final

O desenvolvimento deste projeto, possibilitou-me a aprendizagem de diversas técnicas laboratoriais e o desenvolvimento de competências e metodologia de trabalho a nível laboratorial. Além disso, proporcionou-me a oportunidade de aprender mais sobre uma área que sempre gostei e tive interesse, a área da cosmética, assim como me deu a oportunidade de desenvolver um produto novo, partindo do “zero”. Por último, o estudo realizado deu-me a conhecer a possibilidade de valorizar subprodutos agrícolas, através da extração de compostos bioativos, permitindo não só diminuir o seu desperdício, mas também criar produtos mais sustentáveis.

8 Referências

- Agustin-Salazar, S., Medina-Juárez, L., Soto-Valdez, H., Manzanares-López, F. and Gámez-Meza, N. (2014), Extraction of phenolic substances for grape marc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20: 208-213. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12063>
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227–249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
- Alzagameem, A., Khaldi-Hansen, B. El, Büchner, D., Larkins, M., Kamm, B., Witzleben, S., & Schulze, M. (2018). Lignocellulosic biomass as source for lignin-based environmentally benign antioxidants. *Molecules*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102664>
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 316–322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.006>
- Andersen, F. A. (2002). *Final Report on the Safety Assessment of BHT 1*. <https://doi.org/10.1080/1091581029009651>
- Asociación Internacional de Fragancias. (2018). Guidance for the Use of IFRA Standards. pp. 45–46.
- Baiano A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes-a review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(9), 14821–14842. <https://doi.org/10.3390/molecules190914821>
- Baydar, N. G., Özkan, G., & Çetin, E. S. (2007). Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites*, 58(1), 29–33. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i1.5>
- Benson, H. A. E., Roberts, M. S., Leite-Silva, V. R., & Walters, K. A. (2019). Cosmetic Formulation. In *Cosmetic Formulation* (Issue April). <https://doi.org/10.1201/9780429190674>
- Britannica. The Editors of Encyclopaedia. (2020). "Cosmetic". Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/art/cosmetic>. Acedido 15 de fevereiro 2021.
- Burčová, Z., Kreps, F., Schmidt, Š., Stržincová, P., Jablonský, M., Kyselka, J., Ház, A., & Šurina, I. (2019). Antioxidant activity and the tocopherol and phenol contents of grape residues. *BioResources*, 14(2), 4146–4156. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.4146-4156>
- Campos, D. A., Gómez-García, R., Vilas-Boas, A. A., Madureira, A. R., Pintado, M. M., Cardoso, S. M., & Fazio, A. (2020). Management of Fruit Industrial By-Products-A Case Study on Circular Economy Approach. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25020320>
- Campos, L. M., Leimann, F. V., Pedrosa, R. C., & Ferreira, S. R. (2008). Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource technology*, 99(17), 8413–8420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.058>
- Carretero, A. S., Rodrigues, F., de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Nunes, M. A., Pinto, D., Vinha, A. F., Linares, I. B., & Oliveira, M. B. P. P. (2018). 12 - Cosmetics. In C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 393–427). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00012-9>

- Caudalie. “*Creme Sorvete Hidratante*”. <https://pt.caudalie.com/a-marca/ingredientes-e-patentes/polifenois/creme-sorvete-hidratante>. Acedido 15 de fevereiro 2021.
- Chanchal, D., & Swarnlata, S. (2008). Novel approaches in herbal cosmetics. *Journal of cosmetic dermatology*, 7(2), 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00369.x>
- Chen, M. X., Alexander, K. S., & Baki, G. (2016). Formulation and Evaluation of Antibacterial Creams and Gels Containing Metal Ions for Topical Application. *Journal of Pharmaceutics*, 2016, 5754349. <https://doi.org/10.1155/2016/5754349>
- Cheng, Y. S., Lam, K. W., Ng, K. M., Ko, R. K. M., & Wibowo, C. (2009). An integrative approach to product development-A skin-care cream. *Computers and Chemical Engineering*, 33, 1097–1113. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2008.10.010>
- Cosmetic Toiletry and Fragrance Association and The European Cosmetic Toiletry and Perfumery. (2004). Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. *Cosmet. Toilt. Frag. As. Eur. Cosmet. Toilt. Perfum. As.*, no.3, pp. 1–8..
- Dabetic, N. M., Todorovic, V. M., Djuricic, I. D., Antic Stankovic, J. A., Basic, Z. N., Vujovic, D. S., & Sobajic, S. S. (2020). Grape Seed Oil Characterization: A Novel Approach for Oil Quality Assessment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(6), 1–10. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900447>
- Demirdöven, A., Özdoğan, K. and Erdoğan-Tokatlı, K. (2015), Extraction of Red Cabbage Anthocyanins by UE and CE Methods. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 491-500. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12153>
- Dermoteca DC. “*DC-Dermoteca Cosmetics Nutri-Reparador*” https://www.dermoteca.com/pt/dc-outros/dc-dermoteca-cosmetics/nutri-reparador_p41.html?id=315&cat=347&pc=1. Acedido 15 de fevereiro 2021.
- Dimić, I., Teslić, N., Putnik, P., Bursać Kovačević, B., Mrkonjić, Ž., Čolović, D., Montesano, D., & Pavlić, B. (2020). Innovative and Conventional Valorizations of Grape Seeds from Winery By-Products as Sustainable Source of Lipophilic Antioxidants. *Antioxidants*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/antiox9070568>
- Doshi, P., Adsule, P., Banerjee, K., & Oulkar, D. (2015). Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. *Journal of food science and technology*, 52(1), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0991-1>
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- DVINE. “*Creme de dia poder dinâmico de uva*”. <https://www.dvineskin.com/pt/produto/creme-de-dia-poder-dinamico-de-uva>. Acedido 15 de fevereiro 2021.
- Durazzo, A, Lucarini, M, Souto, EB, et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 2019; 33: 2221– 2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Epstein, H. (2009). Skin care products. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Third Ed.,121–134.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), 161–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.039>

- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). *Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>
- Fitrasyah, S. I., Ariani, A., Rahman, N., Nurulfuadi, N., Aiman, U., Nadila, D., Pradana, F., Rakhman, A., & Hartini, D. A. (2021). Analysis of chemical properties and antioxidant activity of sambiloto leaf tea formula as a functional drink in preventing coronavirus diseases and degenerative diseases. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, *9*, 196–201. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.5872>
- Fiume Z. (2001). Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *International journal of toxicology*, *20 Suppl 1*, 21–45.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
- Garavaglia, J., Markoski, M. M., Oliveira, A., & Marcadenti, A. (2016). Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health. In *Nutrition and Metabolic Insights* (Vol. 9, pp. 59–64).
- Gengaihi, S. (2014). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes. *Journal of Food Processing & Technology*, *05*(02). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000296>
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(11), 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Ghafoor, K., Uslu, N., Musa Özcan, M., Al Juhaimi, F., Babiker, E. E., Mohamed Ahmed, I. A., & Azmi, I. U. (2020). Influence of grape variety on bioactive compounds, antioxidant activity, and phenolic compounds of some grape seeds grown in Turkey. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(12), 0–2. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14980>
- Gharras, H. (2009), Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*: 2512-2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Golmakani, M.-T., & Moayyedi, M. (2016). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and solventless microwave extraction of essential oil from dry and fresh Citruslimon (Eureka variety) peel. *Journal of Essential Oil Research*, *28*(4), 272–282. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1145606>
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 51, Issue 2, pp. 327–345). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.027>
- GrandViewResearch. “Skin care products market”. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/skin-care-products-market>. Acedido 8 de fevereiro 2021.
- Hsouna, B. A., Ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in health and disease*, *16*(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0487-5>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, *126*(4), 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

- International Organisation of Vine and Wine. (2020). 2020 Wine production - OIV First Estimates. [Online]. Available: <https://www.oiv.int/public/medias/7541/en-oiv-2020-world-wine-production-first-estimates.pdf>.
- Johnson, W., Heldreth, B., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V, Hill, R. A., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Andersen, F. A. (n.d.). *Safety Assessment of Formic Acid and Sodium Formate as Used in Cosmetics*. <https://doi.org/10.1177/1091581816677716>
- Kalli, E., Lappa, I., Bouchagier, P., Tarantilis, P. A. & Skotti, E.(2018) Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour. Bioprocess.* 46 (5). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>
- Kasiri, M. B., & Safapour, S. (2015). Exploring and exploiting plants extracts as the natural dyes/antimicrobials in textiles processing. *Progress in Color, Colorants and Coatings*, 8(2), 87-114.
- Kawarkhe, P. R., Deshmane, S. V., & Biyani, K. R. (2016). Formulation and evaluation of antioxidant face cream containing raspberry fruit and grape seeds extract. *Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences*, 7(2), 73. <https://doi.org/10.5958/2321-5844.2016.00012.1>
- Kusumawati, I., & Indrayanto, G. (2013). *Chapter 15-Natural Antioxidants in Cosmetics* (Atta-ur-Rahman; Vol. 40, pp. 485–505). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00015-1>
- Leal, C., Gouvinhas, I., Santos, R. A., Rosa, E., Silva, A. M., Saavedra, M. J., & Barros, A. I. R. N. A. (2020). Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. *Industrial Crops and Products*, 154, 112675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112675>
- Libera, J., Latoch, A., & Wójciak, K. M. (2020). Utilization of Grape Seed Extract as a Natural Antioxidant in the Technology of Meat Products Inoculated with a Probiotic Strain of LAB. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(1), 103. <https://doi.org/10.3390/foods9010103>
- Lodén, M. (2005). The clinical benefit of moisturizers. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19(6), 672–688. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2005.01326.x>
- Lopresto, C. G., Petrillo, F., Casazza, A. A., & Calabrò, V. (2014). A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. *Separation and Purification Technology*, 137, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.015>
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Baral, E. R., Koteswararao, R., Dhyan, A., Cho, M. H., & Cho, S. (2020). Bio-sorbents, industrially important chemicals and novel materials from citrus processing waste as a sustainable and renewable bioresource: A review. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 23, pp. 61–82). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.01.007>
- Navarro-Pérez, Y. M., Cedeño-Linares, E., Norman-Montenegro, Y., Hernández-Monzón, A. M., & González-Bedia, M. M. (2021). Prediction of the physical stability and quality of O/W cosmetic emulsions using full factorial design. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 9(1), 98–112.
- National Center for Biotechnology Information, “*PubChem Annotation Record for Caffeic Acid*”. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/7088>. Acedido 25 de junho 2021.
- National Center for Biotechnology Information, “*PubChem Annotation Record for Quercetin*”. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3529>. Acedido 25 de junho 2021.

- Nolan, K., & Marmur, E. (2012). Moisturizers: Reality and the skin benefits. *Dermatologic Therapy*, 25(3), 229–233. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01504.x>
- Pekić, B., Kovač, V., Alonso, E., & Revilla, E. (1998). Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry*, 61(1), 201–206.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111–2117.
- Prieto, J. M. (2012). *Procedure: Preparation of DPPH Radical and antioxidant scavenging assay*.
- Rodrigues, F., Nunes, M., & Oliveira, M. (2017). 11. Grape Processing By-Products as Active Ingredients for Cosmetic Proposes. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions*.
- Santos, L. Química e Tecnologia dos Produtos – Cosméticos e Produtos de Higiene Pessoal, Slides de apoio às aulas teóricas, FEUP, Porto, 2019/2020.
- Sarkic, A., & Stappen, I. (2018). *Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics — A Critical Review*. 1–21. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011>
- Sethi, A., Kaur, T., Malhotra, S. K., & Gambhir, M. L. (2016). Moisturizers: The Slippery Road. *Indian journal of dermatology*, 61(3), 279–287. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.182427>
- Sieniawska E. (2015). Activities of Tannins--From In Vitro Studies to Clinical Trials. *Natural product communications*, 10(11), 1877–1884.
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421–424.
- Sharma, G., Gadhiya, J., & Dhanawat, M. (2018). *Textbook of Cosmetic Formulations*. May, 51–52.
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V. K., Gnansounou, E., & Bharathiraja, B. (2020). Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 314, 123771.
- Sikdar, D. C., Menon, R., Duseja, K., Kumar, P., & Swami, P. (2016). Extraction of Citrus Oil From Lemon (Citrus Limon) Peels By Steam Distillation and Its Characterizations. *International Journal of Technical Research and Applications*, 5(2), 29–33. www.ijtra.com,
- Sikora, E., & Wydawnictwo, P. K. im. T. K. (2019). *Cosmetic Emulsions: Monograph*. Wydawnictwo PK.
- Surini, S., Mubarak, H., & Ramadon, D. (2018). Cosmetic serum containing grape (Vitis vinifera L.) seed extract phytosome: Formulation and in vitro penetration study. *Journal of Young Pharmacists*, 10(2), s51–s55. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.2s.10>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British journal of pharmacology*, 174(11), 1244–1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>
- Soto, M. L., Falqué, E., & Domínguez, H. (2015). Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*, 2(3), 259–276.

- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Surini, S., Mubarak, H., & Ramadon, D. (2018). Cosmetic serum containing grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract phytosome: Formulation and in vitro penetration study. *Journal of Young Pharmacists*, 10(2), 51–55.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638–15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Telang, P. S. (2013). Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, 4(2), 143–146. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.110593>
- Thomsen, B. R., Taylor, R., Madsen, R., Hyldig, G., Blenkiron, P., & Jacobsen, C. (2018). Investigation of Lipid Oxidation in the Raw Materials of a Topical Skin Formulation: A Topical Skin Formulation Containing a High Lipid Content. *J Am Oil Chem Soc*, 35(3), 185–196. <https://doi.org/10.1002/aocs.12015>
- Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martínez-Medina, G. A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez-Pérez, O. B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdes, J., & Aguilar, C. N. (2018). Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 52.
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M. (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 74, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>
- USDA. (2018). *Citrus Annual Expected Rebound in EU-28 Citrus Production may Reduce Imports for MY 2018/19*. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=CitrusAnnual_Madrid_EU-28_12-14-2018
- Višnjevec, A. M., Baker, P., Charlton, A., Preskett, D., Peeters, K., Tavzes, C., Kramberger, K., & Schwarzkopf, M. (2020). Developing an Olive Biorefinery in Slovenia: Analysis of Phenolic Compounds Found in Olive Mill Pomace and Wastewater. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules26010007>
- Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., Ascacio-Valdés, J. A., Cruz, K., Reyes-Luna, C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2017). Chapter 5 - Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* (pp. 229–252). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00005-3>
- Xu, Y., Kim, C., & Sismour, E. (2016). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Science Nutrition*, 4(1), 125 – 133.
- Zhou, H., Yue, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, J., & Duan, M. (2009). Preparation and Characterization of a Lecithin Nanoemulsion as a Topical Delivery System. 5(1), 224-230 <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9469-5>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (n.d.). Analytical Methods ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

Apêndice A - Procedimentos Experimentais

A.1 Análise Estatística

Os dados estatísticos foram avaliados através do cálculo da média aritmética consiste, que se baseia, no somatório dos valores obtidos a dividir pelo número de ensaios ($n = 3$), de acordo com a Equação A.1.1. Foi também calculado o desvio-padrão associado a estes valores médios, este é uma medida de dispersão em torno da média populacional de uma variável aleatória, e foi calculado pela Equação A.1.2.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n (Valor)_i}{n} \quad (A.1.1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Valor)_i - \bar{x}}{n - 1}} \quad (A.1.2)$$

A fim de validar os resultados finais, estes foram submetidos a uma análise estatística, através da realização de um teste t de *Student*, com um nível de confiança de 95%, recorrendo à função *TESTE.T(matriz1; matriz2; caudas; tipo)*, ferramenta do *Microsoft Excel*. É importante notar que, quando são comparados valores que não variaram entre si ou que não se encontram dentro dos limites de deteção, o teste t de *Student* não devolve qualquer valor de p e que a hipótese nula enunciada foi: “A diferença das médias é igual a 0”. Assim, para valores de p inferiores a 0,05 tem-se que as amostras analisadas são significativamente diferentes.

A.2 Extração dos Compostos Bioativos da Grainha de Uva

Cálculo da Percentagem de Resíduo Seco

A determinação da percentagem de resíduo seco foi realizada a partir da razão entre a massa de grainha seca, isto é, após a liofilização, e a massa antes do processo de liofilização (grainha fresca), como apresentado na Equação A.2.1.

$$\% \text{ Resíduo Seco} = \frac{m_{\text{grainha seca}}}{m_{\text{grainha fresca}}} \times 100 \quad (A.2.1)$$

Assim, visto que a massa de grainha fresca foi de 318,92 g e a massa de grainha seca foi de 176,08 g, a percentagem de resíduo seco foi igual a 55,21 %.

Rendimento da Extração do Extrato Fenólico e do Óleo de Grainha de Uva

Na Figura A.2.1. é apresentada a montagem do equipamento utilizado para a extração, utilizando o método Soxhlet.



Figura A 2.1. Montagem da extração sólido-líquido pelo método Soxhlet, para a obtenção do extrato fenólico e do óleo grainha de uva. A principal diferença foi o solvente usado.

O cálculo do rendimento da extração foi feito através da razão entre a massa de extrato obtida (m_{extrato}) e a massa de amostra de grainha liofilizada (m_{grainha}), como é apresentado na Equação A.2.2.

$$\% \text{ Rendimento de Extração} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{grainha}}} \times 100 \quad (\text{A.2.2})$$

Para além do método do Soxhlet, a extração do extrato fenólico, a partir da grainha de uva com etanol, foi realizada também pelo método de ESL convencional e pelo método de extração assistida por ultrassons. De notar que se realizou a ESL convencional, nas mesmas condições da extração pelo método Soxhlet; as EAU, foram também realizadas nas mesmas condições, alterando apenas os tempos de extração que foram menores (5, 10 e 15 minutos). Na Tabela A.2.1. são apresentadas as massas e os rendimentos obtidos para os dois tipos de extração, assim como os valores p obtidos a partir do teste estatístico t de *Student*. Uma vez que os rendimentos foram inferiores aos obtidos pelo método Soxhlet, optou-se por este último para realizar a extração do extrato fenólico da grainha de uva.

Tabela A.2.1. Rendimentos obtidos para a extração sólido-líquido convencional e extração assistida por ultrassons, para diferentes tempos.

Tipo de Extração (min)	Ensaio	Massa Grainha (g)	Massa Extrato (g)	Rendimento (%)
Sólido-líquido convencional	1	5,01	0,65	12,89
	2	5,02	0,56	11,19
	3	5,02	0,56	11,29
$\bar{x} \pm \sigma$		5,02 \pm 0,01	0,59 \pm 0,04	11,79 \pm 0,78
Valor-p				0,008
Extração Assistida por ultrassons (5 min)	1	5,03	0,98	13,54
	2	5,00	0,63	12,69
	3	5,02	0,60	12,03
$\bar{x} \pm \sigma$		5,02 \pm 0,01	0,64 \pm 0,03	12,75 \pm 0,62
Valor-p				0,006
Extração Assistida por ultrassons (10 min)	1	5,03	0,64	12,76
	2	5,00	0,63	12,63
	3	5,00	0,73	14,53
$\bar{x} \pm \sigma$		5,01 \pm 0,01	0,67 \pm 0,04	13,31 \pm 0,87
Valor-p				0,024
Extração Assistida por ultrassons (15 min)	1	5,06	0,67	13,26
	2	5,01	0,61	12,25
	3	5,01	0,73	14,50
$\bar{x} \pm \sigma$		5,02 \pm 0,02	0,63 \pm 0,05	13,33 \pm 0,92
Valor-p				0,037

O equipamento utilizado para estes dois métodos encontra-se apresentado na Figura A.2.2. O cálculo do rendimento foi realizado pela Equação A.2.2.

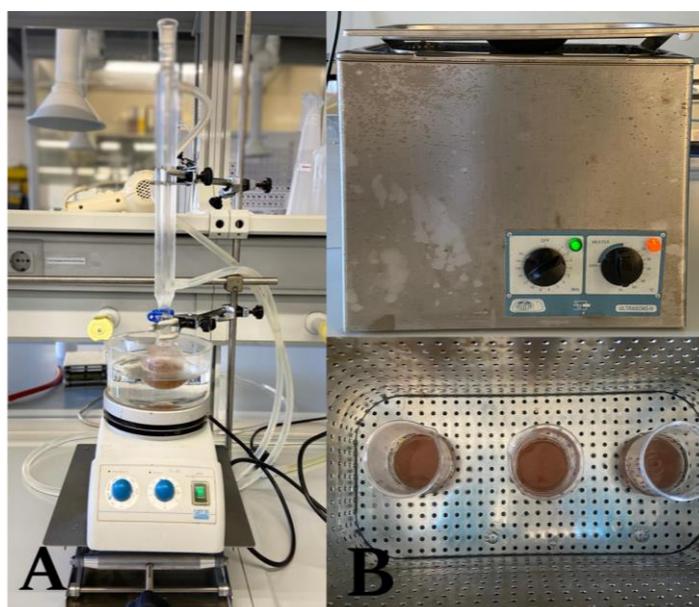


Figura A.2.2. Equipamento utilizado para a realização da extração do extrato fenólico. A - pelo método de extração sólido-líquido convencional; B - pelo método de extração assistida por ultrassons.

A.3 Extração do Óleo Essencial de Cascas de limão

O equipamento utilizado para a realização da hidrodestilação, encontra-se apresentado na Figura

A.3.1.

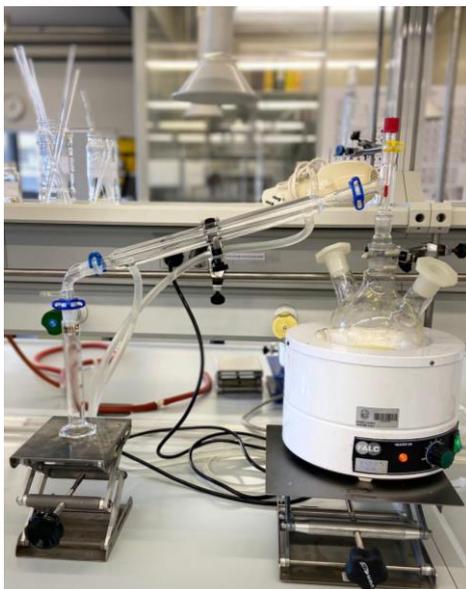


Figura A.3.1. Equipamento utilizado para a extração do óleo essencial das cascas de limão, pelo método de hidrodestilação.

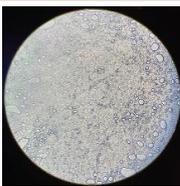
O cálculo do rendimento da extração pode ser feito através da razão entre a massa de óleo essencial obtida ($m_{\text{óleo}}$) e a massa de amostra de casca de limão (m_{casca}), como é apresentado na Equação A.3.1.

$$\% \text{ Rendimento de Extração} = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{casca}}} \times 100 \quad (\text{A.3.1})$$

A.4 Produção do Creme de Rosto

De modo a obter a formulação ideal para o creme de rosto, foi necessário efetuar alguns ensaios nos quais foram estudadas diferentes composições. Na Tabela A.4.1, são apresentadas as formulações preliminares (FP) estudadas, assim como as alterações realizadas entre elas.

Tabela A.4.1. Diferentes formulações preliminares (FP) estudadas, alterações efetuadas entre os ensaios, resultado final e análise em microscópio do creme obtido.

Ingrediente	Ensaio					
	FP 1 (%)	FP 2 (%)	FP 3 (%)	FP 4 (%)	FP 5 (%)	FP 6 (%)
Água	60,0	58,0	73,3	73,6	73,6	73,6
Glicerina	20,0	21,5	7,1	7,6	7,6	7,6
Óleo de Coco	15,0	12,2	13,7	7,6	7,6	7,6
Óleo de Amêndoas Doces	-	-	-	6,8	6,8	6,8
Lecitina	-	-	-	3,8	3,0	3,0
Betaína	5,0	7,3	5,1	-	0,8	0,8
Goma Xantana	-	1,1	0,8	0,6	0,6	0,6
pH*	6	6	6	6	6	6
Alterações	-	Adição de Espessante	Alteração das Percentagens	Alteração dos Ingredientes e percentagens	Adição de Betaína	Alteração da Agitação
Resultado Final						
Análise Microscópio	-	-	-	-		

*Medido com fitas medidoras de pH.

A produção dos cremes foi realizada utilizando um banho termostático, para aquecer as duas fases e com um homogeneizador de alta performance, a Figura A.4.1, mostra o esquema de montagem utilizado.



Figura A.4.1. Equipamento utilizado para a produção dos cremes de rosto. A - Banho termostático; B – Homogeneização das duas fases do creme, com auxílio do homogeneizador de alta performance.

Apêndice B - Capacidade Antioxidante

Para a realização dos ensaios de capacidade antioxidante foi necessário realizar retas de calibração. Para que uma reta de calibração seja considerada válida, é necessário: apresentar no mínimo 5 pontos; gama de concentrações superior a um fator de 10; R^2 superior a 0,995; que $\frac{sa}{a} \times 100$ seja igual ou inferior a 5%; e por último que $b-sb < 0 < b-sb$. De notar que a e b representam o declive e a ordenada na origem da reta, respetivamente, e sa e sb, representam os erros acumulados associados ao declive e à ordenada na origem, respetivamente. Apesar de ser necessário cumprir estes cinco aspetos para que a reta seja validada, nas retas apresentadas nem todos estes parâmetros não foram verificados.

B.1 Método DPPH

Para a realização do método DPPH, foi necessário construir-se a microplaca para a medição posterior dos valores da absorvância a $\lambda = 515$ nm. Na Figura B.1.1. encontra-se apresentada um esquema da montagem da microplaca.



Figura B.1.1. Esquema da microplaca utilizada para a realização do método DPPH e respetiva legenda.

A partir dos valores obtidos calculou-se a percentagem de inibição de DPPH, pela Equação B.1.1.

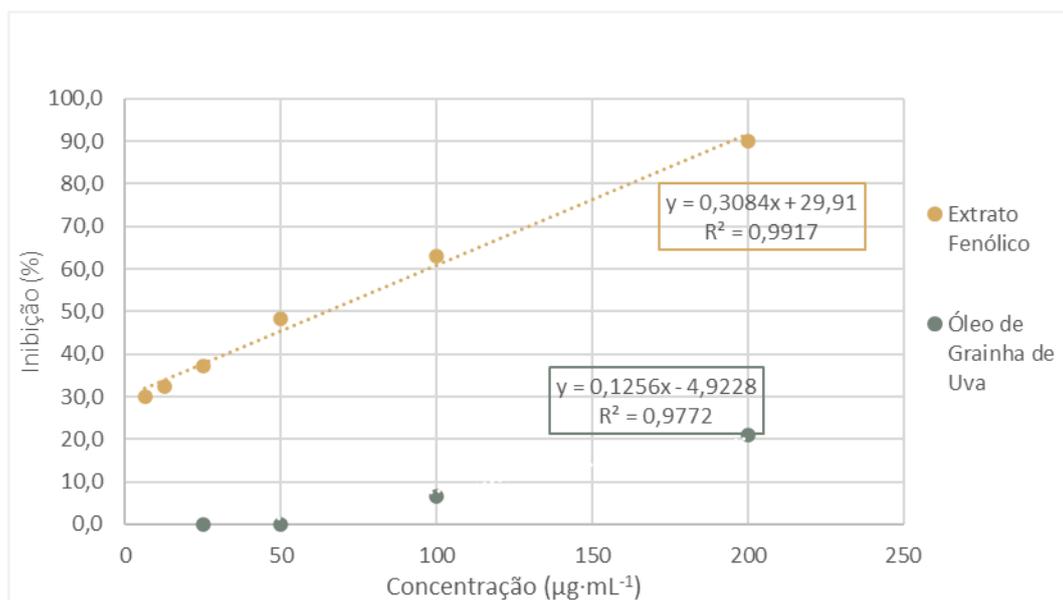
$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (\text{B.1.1})$$

Em que, A_{controlo} é referente à absorvância do controlo, isto é, do poço apenas com DPPH e sem amostra, e A_{amostra} refere-se à absorvância da amostra (diferença entre a absorvância da amostra com DPPH e a amostra com metanol).

Na Tabela B.1.1, são apresentados os valores de percentagem de inibição do ensaio da quantificação da capacidade antioxidante do extrato fenólico e do óleo da grainha de uva. A partir destes valores, construiu-se uma reta de calibração para cada amostra, em função da concentração. Na Figura B.1.2 encontram-se as retas de calibração obtidas.

Tabela B.1.1. Percentagem de inibição de DPPH para o extrato fenólico e para o óleo de grainha, para as diferentes concentrações em cada poço.

Concentração de Amostra ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	% Inibição Extrato Fenólico	% Inibição Óleo de Grainha
200,0	89,9	20,9
100,0	63,1	6,6
50,0	48,2	0,0
25,0	37,3	0,0
12,5	32,3	0,0
6,2	30,1	0,0



Reta de Calibração Extrato Fenólico: $y = 0,3084x + 29,9100$; $R^2 = 0,9917$

Reta de Calibração Óleo de Grainha: $y = 0,1256x - 4,9228$; $R^2 = 0,9772$

Figura B.1.2. Representação das retas de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para o extrato fenólico e para o óleo de grainha.

Para o cálculo do IC_{50} , utilizou-se a equação da reta obtida para cada um dos ensaios e utilizou-se a Equação B.1.2.

$$IC_{50} = \frac{(50 - b)}{a} \tag{B.1.2}$$

Em que a representa o declive da reta e b representa a ordenada na origem. Em seguida, é apresentado um exemplo da aplicação da equação anterior, utilizando a reta do extrato fenólico.

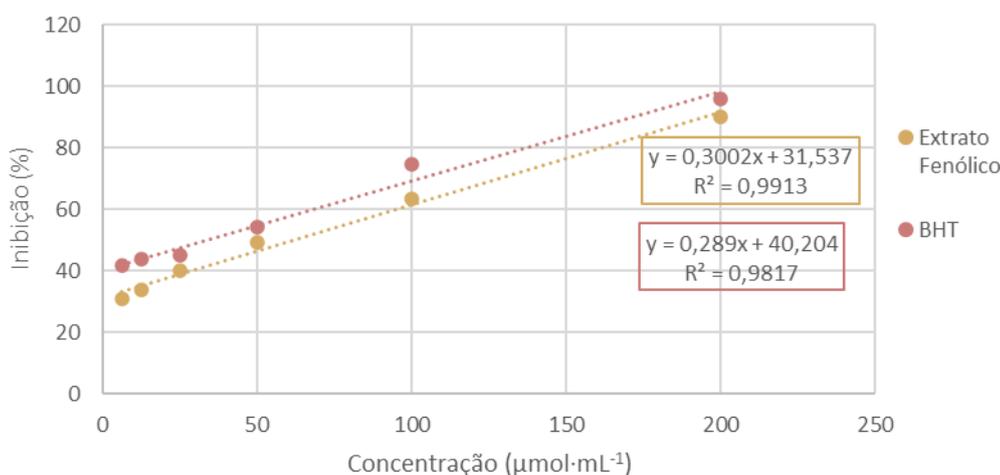
$$IC_{50} = \frac{(50,0000 - 29,1000)}{0,3084} \Leftrightarrow IC_{50} = 65,1427 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Para o ensaio da capacidade antioxidante do extrato fenólico e o BHT, o esquema da microplaca foi semelhante ao apresentado na Figura B.1.1., no entanto, não se utilizaram os poços das colunas 10 e 11, uma vez que não se utilizou o Trolox. Na Tabela B.1.2 encontram-se os valores de percentagem de inibição de DPPH para este ensaio.

Tabela B.1.2. Percentagem de inibição de DPPH para o extrato fenólico e para o BHT, para as diferentes concentrações em cada poço.

Concentração de Amostra ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	% Inibição de DPPH pelo Extrato Fenólico	% Inibição de DPPH pelo BHT
200,00	90,0	95,7
100,00	63,6	74,6
50,00	49,1	54,1
25,00	40,0	44,9
12,50	34,0	43,8
6,25	30,8	41,9

Através destes valores, construiu-se uma reta de calibração para cada amostra, em função da concentração. Na Figura B.1.3 encontram-se as retas de calibração obtidas. O cálculo do IC_{50} foi realizado através da Equação B.1.2.



Reta de Calibração Extrato Fenólico: $y = 0,3002x + 31,5372$; $R^2 = 0,9913$

Reta de Calibração BHT: $y = 0,2890x + 40,2044$; $R^2 = 0,9459$

Figura B.1.3. Representação das retas de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para o extrato fenólico e para o óleo de grainha.

B.2 Método TAC

Na Figura B.2.1 encontra-se uma representação esquemática da microplaca realizada para a realização do ensaio.

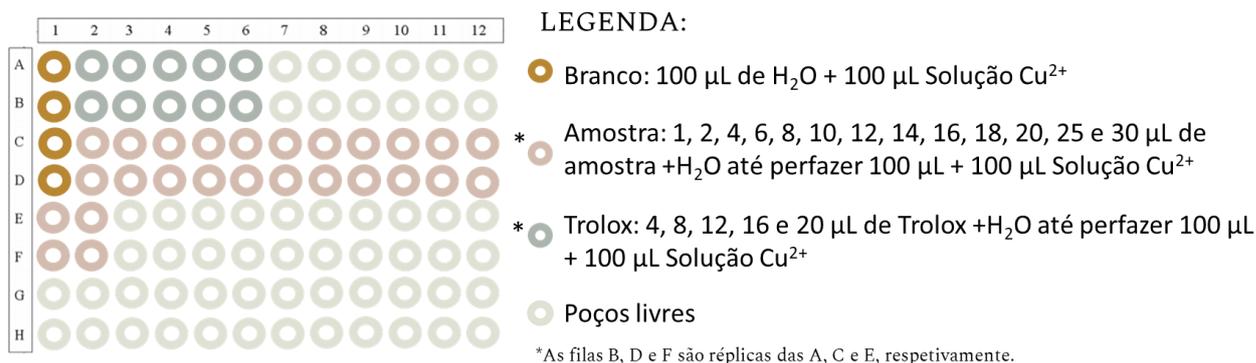


Figura B.2.1. Esquema da microplaca utilizada para a realização do método TAC e respectiva legenda.

A partir dos valores obtidos de absorvância ($\lambda = 570$ nm) dos padrões de Trolox (Tabela B.2.1), foi construída a seguinte reta de calibração (Figura B.2.2).

Tabela B.2.1. Média da absorvância dos padrões obtidos para o primeiro e segundo ensaio.

Trolox (μmol)	Absorvância
4×10^{-3}	0,1222
8×10^{-3}	0,2178
12×10^{-3}	0,3188
16×10^{-3}	0,4503
20×10^{-3}	0,5493

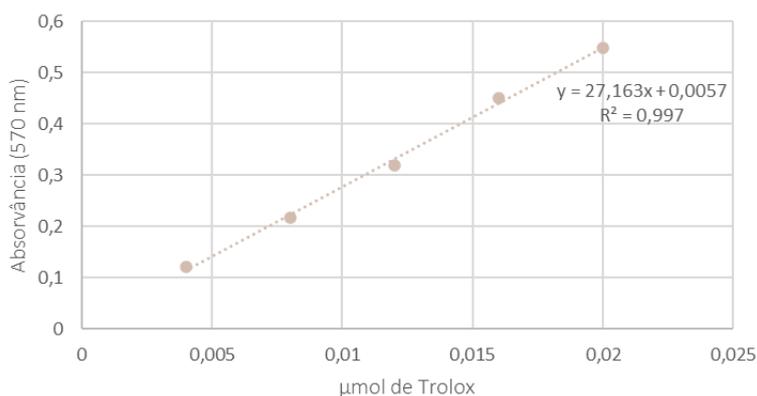


Figura B.2.2. Representação da reta de calibração de Trolox, para o método TAC.

Utilizando a reta de calibração elaborada, obteve-se os seguintes valores de atividade antioxidante para o extrato fenólico, representados na Tabela B.2.2.

Tabela B.3.2. Valores de atividade antioxidante obtidos pelo método TAC, em $\mu\text{mol TE}\cdot\text{mL}^{-1}$, para as diluições que permitiram obter valores dentro da curva de calibração.

Diluição	65496	32748	16374	10916	8181	6550
Capacidade Antioxidante ($\mu\text{mol TE}\cdot\text{mL}^{-1}$)	14,16	10,42	26,80	37,64	42,92	57,52

Apêndice C - Desenvolvimento e Avaliação da Formulação

C.1 Desenvolvimento do Produto

O desenvolvimento de um novo produto envolve diferentes etapas: uma fase de *design* e conceptualização do produto, uma fase de *design* detalhado e criação de protótipos e, por último, a produção e lançamento do produto. Relativamente à primeira etapa, esta é de extrema importância, pois é onde se estabelece a importância do produto para o consumidor e, como é que este irá distinguir-se dos competidores. No respeito os produtos de hidratação da pele algumas das questões a ser respondidas são: “Deve ser um produto corporal ou facial?”, “O produto deve ser uma loção ou um creme?”, “Deve ser uma emulsão O/A ou A/O?”, “Que funções podem ser acrescentadas para que o produto seja mais atrativo?” (Cheng *et al.*, 2009). Assim, no presente projeto, definiu-se que o produto em questão deveria ser um creme de rosto do tipo O/A – uma vez que é o género de formulação preferida pelos consumidores - ao qual seriam adicionados compostos fenólicos, extraídos da grainha de uva, com propriedades AO, com a finalidade de acrescentar valor. Por outro lado, também a incorporação do óleo extraído a partir da grainha de uva, assim como do óleo essencial extraído a partir das cascas de limão, também permite alcançar este objetivo, conferindo hidratação, aroma e propriedades antimicrobianas. Deste modo, para desenvolver o produto anteriormente referido, foi necessário selecionar os ingredientes para a sua composição. O produto é constituído por duas fases: fase aquosa – constituída pelo solvente e humectantes - e fase oleosa – à qual pertencem os emolientes e agentes emulsificantes. Existem ainda alguns ingredientes com outras funções, como é o caso dos AO, controladores de pH, fragrâncias e corantes, que podem (ou não) ser adicionados à formulação. Na Tabela C.1.1 são apresentados os ingredientes selecionados para a formulação base do creme de rosto, assim como a justificação da sua utilização.

Tabela C.1.1. Ingredientes utilizados na formulação base do creme de rosto, respetiva função e justificação da escolha.

Ingredientes	Função	Justificação
Água Purificada	Veículo	Solvente muito utilizado em cosmética, pois é capaz de dissolver ingredientes importantes para a hidratação da pele. Adicionalmente, é responsável pela consistência do creme e melhora o nível de hidratação da pele.
Glicerina	Humectante	Humectante mais utilizado e mais eficaz em cremes, apresentando características de hidratação únicas, pois é capaz de hidratar a pele. A glicerina pode ser de origem vegetal, o que o torna mais apelativo para o consumidor.
Óleo de Coco	Emoliente	É um emoliente bastante utilizado na indústria cosmética, como substituto do óleo mineral. As suas propriedades emolientes derivam da sua composição rica em triglicéridos e ácidos gordos saturados de cadeia média (ácido laurílico, ácido capríco e ácido caprílico). Adicionalmente, este óleo apresenta características antissépticas, devido ao ácido laurílico, o que torna este ingrediente ainda mais interessante para a indústria cosmética.

Conclusão Tabela C.1.1. Ingredientes utilizados na formulação base do creme de rosto, respetiva função e justificação da escolha.

Ingredientes	Função	Justificação
Óleo de Amêndoas Doces	Emoliente	Apresenta excelentes características enquanto emoliente, permitindo suavizar e uniformizar a pele conferindo-lhe um aspeto mais saudável, devido ao elevado conteúdo de ácido oleico. Adicionalmente, é uma fonte rica em ingredientes bioativos – como vitaminas (A, B, D e E) e antioxidantes – que melhoram a aparência da pele e protegem-na da radiação UV.
Lecitina	Emulsificante e Emoliente	A lecitina é composta por uma mistura de ácidos gordos, como o ácido esteárico, palmítico e oleico, ligados ao éster do ácido fosfórico. Pode ser de origem vegetal, obtida a partir da soja. Funciona como agente emulsificante, apresentando também boas capacidades emolientes, devido ao seu elevado teor em ácidos gordos, que criam uma barreira à superfície da pele que mantém a hidratação da pele.
Betaína	Emulsificante secundário	A betaína é um surfactante catiónico muito compatível com outros surfactantes. É comumente utilizada como surfactante secundário, pois é um composto estável, que ajuda a conferir viscosidade e não irritante, tanto para a pele como para os olhos.
Goma Xantana	Espessante	Atua como agente espessante, pois ajuda a espessar a formulação, uma vez que ajuda na ligação dos restantes ingredientes. Por outro lado, permite alcançar a textura desejada em quantidades pequenas (0,0001 – 2 %).

Fonte: Fiume, 2001; Cheng *et al.*, 2009; Nolan e Marmur, 2012; Benson *et al.*, 2019; Sikora, 2019.

C.2 Avaliação da Estabilidade dos Cremes

Após a produção dos cremes de rosto, foi necessário avaliar a estabilidade dos mesmos. Assim, na Figura C.2.1, encontram-se alguns dos equipamentos utilizados para a realização destes ensaios.

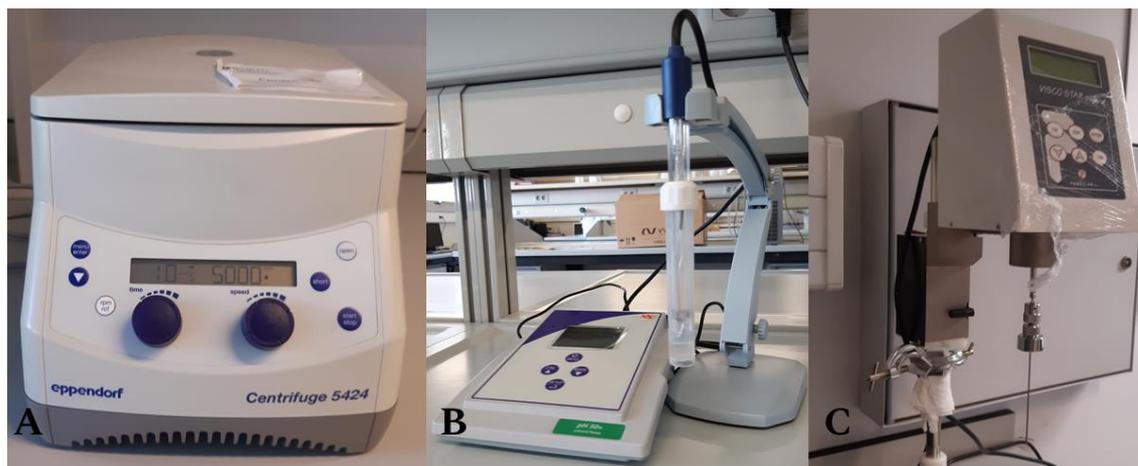


Figura C.2.1. Equipamentos utilizados para a realização dos ensaios de estabilidade. A – Centrifuga; B – Medidor de pH; C – Viscosímetro.

Os cremes foram avaliados relativamente ao seu pH, viscosidade e capacidade de espalhamento, durante 21 dias. Na Tabela C.2.1 são apresentados os valores obtidos para os parâmetros avaliados durante o período de análise.

Tabela C.2.1. Valores de pH, espalhamento (cm) e viscosidade (Pa·s), ao longo de 21 dias, para os diferentes cremes produzidos.

Formulação	pH	Espalhamento (cm)	Viscosidade (mPa·s)
1 ° Dia			
F1	5,75	3,0	8845
F2	5,79	2,9	10836
F3	5,70	3,2	9258
F4	5,85	3,1	8330
F5	5,78	2,9	8130
F6	5,78	3,0	8576
F7	5,80	2,9	8220
3 ° Dia			
F1	5,70	3,1	8965
F2	5,70	2,8	10433
F3	5,68	3,0	9161
F4	5,71	3,0	8490
F5	5,74	2,7	8788
F6	5,71	3,1	8339
F7	5,78	3,1	7990
7 ° Dia			
F1	5,68	3,2	8646
F2	5,62	2,9	10340
F3	5,60	2,9	9495
F4	5,61	3,1	8240
F5	5,64	2,8	9130
F6	5,69	2,9	8886
F7	5,70	3,0	8039
14 ° Dia			
F1	5,60	3,1	9238
F2	5,57	2,7	10781
F3	5,54	3,0	9376
F4	5,57	2,9	8686
F5	5,60	2,9	8449
F6	5,65	3,0	8445
F7	5,67	3,1	7837
21 ° Dia			
F1	5,54	3,1	8841
F2	5,54	3,0	10347
F3	5,49	3,1	9364
F4	5,50	3,0	8248
F5	5,58	3,0	8242
F6	5,60	2,9	8786
F7	5,65	3,0	8821

C.3 Oxidação Lipídica

A determinação da oxidação lipídica foi realizada pelo índice de peróxidos (IP). O valor do índice de peróxidos foi determinado através da Equação C.3.1.

$$\text{Índice de Peróxidos} = \frac{(abs_{amostra} - abs_{branco}) \times 41,52}{55,84 \times 0,1 \times 2} \quad (C.3.1)$$

Em que $abs_{amostra}$ e abs_{branco} são referem-se aos valores da absorvância da amostra e do branco, respetivamente. O valor de abs_{branco} foi de 0,398.

Apêndice D - Capacidade Antimicrobiana

Na Figura D.1. são apresentados os antibiogramas realizados para os microrganismos Gram-positivo (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativo (*Escherichia coli*).

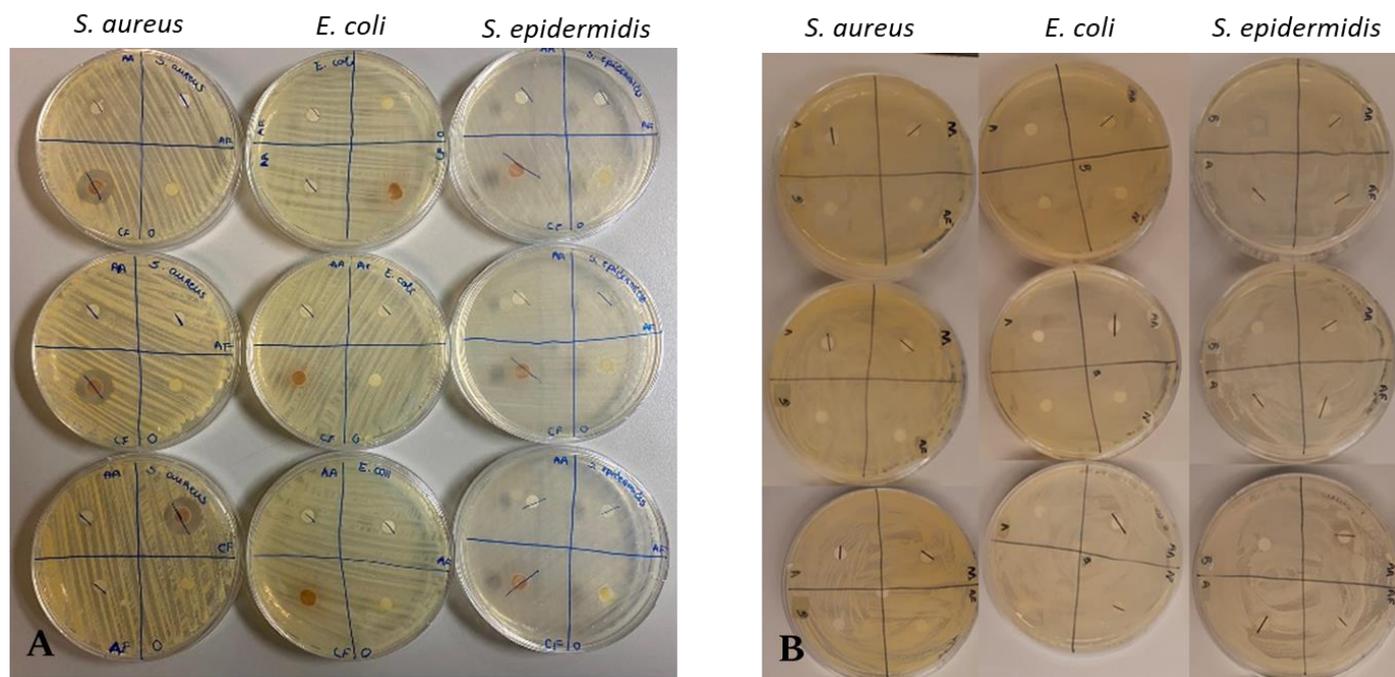


Figura D.1. A – Efeito do extrato fenólico e do óleo de semente de uva na inibição do crescimento dos três microrganismos em estudo; B – Efeito do óleo essencial de limão na inibição do crescimento dos três microrganismos em estudo.

Na Tabela D.1. encontram-se os valores dos halos de inibição para cada uma das placas. De notar que, no caso dos halos dos controlos (positivo – ácido ascórbico e ácido fórmico – e negativo – água ultrapura), foram selecionados os três (em seis), mais próximos entre si.

Tabela D.1. Valores dos halos de inibição, em mm, do extrato fenólico, óleo de grainha, óleo essencial de limão, ácido ascórbico, ácido fórmico e água ultrapura, para os três microrganismos estudados.

			Halos de Inibição (mm)						
			Extrato Fenólico	Óleo de Grainha	Óleo Essencial de Limão	Ácido Ascórbico	Ácido Fórmico	Água Ultrapura	
Microrganismos	Gram-positivo	<i>S. aureus</i>	1	17,0	< 5,0	6,0	8,0	< 5,0	< 5,0
			2	16,0	< 5,0	< 5,0	9,0	< 5,0	< 5,0
			3	17,0	< 5,0	5,5	9,0	< 5,0	< 5,0
			Média	16,7	< 5,0	5,5	8,7	< 5,0	< 5,0
	Gram-positivo	<i>S. epidermidis</i>	1	20,0	< 5,0	8,4	7,0	7,0	< 5,0
			2	19,0	< 5,0	6,5	7,0	6,5	< 5,0
			3	19,0	< 5,0	7,6	7,0	6,0	< 5,0
			Média	19,3	< 5,0	7,5	7,0	6,5	< 5,0
	Gram-negativo	<i>E. coli</i>	1	< 5,0	< 5,0	< 5,0	6,0	< 5,0	< 5,0
			2	< 5,0	< 5,0	< 5,0	6,0	< 5,0	< 5,0
			3	< 5,0	< 5,0	< 5,0	8,0	< 5,0	< 5,0
			Média	< 5,0	< 5,0	< 5,0	6,7	< 5,0	< 5,0

Nota: A notação < 5,0 é referente aos ensaios onde não foi possível medir o halo de inibição.

Apêndice E - Questionário

De modo a que seja possível compreender melhor as respostas do questionário, os gráficos e a informação recolhido são apresentados em seguida.

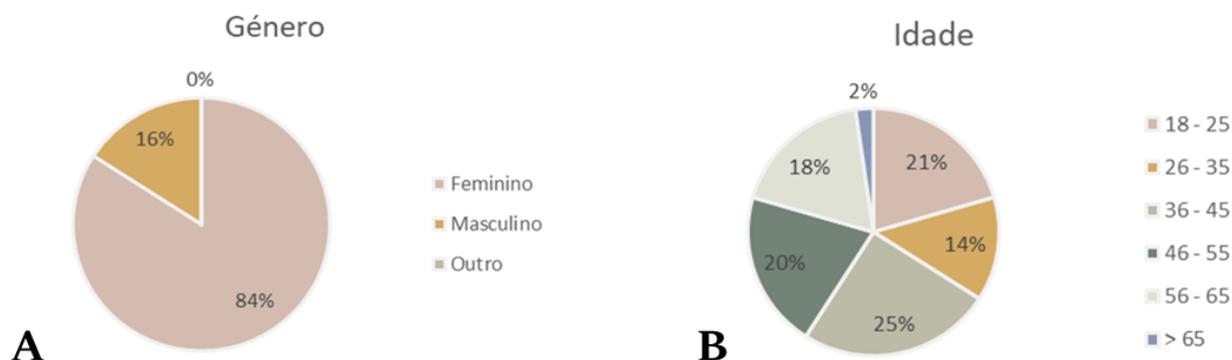


Figura E.1. Distribuição da amostra. A – Relativamente ao género; B – Relativamente à idade.

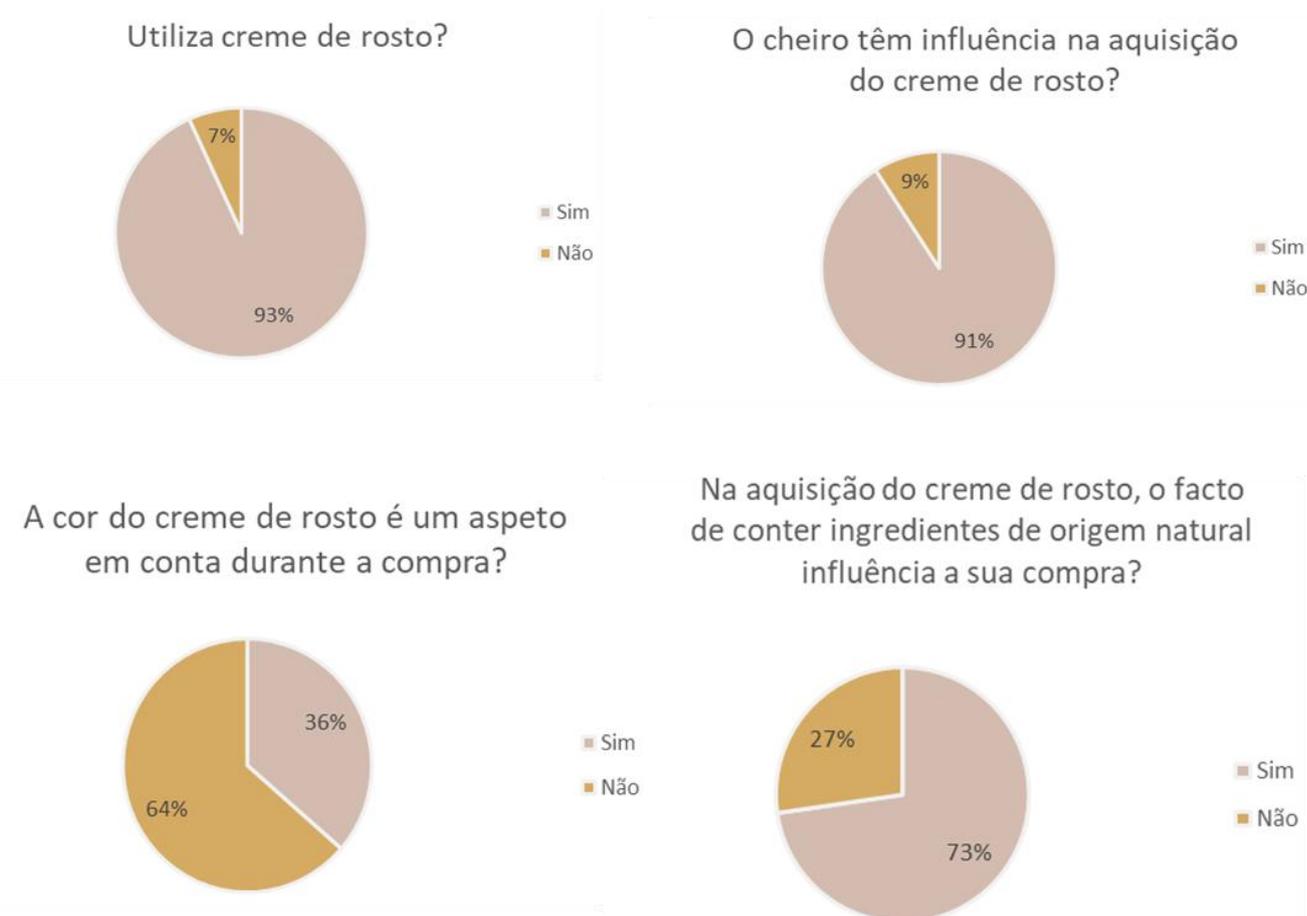


Figura E.2. Respostas relativas às perguntas 3 a 6, relativas à utilização de creme de rosto e à interferência de certos aspetos na aquisição do mesmo, como cor, cheiro e a ser constituído por ingredientes de origem natural.

Está disposto a experimentar o produto desenvolvido e responder a questões sobre o mesmo?

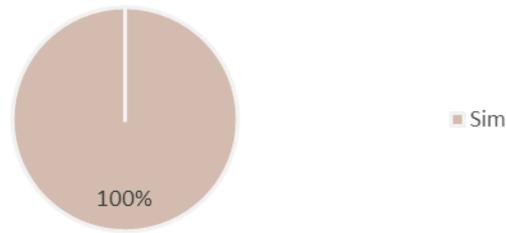


Figura E.3. Pergunta número 7, sobre a disponibilidade dos inquiridos em experimentar o creme de rosto desenvolvido e responder a um inquérito sobre o mesmo e, respetivas respostas.

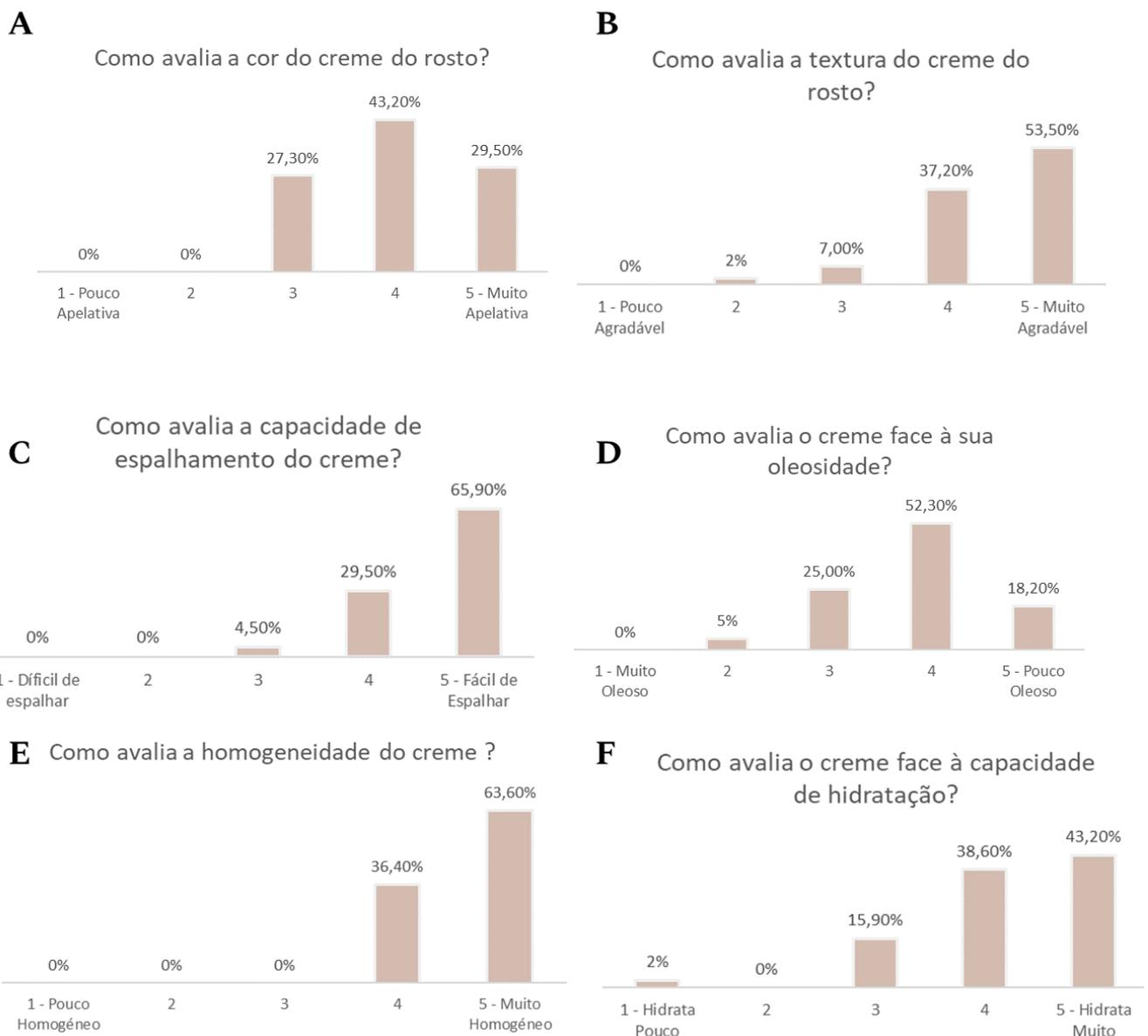


Figura E.4. Respostas relativas às características do creme de rosto produzido. A – Cor; B – Textura; C – Capacidade de espalhamento; D – Oleosidade; E – Homogeneidade; F – Capacidade de Hidratação.

24 horas após a utilização do creme, verificou algum tipo de reação alérgica (vermelhidões, irritação, comichão da pele)?

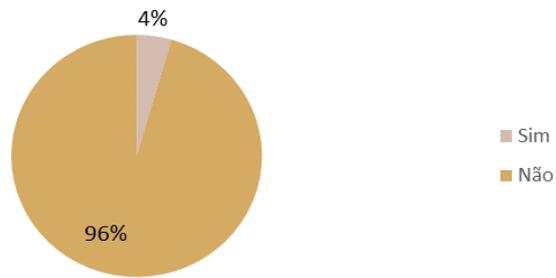


Figura E.5. Resposta à questão número 14, relativa à exigência de reações secundárias.

Após experimentar o produto em estudo, estaria disposto a comprá-lo?

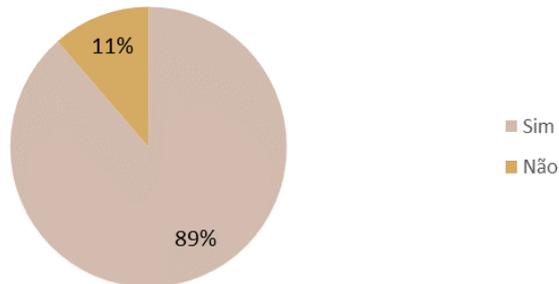


Figura E.6. Respostas à questão número 15, sobre a possibilidade de aquisição do creme de rosto produzido.

