UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

CATARINA SILVA GUIMARÃES

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora cincinnata* PARA O DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES COM POTENCIAL HIDRATANTE E PRÓ-IDADE

Vitória da Conquista, BA

2024

CATARINA SILVA GUIMARÃES

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora cincinnata* PARA O DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES COM POTENCIAL HIDRATANTE E PRÓ-IDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral
Co-orientador: Prof. Dr. Gabriel Azevedo De Brito Damasceno
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Vitória da Conquista- BA

2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

G963

Guimarães, Catarina Silva.

Extração, caracterização fitoquímica e padronização do extrato das folhas de *Passiflora cincinnata* para o desenvolvimento de nanoemulsões com potencial hidratante e pró-idade / Catarina Silva Guimarães. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.

91 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral.

Co-orientador: Prof. Dr. Gabriel Azevedo de Brito Damasceno.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Atividade antioxidante. 2.Cosméticos. 3. Maracujá do mato. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Amaral, Juliano Geraldo. III. Damasceno, Gabriel Azevedo de Brito. IV. Título.

CDU: 687.55(043.2)

Elaborado por Cinthia Gabrielli Gil CRB5-001631/0

CATARINA SILVA GUIMARÃES

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora cincinnata* PARA O DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES COM POTENCIAL HIDRATANTE E PRÓ-IDADE

Essa dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.
Vitória da Conquista – BA, 22/10/2024.

Documento assinado digitalmente
JULIANO GERALDO AMARAL
Data: 21/01/2025 10:25:02-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral (Orientador)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
GABRIEL AZEVEDO DE BRITO DAMASCENO
Data: 24/10/2024 17:13:19-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Gabriel Azevedo de Brito Damasceno (Co-orientador)
Universidade Federal da Bahia

ANDRE LUIS MORAIS RUELA:07001502693
Assinado de forma digital por ANDRE LUIS MORAIS RUELA:07001502693
Dados: 2024.10.24 14:12:27 -03'00'

Prof. Dr. André Luis Morais Ruela
Universidade Federal de Ouro Preto

Documento assinado digitalmente
BRUNO OLIVEIRA MOREIRA
Data: 24/10/2024 22:01:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus familiares, em especial minha mãe Maria das Graças, meu pai Sergio e meu irmão Rafael pelo apoio e incentivo incondicional. Sem o carinho de vocês, esta jornada teria sido muito mais desafiadora.

A Isadora, por todo amor e suporte, por sempre acreditar em mim, me incentivar e não me deixar desistir. Sua chegada tornou esse fim de ciclo mais fácil e leve.

Especialmente agradeço ao meu orientador, Juliano, e ao meu coorientador, Gabriel, sem vocês eu jamais teria chegado ao fim dessa árdua jornada. Serei eternamente grata pela orientação, atenção, disponibilidade, paciência e principalmente por acreditarem no meu potencial. Suas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, agradeço pelos momentos de descontração e palavras de encorajamento tão necessários para que eu pudesse seguir em frente.

As amigas que o mestrado me proporcionou, em especial Laryana, Carol e Poli, pela troca de ideias, colaboração e companhia nos dias mais exaustivos de experimento no laboratório.

A Paulinne, companheira de jornada, que compartilhou comigo viagens, congressos e experimentos. Nossas trocas, desabafos e parceria tornaram a caminhada muito mais leve.

Aos alunos da iniciação científica, Malu por ter disponibilizado o local de coleta da *Passiflora*, Bia, Clara, Bruna, Vini e Caio por todo auxílio nos experimentos. A dedicação de vocês foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Ao Libitec, onde passei boa parte dessa jornada, sou grata por todas as experiências trocadas.

Aos técnicos dos laboratórios da UFBA-IMS, em especial Lucimara, Robson e Flavio que me prestaram assistência em diversos momentos essenciais desta jornada.

Por fim agradeço ao professor Norberto, a Jac e a todos do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) de Ribeirão Preto - SP, não só pelo treinamento, mas também pelo acolhimento e laços de amizade construídos.

Sou grata a todos que de algum modo contribuíram para a realização desta dissertação.

GUIMARÃES, Catarina Silva. Extração, caracterização fitoquímica e padronização do extrato das folhas de *Passiflora cincinnata* para o desenvolvimento de sistemas nanotecnológicos com potencial hidratante e pró-idade. Dissertação (Mestrado em Biociências) Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

RESUMO

A *Passiflora cincinnata* (*P. cincinnata*) é uma espécie nativa, conhecida como "maracujá do mato" e "maracujá da Caatinga". Sua composição química apresenta compostos fenólicos, dentre eles flavonoides, os quais despertam o interesse da cosmetologia como potenciais agentes antioxidantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da variação climática, quanto a composição química e atividade antioxidante *in vitro* e desenvolver uma nanoemulsão cosmética. A partir das folhas de *P. cincinnata* coletadas no período de um ano, 12 extratos aquosos foram obtidos e analisados por CLAE/EM, com os dados adquiridos foi gerada uma rede molecular através da plataforma *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS). A atividade antioxidante dos 12 extratos foi avaliada com base em diversos testes que atuam em diferentes estágios da cascata oxidativa. Para obtenção da formulação foi realizado um planejamento com composto central variando a concentração dos tensoativos e das fases oleosas. As formulações foram obtidas pelo método de emulsificação espontânea com agitação magnética e analisadas quanto ao seu aspecto macroscópico 24h após seu preparo. Em seguida, foram submetidas a estudos de estabilidade. A composição química da *P. cincinnata* apresentou flavonoides *C*-glicosilados e *O*-glicosilados. A sazonalidade não influenciou na variação dos metabólitos e os extratos apresentaram atividade antioxidante em quase todos os testes realizados, não apresentando diferença estatística entre o período seco e o período chuvoso. As formulações estáveis foram aditivadas com 0,1% do extrato obtido e submetidas novamente ao estudo de estabilidade preliminar e estabilidade acelerada. As nanoemulsões apresentaram tamanho de gotícula entre 95 e 170 nm, o potencial zeta entre |19| e |38| e PDI entre 0,11 e 0,47, obtendo uma formulação estável após os estudos de estabilidade, indicando sua aplicabilidade como potencial novo cosmético pró-idade.

Palavras-chave: *Passion fruit*; atividade antioxidante; sazonalidade; flavonoides; cosméticos.

ABSTRACT

Passiflora cincinnata (*P. cincinnata*) is a native species known as "wild passion fruit" and "Caatinga passion fruit." Its chemical composition includes phenolic compounds, such as flavonoids, which attract interest from cosmetology as potential antioxidant agents. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of climatic variation on chemical composition and in vitro antioxidant activity, as well as to develop a cosmetic nanoemulsion. From the leaves of *P. cincinnata* collected over a year, 12 aqueous extracts were obtained and analyzed by HPLC/MS. A molecular network was generated using the Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) platform. The antioxidant activity of the 12 extracts was assessed through various tests targeting different stages of the oxidative cascade. For formulation, a 2^2 factorial design was conducted with a central compound varying the concentration of surfactants and oily phases. Formulations were obtained via spontaneous emulsification with magnetic stirring and analyzed for macroscopic aspects 24 hours post-preparation, followed by stability studies. The chemical composition of *P. cincinnata* revealed C-glycosylated and O-glycosylated flavonoids. Seasonality did not influence metabolite variation, and the extracts exhibited antioxidant activity in nearly all tests, showing no statistical difference between dry and rainy periods. Stable formulations were augmented with 0.1% of the obtained extract and reassessed for preliminary and accelerated stability studies. The nanoemulsions showed droplet sizes between 95 and 170 nm, zeta potential between |19| and |38|, and PDI between 0.11 and 0.47, achieving a stable formulation after stability studies, indicating its potential applicability as a new anti-aging cosmetic.

Keywords: *Passion fruit*; antioxidant activity; seasonality; flavonoids; cosmetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8
2 REVISÃO DE LITERATURA 10
2.1 O mercado de cosméticos 10
2.2 Nanoemulsões 12
2.3 Pele 14
2.4 Papel dos antioxidantes no envelhecimento 16
2.5 Família Passifloraceae e o Gênero *Passiflora* L. 18
2.6 A espécie *Passiflora cincinnata* Mast. 19
2.7 Composição química da espécie 20
2.8 Variação Sazonal de espécies vegetais 21
2.9 Espectrometria de massas 22
2.10 *Global Natural Products Social Networking* 23
2. OBJETIVOS 25
3.1 OBJETIVO GERAL 25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
4. METODOLOGIA 26
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL 26
4.2 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO 26
4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS 27
4.4 ANOTAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Passiflora cincinnata* POR *FEATURE BASED MOLECULAR NETWORKING* E ESPECTROMETRIA DE MASSAS 28
4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Passiflora cincinnata* 28
4.6 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS 32
4.7 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES 32
4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS 34
5 REFERÊNCIAS 36
CAPÍTULO I 45

1. INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população mundial, o mercado de produtos pró-idade, classicamente denominados de *anti-aging,* vem crescendo exponencialmente. Estima-se que entre 2022 e 2027 ocorra um aumento de quase 7% a cada ano, mostrando que o cuidado com a saúde e aparência da pele é uma prioridade crescente dos consumidores (PETRUZZI, 2024; YANG et al., 2023). Além disso, a preocupação dos consumidores com a sustentabilidade e o impacto ambiental dos produtos tem aumentado. Nesse contexto, os cosméticos verdes, que utilizam princípios ativos de origem vegetal e processos sustentáveis, estão se tornando mais populares, contribuindo para a tendência de utilizar ingredientes naturais em substituição a substâncias sintéticas e reduzir o impacto ambiental (BARBULOVA; COLUCCI; APONE, 2015; FRANCA; UENO, 2020; LIMBU; AHAMED, 2023).

As principais causas para o envelhecimento cutâneo são ligadas à fatores intrínsecos, ou dependentes de idade, e fatores extrínsecos, dentre eles, o fotoenvelhecimento causado pela radiação ultravioleta e estresse oxidativo (LIMBERT et al., 2019). A exposição constante à radiação ultravioleta é extremamente nociva à saúde, contribuindo com o desenvolvimento de doenças como o câncer de pele, além de aumentar o risco de distúrbios da pigmentação, como melasma, e do fotoenvelhecimento (FARAGE et al., 2008).

O estresse oxidativo, causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminui a eficácia do sistema antioxidante endógeno da pele. Esse sistema possui enzimas capazes de degradar as ERO, como a glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase, que tem sua função diminuída após exposição ao estresse (PISOSCHI & POP, 2015). Para auxiliar nos danos causados pelos radicais, compostos antioxidantes podem ser absorvidos através da dieta ou aplicados diretamente na pele por meio de cosméticos, atuando principalmente na prevenção dos efeitos indesejados (ZILLICH et al., 2015). É notável a importância de desenvolver produtos a partir de ativos que possuam atividade antioxidante, e que irão prevenir a produção de espécies reativas de oxigênio e evitar a penetração da radiação ultravioleta na pele.

Os compostos fenólicos são conhecidos por diversas atividades relacionadas à cosmetologia, tais como antioxidante, fotoprotetora, hidratante e pró-idade (LEPHART, 2016; SALEM et al., 2020; YIN et al., 2013). A atividade antioxidante se deve à sua capacidade de atuarem como agentes redutores, doando hidrogênio e captando radicais

livres (STEVANATO et al., 2014). A capacidade dos compostos fenólicos de absorverem a radiação UV se deve à presença de cromóforos na sua estrutura, impossibilitando que a radiação solar penetre no tecido cutâneo (DE LIMA CHERUBIM et al., 2020). Com relação ao potencial hidratante dos flavonoides, o estudo de Kim e colaboradores (2018), apresentou bons resultados, mostrando que eles exercem uma função significativa na retenção da umidade da pele pela estimulação da expressão de genes que facilitam o transporte de íons e nutrientes.

A espécie *Passiflora cincinnata* é nativa do Brasil e popularmente conhecida como "maracujá do mato" e "maracujá da Caatinga" (BERNACCI et al., 2024). A análise da sua constituição química indica predominância de derivados fenólicos, especialmente os flavonoides, metabólitos que despertam o interesse para potencial uso como ativos em produtos farmacêuticos e cosméticos (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2014; GUEDES DA SILVA ALMEIDA et al., 2024; ZILLICH et al., 2015).

A constituição química dos vegetais pode sofrer modificações devido alguns fatores, como a sazonalidade, disponibilidade hídrica, exposição à radiação ultravioleta e ritmo circadiano, influenciando, consequentemente, na sua atividade biológica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PRINSLOO; NOGEMANE, 2018). Portanto, a variação sazonal dos metabólitos secundários é um fator que precisa ser levado em consideração no momento de coleta da planta. A indústria cosmética realizará a produção seguindo um planejamento, a fim de que a colheita seja efetuada na melhor época para que sua matéria-prima possua concentrações desejáveis de princípios ativos.

A entrega desses princípios ativos na pele enfrenta diversos desafios, principalmente devido à complexidade da barreira epidérmica, que dificulta a permeação dos componentes. Estratégias baseadas em nanotecnologia, como nanoemulsões, nanogéis e lipossomas, têm demonstrado sucesso em contornar essas barreiras. Essas nanoestruturas são capazes de melhorar a permeação cutânea ao reduzir o tamanho das partículas e ajustar a viscosidade e lipofilicidade, facilitando a passagem através da epiderme (AHMAD et al., 2018; ALI et al., 2017).

As nanoemulsões são geralmente compostas de água, óleo e surfactantes e podem ser classificadas como bifásicas (O/A ou A/O) ou múltiplas (A/O/A), dependendo da distribuição das fases dispersas e da fase contínua (SINGH et al., 2017). Possuem gotículas com diâmetros variando de 10 a 200 nm, revestidas por moléculas emulsificantes que fornecem um revestimento protetor (PAVONI et al., 2020). São termodinamicamente instáveis, mas apresentam estabilidade cinética, o que diminui a

separação gravitacional e a agregação das gotículas, e são capazes de melhorar a dissolução e biodisponibilidade dos ingredientes ativos encapsulados (ALGAHTANI; AHMAD; AHMAD, 2022; MALODE et al., 2022).

Assim, considerando a crescente e constante demanda por inovação na área da cosmetologia, e levando em conta o aumento na procura por produtos naturais por parte da população, em função de uma preocupação com a sustentabilidade (ZUCCO; SOUSA; ROMEIRO, 2020), este projeto teve como objetivo o desenvolvimento, caracterização e avaliação de uma nova matéria-prima cosmética a partir da *Passiflora cincinnata*, bem como o estudo da variação sazonal para um maior aproveitamento dos metabólitos, e sua incorporação em sistemas nanométricos com potencial hidratante, antienvelhecimento e fotoprotetor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O mercado de cosméticos

A utilização de ingredientes naturais para cuidados cosméticos, tanto para embelezamento quanto para proteção da pele, remonta aos primórdios da humanidade. Civilizações antigas já empregavam óleos e pigmentos derivados de plantas e minerais, além de fragrâncias extraídas de flores, para diversos fins, dentre eles, culturais, estéticos e religiosos. Há registros de que os egípcios, há cerca de 5000 anos a.C., usavam ervas como lavanda, alecrim, tomilho e hortelã, combinadas com óleos de oliva, gergelim e amêndoa, para produção de perfumes. De igual modo, as mulheres chinesas utilizavam cera de abelha, clara de ovo e pigmentos de flores para criar esmaltes desde 1050 a.C (MCMULLEN; DELL'ACQUA, 2023).

Apenas no século XX, com o avanço da industrialização, ingredientes sintéticos passaram a ser amplamente utilizados na produção de cosméticos e a incorporação de aditivos químicos para melhorar a eficácia e a durabilidade dos produtos tornaram-se comuns. No entanto, a partir do século XXI, houve um resgate do interesse por ingredientes naturais nas formulações cosméticas, que vem crescendo a cada dia em razão da conscientização da população com o meio ambiente e preocupação com a procedência dos produtos que consomem e aplicam na pele. Os cosméticos que utilizam produtos naturais são vistos pelos consumidores como mais seguros e saudáveis quando

comparados aos cosméticos sintéticos que contêm altos níveis de constituintes químicos (AJAYI et al., 2024; MCMULLEN; DELL'ACQUA, 2023; SAMANTA, 2021).

É possível enxergar essa mudança no padrão de consumo de cosméticos para produtos mais sustentáveis e naturais, observando o crescimento de 66% na receita global do mercado de cosméticos naturais gerada entre 2015 e 2023. Estima-se que nos próximos cinco anos ocorra um crescimento de 39% dessa receita, validando essa nova era sustentável na indústria da beleza (STATISTA, 2023).

Em uma era na qual a preocupação com o cenário ambiental global é o foco central de diversos setores da sociedade, a indústria cosmética se inclina para uma produção inovadora e consciente. O meio de produção tradicional contribui significativamente para a poluição ambiental já que promove o desmatamento, liberação de ampla gama de poluentes emergentes (EPs), liberação de microplásticos levando a contaminação de ecossistemas aquáticos, produção de resíduos, dentre outros (DAS et al., 2024; FRANCA; UENO, 2020).

Os consumidores têm se tornado mais conscientes e em resposta aos impactos ambientais gerados pela produção de cosméticos, cobram das empresas iniciativas sustentáveis. Essa mudança de padrão de consumo provocou a revisão e abandono de práticas nocivas, culminando em investimento em pesquisas científicas visando a implementação de processos de produção mais eficientes alinhados à utilização de ingredientes naturais, orgânicos e locais (AMBERG; FOGARASSY, 2019).

Os cosméticos formulados com uma abordagem sustentável e ecológica são denominados cosméticos verdes. Utilizam ingredientes naturais provenientes de plantas e outros recursos não sintéticos, bem como ingredientes orgânicos, que são cultivados sem o uso de pesticidas químicos ou fertilizantes. Além de preservar os recursos naturais, garantindo a utilização responsável dos recursos não renováveis, a utilização de cosméticos verdes colabora com a diminuição da poluição do ar, solo e água e preservação de espécies pela conservação de habitats (FRANCA; UENO, 2020; LIMBU; AHAMED, 2023).

Todavia, as iniciativas sustentáveis não podem ser relativizadas e reduzidas ao modismo verde no qual as empresas se vangloriam pela utilização de elementos naturais em seus produtos, mas, não diferem se os ingredientes vieram de uma cadeia de produção sustentável e local ou atravessaram o mundo utilizando meios de transporte danosos a atmosfera. A falsa promoção de campanhas com características ecologicamente corretas, quando, na verdade, a empresa não promove mudanças substanciais para reduzir seu

impacto ambiental é denominada *"greenwashing"*. Destacar um pequeno aspecto positivo como utilização de embalagem reciclável enquanto a produção do próprio produto gera inúmeros impactos danosos ao meio ambiente é um exemplo desta prática (NGUYEN et al., 2019).

A utilização de subprodutos da indústria para a fabricação de embalagens e até como matéria-prima, como é o caso de subprodutos vegetais e animais, é uma das soluções que podem ser utilizadas nessa busca da indústria cosmética pela sustentabilidade. Os resíduos vegetais são ricos em uma variedade de moléculas que podem ser usadas como ingredientes cosméticos. No entanto, o processo de extração e purificação dessas substâncias apresenta diversos desafios, como a variação do rendimento e da qualidade, dependendo dos métodos de extração utilizados (NHANI et al., 2024). O uso de solventes orgânicos na produção de extratos vegetais pode gerar problemas ecológicos, além de uma propensão maior a causar irritação cutânea, a extração aquosa é uma alternativa sustentável para essa questão.

Apesar de todos os benefícios obtidos pela utilização de ingredientes naturais na produção de cosméticos, tanto no âmbito ambiental quanto no potencial cosmetológico desses constituintes vegetais, a incorporação de extratos vegetais em formulações pode ser um desafio. Uma aliada nesse sentido é a nanotecnologia, que vai facilitar a manipulação de moléculas bioativas em escala nanométrica, aumentando a biodisponibilidade e eficácia do produto desenvolvido (NHANI et al., 2024).

2.2 Nanoemulsões

Matérias-primas vegetais têm sido cada vez mais veiculadas em sistemas nanoemulsionados. Nanoemulsões (NE) são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis, onde um forma a fase dispersa e o outro o meio de dispersão, com gotículas nanométricas variando de 10 a 200 nm. Compostas geralmente de água, óleo e tensoativos, que são compostos anfifílicos que reduzem a tensão interfacial entre as fases, as nanoemulsões melhoram a solubilidade, veiculação e biodisponibilidade de compostos lipofílicos como fármacos, óleos essenciais e nutrientes funcionais. Apesar de serem termodinamicamente instáveis, possuem estabilidade cinética devido à diminuição da separação gravitacional e agregação de gotículas, conferindo-lhes clareza óptica e capacidade significativa de melhorar a dissolução dos ingredientes ativos encapsulados (ALGAHTANI; AHMAD; AHMAD, 2022; MALODE et al., 2022; PAVONI et al., 2020).

As nanoemulsões podem ser obtidas utilizando métodos de alta e de baixa energia. Os métodos de alta energia para a preparação de NE utilizam dispositivos como homogeneizadores de alta pressão e sonificadores para aplicar forças disruptivas ao sistema de emulsão. Esses dispositivos, como homogeneizadores de alta pressão, funcionam forçando o material a fluir através de pequenos bicos ou válvulas sob pressões extremamente altas, até 200 MPa, utilizando uma bomba de pistão. Esse processo gera tensões de cisalhamento que quebram e misturam as fases de óleo e água, formando gotículas nanométricas. Embora esses métodos permitam a produção de NE com menores tamanhos de gotículas e maiores proporções de óleo/tensoativo, eles são onerosos e requerem a utilização de mais recursos devido à necessidade de equipamentos especializados e alto consumo de energia (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015; PAVONI et al., 2020).

Os métodos de baixa energia para preparação de nanoemulsões são mais simples, eficientes em termos de energia e fácil escalonamento, utilizando a energia química interna dos componentes do sistema. Esses métodos não requerem equipamentos especializados e aproveitam as propriedades intrínsecas do tensoativo, óleo e água para formar nanoemulsões de forma espontânea ou alterando condições como a temperatura.

Esses métodos podem ser classificados em isotérmicos e térmicos. Métodos isotérmicos, como a emulsificação espontânea (SE) e a inversão de fase de emulsão (EPI), não necessitam de mudança de temperatura, baseando-se na formação espontânea de gotículas ultrafinas na interface entre fases específicas. Exemplos incluem a simples mistura de óleo, água e um solvente miscível em água, ou a adição de uma mistura de óleo e tensoativo hidrofílico a uma fase aquosa. O método térmico é o método de temperatura de inversão de fase (PIT). Devido ao baixo custo, facilidade de implementação e potencial para aumento de escala industrial, os métodos de baixa energia são amplamente pesquisados e aplicados (ALGAHTANI; AHMAD; AHMAD, 2022; ANTON; VANDAMME, 2009; KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015).

A emulsificação espontânea consiste em adicionar a fase orgânica, composta por óleo, tensoativo e co-tensoativo, à fase aquosa com agitação suave. Nesta técnica, o tensoativo na fase orgânica tem uma alta afinidade pela fase aquosa. Após a mistura das duas fases, a turbulência gerada faz com que o tensoativo rapidamente se difunda na fase aquosa e forme uma camada ao redor das gotículas de óleo, diminuindo a tensão interfacial e resultando na formação espontânea de nanoemulsões (NE) (MALODE et al., 2022; SNEHA; KUMAR, 2022). O co-tensoativo auxilia na criação de turbulência e na

diminuição da tensão interfacial, facilitando a dispersão ao ocupar os espaços ao redor das gotículas de óleo que não foram protegidos pelo tensoativo (ALGAHTANI; AHMAD; AHMAD, 2022).

Este processo de emulsificação é dependente do tipo e concentração de tensoativo. A seleção de tensoativos para emulsificação espontânea baseia-se no equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), que representa a força e o tamanho das partes hidrofílicas e lipofílicas da molécula do tensoativo (ALGAHTANI; AHMAD; AHMAD, 2022).

O estudo de Pavoni (2020) comprovou a influência do tensoativo para a estabilidade termodinâmica das NE ao longo do tempo, após comparar diversos tensoativos, o *Polysorbate* 80 foi considerado a melhor escolha para produção das NE, tanto pelas formulações que o utilizaram apresentarem valores de PDI e tamanho de gotículas ideais, como por ter tido o melhor resultado de citotoxicidade, tendo sido considerado o tensoativo mais seguro dentre os testados.

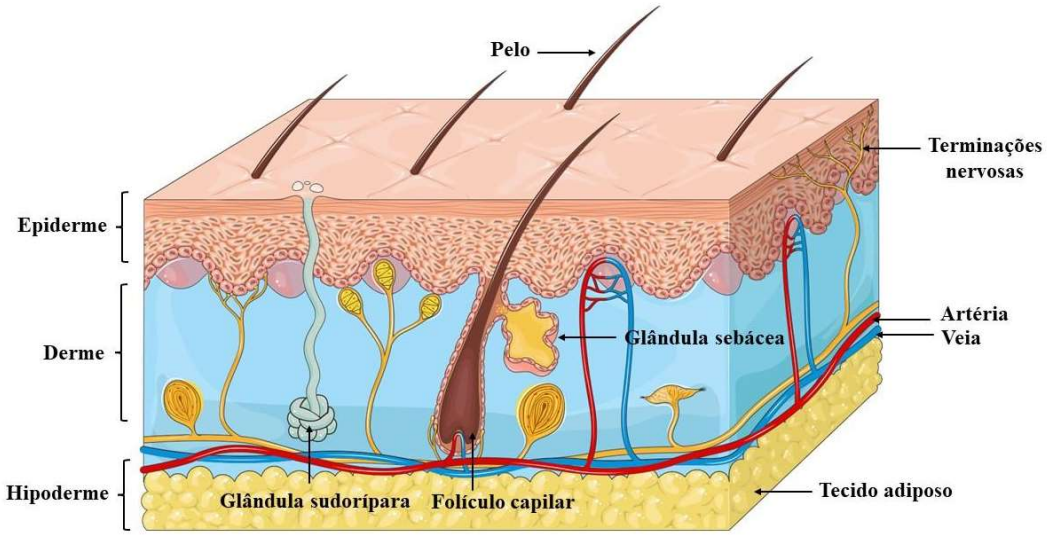
2.3 Pele

A pele (Figura 1) é o maior órgão do corpo humano e o responsável pela proteção primária contra elementos externos, atuando como barreira física contra patógenos, fazendo a regulação hídrica e protegendo contra o calor, frio e radiação. É composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (BARONI et al., 2012; WANG; WU, 2019).

A hipoderme é a região mais interna da pele e atua na termorregulação e proteção contra choques mecânicos através dos adipócitos, células de gordura. Também estão presentes na hipoderme os fibroblastos, macrófagos, nervos e vasos sanguíneos (BARONI et al., 2012; WANG; WU, 2019). A derme, localizada na camada média da pele, é composta por tecido conjuntivo rico em colágeno e elastina, além de uma matriz extracelular abundante contendo proteoglicanos e fibronectina. Essa camada é altamente vascularizada e possui uma rede de vasos linfáticos, além de abrigar glândulas sudoríparas, sebáceas, apócrinas e folículos capilares. A derme oferece suporte mecânico e flexível à pele, graças à presença de fibroblastos que sintetizam e renovam a matriz extracelular, e macrófagos que eliminam materiais estranhos e tecidos danificados. Diversas células, como mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células T, células B e células dendríticas, estão presentes na derme, contribuindo para sua dinâmica e capacidade de resposta a estímulos (BARONI et al., 2012; BOUWSTRA et al., 2023; WANG; WU, 2019).

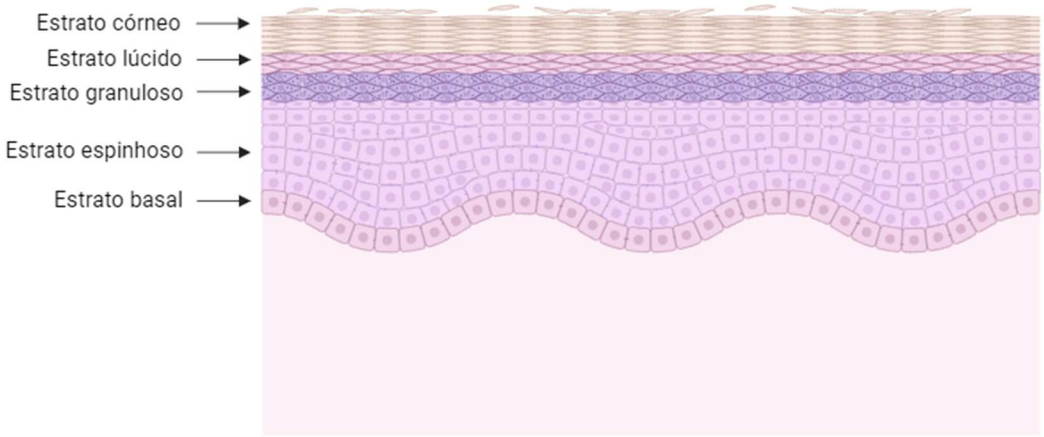
A epiderme é a camada mais externa da pele, constituída principalmente por queratinócitos, melanócitos, células T e células de Langerhans, e é subdividida em cinco camadas (Figura 2). No estrato basal, a camada mais profunda da epiderme, ocorre a proliferação dos queratinócitos a partir das células-tronco epidérmicas, nessa camada também estão presentes os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, e as células de Merkel, que funcionam como receptores do toque. No estrato espinhoso ocorre a diferenciação dos queratinócitos e o início da síntese de lipídios, que é continuada no estrato granuloso, onde ocorre a produção de queratina pelos queratinócitos (BOUWSTRA et al., 2023; TOBIN, 2017). O estrato lúcido está presente apenas nas regiões onde a pele é mais espessa, como palma das mãos e sola dos pés, e é composto por uma camada de células planas e anucleadas (YOUSEF et al., 2024). A última camada é o estrato córneo (SC), que consiste em corneócitos - células anucleadas derivadas da cornificação dos queratinócitos, morte celular programada após o término da diferenciação dos queratinócitos (TONČIĆ et al., 2018), envoltos por uma matriz lipídica composta por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. O SC possui entre 10 a 20µm de espessura e faz contato direto com o mundo externo, sendo de extrema importância a sua integridade para que sua função de barreira seja exercida corretamente (BOUWSTRA et al., 2023; POUILLOT et al., 2008).

Figura 1: Representação das camadas da pele.



Fonte: Criado com SmartServier.com (2024).

Figura 2: Camadas da epiderme.



Fonte: Criado com BioRender.com (2024).

2.4 Papel dos antioxidantes no envelhecimento

O envelhecimento cutâneo está associado a fatores intrínsecos e extrínsecos. O envelhecimento intrínseco sofre influência hormonal e genética, e apresenta sinais em idade mais avançada, podendo sofrer variações entre indivíduos de diferentes etnias (FARAGE et al., 2008). O encurtamento progressivo dos telômeros dos cromossomos e os danos ao DNA são os principais desencadeadores desse tipo de envelhecimento. Nele também vai ocorrer diminuição da produção de colágeno, redução dos mastócitos e fibroblastos, e uma atrofia dérmica e epidérmica (LIMBERT et al., 2019; TOBIN, 2017). As características observadas são aspecto mais rígido e seco da pele, sem manchas e com rugas finas (LIMBERT et al., 2019).

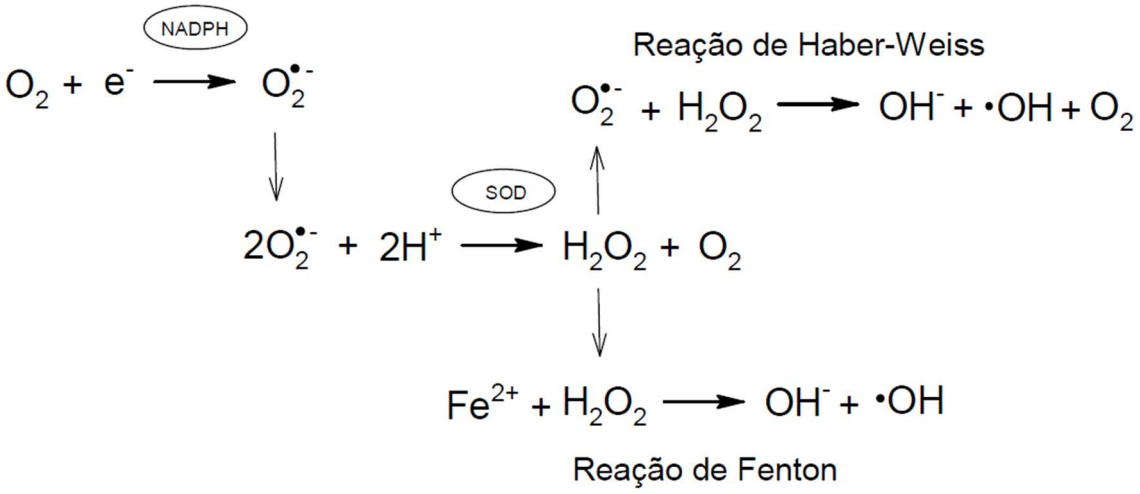
O envelhecimento extrínseco é proveniente de fatores mecânicos, como movimentos musculares repetitivos; estilo de vida, como dieta e tabagismo; e ambientais, como a poluição atmosférica e, principalmente, a exposição à radiação ultravioleta (fotoenvelhecimento). O fotoenvelhecimento é a maior fonte de envelhecimento extrínseco e se manifesta em regiões que ficam expostas diretamente ao sol, como rosto, mãos e pescoço. As características visíveis são uma pele de textura áspera, com hiperpigmentações irregulares e rugas profundas (LIMBERT et al., 2019; TOBIN, 2017).

O estresse oxidativo é causado por um desbalanço no equilíbrio entre o sistema antioxidante endógeno e os ataques causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO, que são produtos de reações de oxidação fundamentais para o funcionamento do organismo, como a respiração celular, e que tem sua produção exacerbada pela exposição à radiação UV (PISOSCHI; POP, 2015). As ERO podem ser divididas em duas categorias: moléculas de oxigênio que têm um elétron desemparelhado (radicais livres), ânions superóxido e radicais hidroxila; e moléculas de oxigênio que estão em um estado

excitado, oxigênio singleto, e não radicais, peróxido de hidrogênio (MASAKI, 2010; POUILLOT et al., 2011). As ERO prejudicam as sequências de nucleotídeos, levam à formação de dímeros de pirimidina e ativam mecanismos de resposta a danos no DNA. Além disso, o estresse oxidativo provocado pelos raios UVA danifica os vasos sanguíneos, resultando na redução da vascularização dérmica, e os melanossomas na pele, causando oxidação da melanina e resultando em mudanças na pigmentação, características do fotoenvelhecimento (KADDURAH et al., 2018).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) inicia a cadeia de reações redox (Figura 3) ao ser formado pela redução do oxigênio molecular e serve como um precursor crucial para a geração de outros intermediários reativos ao longo dessas reações sequenciais. O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante que na presença de íons metálicos como Cu^{2+} e Fe^{3+} forma o radical hidroxila através da reação de Fenton. Esse radical também pode ser formado a partir da reação de Haber-Weiss com a interação do peróxido de hidrogênio com o radical superóxido (GÜLÇIN, 2012; GULCIN, 2020).

Figura 3: Esquema simplificado das reações que levam às formações das ERO.



Fonte: Criado com o programa ChemSketch.

Os antioxidantes podem reagir esgotando o oxigênio molecular ou diminuindo sua concentração local, removendo íons metálicos pró-oxidativos, capturando ERO, eliminando radicais iniciadores de cadeia (como hidroxil, alcoxil e peroxil), quebrando a cadeia de uma sequência radical ou extinguindo o oxigênio singleto, atuando em diferentes etapas da cadeia oxidativa, dividida em iniciação, propagação e terminação (PISOSCHI; POP, 2015). Os principais antioxidantes endógenos são: superóxido

dismutase, superóxido redutase, catalase e glutationa peroxidase. Com a exposição solar contínua e sem proteção há um aumento das ERO e um desbalanço no sistema antioxidante. Dessa forma, a utilização de antioxidantes exógenos, seja por aplicação tópica ou por ingestão alimentar, contribui para a restauração desse equilíbrio e o retardamento do envelhecimento cutâneo (ORESAJO et al., 2012; POUILLOT et al., 2008).

Os compostos bioativos produzidos por espécies vegetais são fontes abundantes de atividade antioxidante. Por sofrerem agressões recorrentes do meio ambiente, como alta incidência solar, estresse hídrico e ataques de patógenos, as plantas produzem substâncias antioxidantes como mecanismo de defesa (MARTINS et al., 2020; POUILLOT et al., 2011). O ácido ascórbico (vitamina C), alfa tocoferol (vitamina E), carotenoides (beta caroteno), compostos fenólicos (resveratrol) e flavonoides (quercetina) são alguns exemplos de metabólitos com atividade antioxidante mais utilizados (PISOSCHI; POP, 2015).

2.5 Família Passifloraceae e o Gênero *Passiflora* L.

A Passifloraceae Juss. ex Roussel, *nom. cons*. é uma família de angiospermas pertencente à ordem Malpighiales Juss. ex Bercht. & J.Presl, com cerca de 630 espécies classificadas em aproximadamente 20 gêneros. Sua predominância é nas zonas tropicais e temperadas, distribuídas principalmente entre América e África (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007; WANDERLEY et al., 2003).

A família Passifloraceae está dividida em duas tribos: *Paropsieæ* e *Passiflorieæ*, sendo a primeira encontrada exclusivamente no continente africano, com cerca de 6 gêneros, e a segunda representada por 14 gêneros, dentre esses, 5 encontrados na América Latina (BYNG et al., 2016).

O gênero *Passiflora* L., integrante da tribo *Passiflorieæ*, é considerado o mais importante da família, com cerca de 400 espécies. No Brasil há cerca de 140 espécies nativas desse gênero. O gênero é subdividido em quatro subgêneros, sendo eles: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* (CERVI, 1997).

O subgênero *Passiflora* possui cerca de 236 espécies presentes principalmente na América do Sul e América Central. Suas espécies são conhecidas popularmente como “maracujás” e tem grande importância econômica e na medicina popular, sendo utilizadas como ansiolítico e sedativo (OLIVEIRA, 2019).

2.6 A espécie *Passiflora cincinnata* Mast.

A *Passiflora cincinnata* Mast. (*P. cincinnata*) é uma espécie nativa do Brasil integrante do gênero *Passiflora* L. e conhecida popularmente como "maracujá-do-mato", "maracujá-da-caatinga", "maracujá-mochila" e "maracujá-do-cerrado". Possui ampla distribuição na América Latina, sendo que no Brasil pode ser encontrada nas regiões Norte (Pará e Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte), Centro-oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal) e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), com destaque para os biomas Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Amazônia (BRAGA et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018).

Com relação à sua morfologia, a *P. cincinnata*, representada na Figura 4, trata-se de uma trepadeira com caule cilíndrico; estípulas linear-subuladas; pecíolo aproximadamente a 1 cm da base foliar; folhas verde escuras 3-5-palmatipartidas finamente serrilhadas com aproximadamente 8 cm de comprimento e 10 cm de largura; pedúnculos robustos de 2-8 cm de comprimento; flores solitárias, de 5-12 cm de diâmetro, internamente azul-arroxeadas e externamente verde pálidas; bagas ovóides de cor verde escura com sementes ovais, reticuladas (CERVI, 1997; SACRAMENTO NUNES; PAGANUCCI DE QUEIROZ, 2006).

Figura 4: Flor e folhas de *Passiflora cincinnata*.

Fonte: Autoria Própria.

P. cincinnata é uma espécie que apresenta alto potencial agronômico, dispõe de elevada tolerância a doenças e pragas e seu fruto possui alta resistência ao manuseio e transporte, por conta disso pode ser enxertada juntamente com outras espécies de maracujá para aumentar o índice de sobrevivência delas. Além disso, sua polpa é muito

utilizada na fabricação de geleias, sucos, licores e sorvetes e consumida *in natura* (PAIVA; SANTOS, 2021). Suas flores possuem potencial de ser usadas como ornamentação, suas sementes são ricas em óleo, podendo ser utilizadas na indústria alimentícia e cosmética. E suas cascas e folhas apresentam atividade antimicrobiana, antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante, possibilitando seu uso como fitoterápicos devido à sua composição química (COELHO et al., 2016).

2.7 Composição química da espécie

Os polifenóis são uma das principais classes de compostos bioativos encontrados nas espécies *Passiflora*, que também incluem triterpenos, carotenoides, polissacarídeos, aminoácidos, óleos essenciais e flavonoides, constituintes que desempenham um papel crucial na manifestação de efeitos antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, hepatoprotetores e anti-inflamatórios associados a essas plantas (NIKOLOVA et al., 2024).

Apesar de variar entre as espécies, a composição química das *Passifloras* é composta principalmente de flavonoides, que são consideradas substâncias características desse gênero, como demonstra o estudo de Sakalem e colaboradores (2012), que analisou cinco espécies de *Passiflora* (*P. sidifolia*, *P. quadrangularis*, *P. bahiensis*, *P. coccinea* e *P. vitifolia*) e encontrou os flavonoides *C*-glicosilados nas cinco espécies (WOSCH et al., 2017).

O estudo de Gadioli (2016) mostrou que a espécie *P. cincinnata* possui em sua constituição química a presença de alguns taninos, ácidos fenólicos, sendo que a maior parte da sua composição consiste em flavonoides *C*-glicosilados, principalmente vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, essa identificação também pode ser observada no estudo de Almeida e colaboradores (2024).

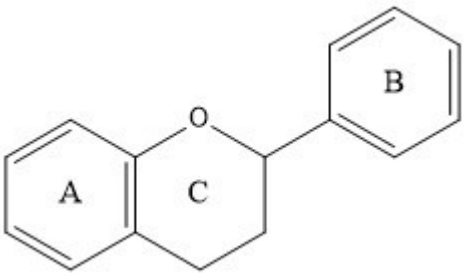
Os flavonoides representam uma classe importante de compostos fenólicos, podendo ser subdivididos em antocianinas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas. Presentes em folhas, sementes, cascas e flores de plantas, esses metabólitos secundários desempenham uma variedade de funções biológicas essenciais. Nas plantas, oferecem proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros, demonstrando sua importância para a sobrevivência vegetal (DURAZZO et al., 2019).

Essa classe de compostos compreendem uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo efeito antioxidante, antibacteriano, cardioprotetor, anti-

inflamatório e anticancerígeno (SHEN, 2022; SHAMSUDIN et al., 2022; TESTAI et al., 2013; FATMAWATI, 2024; KOPUSTINSKIEN et al., 2020).

Caracterizados por possuírem dois ciclos aromáticos ligados por um heterociclo (Figura 5), a substituição de grupos químicos em suas estruturas está diretamente relacionada às suas propriedades biológicas e/ou químicas, bem como à biodisponibilidade desses compostos (TREUTTER, 2006). A atividade antioxidante atribuída a esses compostos está associada à estrutura, ao tipo, ao número e à posição dos substituintes nos anéis aromáticos, bem como à estrutura das cadeias laterais (MARKOVIĆ, 2016).

Figura 5: Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Criado com o programa Chemdraw.

2.8 Variação Sazonal de espécies vegetais

Existem diversos fatores que podem modificar a composição química de espécies vegetais, como a sazonalidade, o ritmo circadiano, idade da planta, temperatura ambiente, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, ataque de patógenos - estes podendo apresentar ou não correlação entre si - influenciando, consequentemente, na atividade biológica da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PRINSLOO; NOGEMANE, 2018).

O conhecimento acerca dessa interferência de fatores bióticos e abióticos na variação dos metabólitos secundários têm gerado pesquisas sobre a influência da sazonalidade em inúmeras espécies, visto que o cultivo e coleta de determinada planta pode ser planejado levando em conta a época em que ela produza seus componentes nas concentrações de interesse para a indústria farmacêutica. Tais pesquisas comprovaram a oscilação de terpenos (ABD-ELGAWAD et al., 2023; SUFFREDINI et al., 2016; ZERMIANI et al., 2016), alcaloides (KAUSHAL; ALKA, 2023; MAHAR et al., 2022; SATYAVARAPU; SINHA; MANDAL, 2020) e compostos fenólicos (AOUSSAR et al.,

2020; CAO et al., 2019; GOMES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020) em diferentes épocas do ano.

O estudo de Shi e colaboradores (2022) observou um aumento no conteúdo de flavonoides totais nos meses de abril e maio (correspondentes à estação chuvosa na China) na espécie *Tetrastigma hemsleyanum*, além de avaliar as vias de reação para biossíntese dos flavonoides, a partir da flavona e do flavonol, o último tratando-se da via favorecida na maioria do ano, sendo o precursor de seis compostos de janeiro a setembro.

A importância de se estudar o ecossistema da Caatinga e o comportamento da sua flora foi destacado por Trovão e colaboradores (2007) no estudo sobre a variação sazonal de espécies da Caatinga. Como demonstrado no estudo, em época de déficit hídrico as plantas desse bioma apresentaram adaptações para manter os estoques de água. Por se tratar de um bioma exclusivamente brasileiro e com características peculiares, como um solo altamente seco, devido não só a longos períodos de estiagem, mas também a alta incidência solar associada a altas temperaturas, as espécies que habitam essa região precisaram sofrer adaptações para sobreviver nessas condições de estresse.

2.9 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica onde é possível determinar a massa molecular de determinada substância, facilitando a identificação ou confirmação de compostos presentes em misturas complexas, de acordo com as razões massa-carga (*m/z*) obtidas a partir da ionização e fragmentação desses compostos (FARID; BASHIR; ALI, 2022). Para que seja possível gerar tais resultados, os espectrômetros de massa são divididos em três partes principais: fonte de ionização, analisador e detector (AWAD; KHAMIS; EL-ANEED, 2015).

Existem diversos tipos de fonte de ionização que podem ser utilizadas para ionizar a amostra, como ionização por elétrons, ionização química, MALDI, ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por *eletrospray* (ESI), e que vão atuar a partir de diferentes mecanismos de ação. Na ESI, a amostra dissolvida em solvente apropriado e introduzida em uma agulha capilar de metal carregada positiva ou negativamente a depender da natureza do analito. Esse campo elétrico formado na agulha faz com que gotículas carregadas sejam formadas enquanto o solvente é evaporado, resultando em gotículas cada vez menores, gerando uma repulsão entre as cargas iguais muito grande, que resulta na liberação dos íons em "*spray*" que seguem para o analisador (AWAD; KHAMIS; EL-ANEED, 2015; CROTTI et al., 2006).

Os principais tipos de analisadores são tempo de voo (TOF), *Ion trap*, *Orbitrap* e quadrupolo. O analisador TOF separa os íons com base no tempo que levam para percorrer uma distância fixa em um campo elétrico, íons com *m/z* diferentes terão velocidades diferentes (ERNST et al., 2014). Analisadores do tipo Quadrupolo são constituídos de quatro hastes, dois pares de polos opostos formando um campo elétrico. Dependendo da voltagem aplicada, íons de determinada razão *m/z* são "filtrados" (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Esses analisadores também podem ser acoplados, chamados de espectrometria de massas em tandem, como é o caso do analisador de tempo de voo quadrupolo (Q-TOF), um aparelho de alta resolução onde o íon primeiro é selecionado por um analisador do tipo quadrupolo e depois é separado pelo tempo de voo. Algumas vantagens desses analisadores são a precisão na medição de massa e uma alta velocidade de varredura, tornando-os compatíveis com as cromatografias rápida e ultrarrápida (CAMPBELL; LE BLANC, 2012).

Por fim, os detectores vão transformar o sinal elétrico dos íons provenientes do analisador em um espectro de massas, formando sinais correspondentes a intensidade dos íons em função da sua razão *m/z* (CAMPBELL; LE BLANC, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.10 *Global Natural Products Social Networking*

O GNPS (*Global Natural Products Social Networking*) é uma plataforma online que facilita o armazenamento, análise e propagação de grandes conjuntos de dados gerados por espectrometria de massas em tandem (EM/EM). Ela permite o compartilhamento de espectros brutos, a criação de redes moleculares que facilitam a interpretação dos dados depositados e disponibiliza espectros de referência, a partir de bancos de dados robustos, conhecidos como bibliotecas espectrais (WANG et al., 2016). A plataforma organiza os espectros EM/EM fornecidos pelo usuário de acordo com a similaridade entre padrões de fragmentação de íons precursores relacionados. Isso ajuda a destacar moléculas análogas e, ao comparar espectros EM/EM com os bancos de dados, facilita a desreplicação de compostos e classes de compostos (DEMARQUE et al., 2020; PILON et al., 2021).

Com base na similaridade espectral, o GNPS agrupa os nodos (compostos que posteriormente vão ser identificados a partir das bibliotecas espectrais) em clusters. A junção de dois nodos se dá pelo valor de cosseno que varia de 0 (não possuem nenhuma

similaridade) a 1 (100% de similaridade) (PILON et al., 2021). A partir de um valor mínimo de cosseno pré-estabelecido pelo usuário, as conexões entre os nodos são formadas, as arestas. Quando um nodo não atinge esse valor mínimo de cosseno para criar a conexão com outro composto ele fica sozinho na rede, são os chamados *self-loops* (DEMARQUE et al., 2020). As redes geradas podem ser analisadas no próprio GNPS ou exportadas para análise no programa Cytoscape.

Para o *Molecular Networking* os dados brutos precisam ser convertidos em formatos compatíveis com o sistema (.mzML ou .mzXML) para realizar o *upload* na plataforma. No modo *Molecular Networking* Clássico não é necessário fazer um pré-processamento dos dados antes de importá-los na plataforma (apenas a conversão) e pode ser utilizado tanto para conjuntos de amostras maiores quanto para menores, tendo como vantagem uma rapidez maior na criação da rede. Como desvantagem, o algoritmo MSCluster (utilizado no modo clássico para a criação dos espectros consenso, ou seja, que pertencem a um único sinal cromatográfico), não considera o tempo de retenção dos sinais cromatográficos, podendo levar a junção de isômeros e isóbaros (PILON et al., 2021).

O modo *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) foi desenvolvido com o intuito de aprimorar o MN clássico e solucionar os problemas causados pelo uso do MSCluster. Esse modo permite distinguir os isômeros com espectros EM/EM parecidos, fornece respostas quantitativas que possibilitam análises estatísticas robustas em metabolômica e facilita a anotação espectral (NOTHIAS et al., 2020). Para isso, é necessário realizar um pré-processamento dos dados para que sejam convertidos em um *feature*, a ferramenta mais utilizada para essa finalidade é o MZMine. Além disso, é necessário que o espectômetro de massas esteja acoplado a um cromatógrafo, por exemplo, pois o tempo de retenção vai ser associado aos espectros (PILON et al., 2021).

2. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter, caracterizar e padronizar extrato das folhas de *Passiflora cincinnata* e desenvolver formulações cosméticas com potencial hidratante, antioxidante e pró-idade sob a forma de nanoemulsões.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Padronizar os extratos das folhas de *Passiflora cincinnata* quanto ao seu conteúdo de flavonoides totais;

3.2.2 Verificar a presença ou ausência de variação sazonal aplicando redes moleculares;

3.2.3 Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *Passiflora cincinnata* por meio de diferentes metodologias *in vitro*: capacidade antioxidante total, poder redutor, capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), quelação dos íons Cobre (Cu^{2+}) e Ferro (Fe^{2+}) e a capacidade de sequestro dos radicais Hidroxila (OH^{-}) e Superóxidos (O^{2-});

3.2.4 Desenvolver nanoemulsões para incorporação de extratos de *Passiflora cincinnata*;

3.2.5 Caracterizar as formulações desenvolvidas do ponto de vista físico-químico;

3.2.6 Avaliar a estabilidade preliminar e acelerada das formulações desenvolvidas.

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Uma população de *P. cincinnata* foi identificada e demarcada, no município de Vitória da Conquista-BA (Latitude: 14º 52’ 57” Sul, Longitude: 40º 47’ 53” Oeste). No local foram selecionados 3 indivíduos diferentes para realizar o estudo sazonal, denominados A, B e C. As folhas de cada indivíduo foram coletadas mensalmente em torno das 09:00 horas, por um período de um ano (05/21 - 04/22), e acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados com o código do indivíduo e data da coleta. As amostras foram secas a 40°C por 48 horas em estufa de ar circulante e estocadas em freezer até o momento do processamento para análise.

O cadastro junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) está sob o n. AE76E5D.

4.2 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO

Para o preparo do extrato aquoso as folhas foram trituradas em moinho de facas e em seguida submetidas a tamisação (180/80µm) para padronização da granulometria.

- Para a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante:

Foram preparados extratos correspondentes ao *pool* dos indivíduos A, B e C de cada mês (sendo que no mês de outubro não houve coleta do indivíduo A por ausência de folhas), resultando em 12 extratos.

Para análise, 100 mg de cada amostra foram suspendidas em 15 mL de água ultrapura, em seguida foi submetida a 10 segundos no vórtex, 15 minutos no ultrassom e 10 minutos na centrífuga a 171.36 RCF. Posteriormente, os extratos foram filtrados com papel filtro.

- Análise por CL/EM:

Foram preparados extratos correspondentes ao *pool* dos indivíduos A, B e C de cada mês (sendo que no mês de outubro não houve coleta do indivíduo A por ausência de folhas), resultando em 12 extratos.

Para análise, 10 mg de cada amostra foram suspendidas em 1,5 mL de água ultrapura, em seguida foi submetida a 10 segundos no vórtex, 15 minutos no ultrassom e 10 minutos na centrífuga a 171,36 g. Posteriormente, o sobrenadante dos extratos foi filtrado com filtro de seringa 0,45 µm.

Em seguida, foi realizada uma extração em fase sólida (SPE) de todos os extratos utilizando cartucho Discovery Tubo SPE DSC-18 com capacidade para 1 mL.

Foi feito o condicionamento do cartucho com 3 mL de metanol, seguido por 3 mL de água ultrapura. Depois uma alíquota de 1,0 mL do extrato foi aplicada, seguido de 1 mL de água destilada, e por fim, 500 µL de metanol, fração que foi coletada e seca em estufa.

- Para incorporação na formulação:

Foi produzido um extrato com 0,67% de folhas e 99,33% de água destilada que foi submetido a 10 segundos no vórtex, 15 minutos no ultrassom e 10 minutos na centrífuga a 171.36 RCF. Posteriormente, o extrato foi filtrado com papel filtro.

4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Um cromatógrafo UFLC da Shimadzu (Tóquio, Japão) foi utilizado nas análises. O equipamento consiste em duas bombas LC-20AD, autoinjetor SIL-20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, controlador CBM-20A e CTO-20A. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com ionização por eletrospray (ESI), e um analisador de tempo de voo quadrupolo. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Kinetex C18 (Phenomenex, 2,6 µm, 150 × 2,1 mm) conectada a uma pré-coluna do mesmo material. Todas as amostras foram solubilizadas em metanol e água ultrapura 7:3 (v/v) usando 0,6 mL e filtradas através de filtros de seringa (0,22 µm, PTFE, Millipore®, Billerica, MA, EUA), foram injetados 2 µL de cada amostra no sistema cromatográfico. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). A cromatografia foi realizada a 50ºC (temperatura do forno), com vazão de 0,3 mL/min e o seguinte gradiente: 0–2 min - 3% B, 2–25 min - de 3% a 25% B, 25–40 min - de 25% a 80% B, e 40-43 min a 80% B. As análises EM foram realizadas em modo de íons positivos e negativos, usando nitrogênio como gás nebulizador (4 bar), gás de secagem (9 L/min) e gás de colisão. A tensão do capilar foi ajustada para 3,5 kV.

4.4 ANOTAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Passiflora cincinnata* POR *FEATURE BASED MOLECULAR NETWORKING* E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As redes moleculares (RM) foram criadas no modo *Feature Based Molecular Networking* (FBMN), para isso os dados brutos obtidos por UFLC/MS foram convertidos em mzML no programa MSConvert e em seguida importados no programa MZMine para as etapas de pré-processamento empregando os seguintes parâmetros (Pilon et al., 2021): detecção de massa usando o algoritmo de massa exata (nível de ruído, 1E3 para EM e 1E2 para EM/EM); construtor de cromatograma (tamanho mínimo do grupo em número de varreduras, 2; altura mínima, 3E2; tolerância *m/z*, 50 ppm); deconvolução do cromatograma usando o corte de linha de base (altura mínima do pico, 3E2; duração do pico, 0,01 a 2,0 min; nível de linha de base, 1E2); agrupador de pico isotópico (tolerância *m/z*, 50 ppm; tolerância do tempo de retenção, 0,2 min; carga máxima, 2; isótopo representativo, mais intenso); e alinhamento usando o alinhador de junção (tolerância *m/z*, 50 ppm; peso para *m/z*, 75; tolerância para tempo de retenção, 0,1; peso para tempo de retenção, 25); filtro (mínimo de picos na linha, 1; mínimo de picos em um padrão de isótopos, 1); reanálise dos dados (tolerância de intensidade, 10; tolerância *m/z*, 50 ppm; tolerância do tempo de retenção, 0.1 min); download dos arquivos gerados.

No GNPS foram importados os arquivos gerados no MZMine nos formatos .txt; .mgf; e .csv. as redes moleculares (FBMN) foram criadas usando os parâmetros gerais a seguir: tolerância de massa do íon precursor, 0.01 Da; tolerância de massa do íon fragmento, 0.01 Da; pares mínimos de cosseno, 0.7; mínimo de íons fragmentados correspondentes, 4; picos mínimos correspondentes de pesquisa na biblioteca, 4. A rede molecular criada no GNPS foi importada para o *software* Cytoscape 3.10.1 para ser analisada.

4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Passiflora cincinnata*

Os extratos provenientes das coletas mensais da variação sazonal foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante *in vitro* frente a diferentes metodologias para identificar os mecanismos pelos quais elas poderiam atuar como um agente antioxidante. Todos os testes foram avaliados com os extratos na concentração de 1,6 mg/mL, com exceção do sequestro do radical DPPH, onde os extratos foram diluídos para 0,2 mg/mL.

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

As amostras foram avaliadas de acordo com o método descrito por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). Foi avaliada a capacidade das amostras em doar elétrons para o radical DPPH por meio de mudança na coloração provocada pela redução deste radical. Uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM (200,0 µL) foi adicionada a 100,0 µL de cada amostra. Em seguida as amostras foram agitadas e mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por um período de 30 minutos. As alterações colorimétricas foram avaliadas por espectrofotometria (BioTek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA) no comprimento de onda de 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão. Uma solução contendo DPPH e o solvente utilizado para preparo das amostras foi feita como controle negativo, o branco foi preparado utilizando etanol e o solvente utilizado para preparo das amostras e para o controle positivo foi utilizado o Butilhidroxitolueno (BHT), nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 8,0 e 10,0 mg/mL. A porcentagem de sequestro de radicais foi mensurada por meio da equação 1 abaixo:

$$Seq.Rad.DPPH\ (\%) = [1 - (Absamostra - Absbranco)x100\ (1)$$

4.5.2 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada utilizando um método espectrofotométrico fundamentado na redução do Molibdênio^{+6} a Molibdênio^{+5}, resultando em um complexo esverdeado denominado Fosfato/Molibdênio^{+5} em meio ácido (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Inicialmente, 500,0 µL das amostras foram adicionadas a 500,0 µL de soluções reagentes (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28,0 mM e molibdato de amônio 4,0 mM), incubados à 95°C por 90 min e, após o arrefecimento das amostras à temperatura ambiente, os valores de absorbância foram mensurados no comprimento de onda de 695 nm (BioTek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA) e como padrão foi utilizado o ácido ascórbico (2; 5; 20; 30; 40; 50; 80; 100 e 200 µg/mL). Os resultados foram expressos na forma de equivalentes de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/ g de amostra).

4.5.3 Sequestro de radicais Superóxidos (O_2^-)

A capacidade sequestradora de íons superóxido foi avaliada através da redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) através do sistema Riboflavina-Luz-NBT. Os extratos das folhas de *Passiflora Cincinnata* foram avaliados na concentração de 1,6

mg/mL (200,0 µL). Para o controle foi utilizado 200µL de ácido gálico na concentração de 1,0mg/mL e para o branco foi utilizado 200 µL de tampão fosfato 50,0 mM pH 7,4. Soluções de metionina (200,0 µL), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (200 µL) e NBT (200,0 µL) foram adicionadas aos tubos teste, controle e branco. A riboflavina (200,0 µL) foi adicionada aos tubos teste e controle. A solução branco foi protegida da luz e posteriormente adicionada solução de riboflavina (200,0 µL). Os tubos foram submetidos à agitação e posteriormente levados à câmara de fotoluminescência por um período de 15 minutos, simulando a luz solar. A absorbância foi avaliada em um comprimento de onda de 560 nm (Bio Tek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). O percentual de sequestro de radicais superóxido foi obtido por meio da equação 2.

$$Seq.Rad.Superóxido\ (\%) = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{(Abs_{controle} - Abs_{branco})}\ x\ 100\ (2)$$

4.5.4 Quelação de íons de Cobre (Cu^{2+})

Foi avaliada a capacidade da amostra em quelar o íon cobre (Cu^{2+}) por meio do método descrito por Anton (1960). As amostras (230 µL) foram adicionadas a uma solução reagente de piracotecol 4 mM (6 µL) e sulfato de cobre II (100 µL), mantida ao abrigo de luz, e posteriormente mensuradas em 632 nm (Bio Tek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Uma curva padrão foi construída utilizando o EDTA (0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/µL). Para o branco, foi utilizado 230 µL de tampão fosfato 50 mM pH 6,0 no lugar da amostra. Os resultados foram expressos de acordo com a equação 3.

$$Quelação\ de\ Cobre\ (\%) = \left[1 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{branco}}\right)\right] x\ 100\ (3)$$

4.5.5 Quelação de íons de Ferro (Fe^{2+})

A capacidade das amostras em quelar o íon ferro foi avaliado por meio de método adaptado de Decker e Welch (1990) em um comprimento de onda de 562 nm (Bio Tek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). As amostras foram adicionadas a uma solução reagente de cloreto de ferro II (tetrahidratado) 2mM (6,0 µL) e incubados por um minuto à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período foi adicionado ferrozina 5,0 mM (12,0 µL) e as soluções foram incubadas a 37°C por 10

minutos. De forma semelhante, uma curva padrão foi delineada utilizando o EDTA dissódico como padrão (0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 µg/mL). Os resultados foram expressos de acordo com a equação 4.

$$Quelação\ de\ Ferro\ (\%) = \left[1 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{branco}}\right)\right] x\ 100 \quad (4)$$

4.5.6 Poder Redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com o método descrito por Wang e colaboradores (2008). As amostras (200,0 µL) foram incubadas com 100 µL de ferricianeto de potássio (1,0%) em banho-maria a 50°C por 20 min. A reação foi finalizada com a adição de 180 µL de ácido tricloroacético (10%) e posteriormente homogeneizada com 20 µL de cloreto férrico (0,1%) e 1,5 mL de tampão fosfato 200mM pH 6,6. Para o branco, foi utilizado o tampão fosfato no lugar da amostra. Foi construída uma curva padrão de ácido ascórbico nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 200, 400, 500 e 1000 µg/mL. A absorbância foi mensurada a 700 nm (Bio Tek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade correspondente à massa de ácido ascórbico.

4.5.7 Sequestro de radicais hidroxila (OH^-)

Foi realizado pelo método de $FeCl_2/H_2O_2$ fundamentado em Smirnoff e Cumbes (1998). As amostras teste foram colocadas nos tubos de ensaio para um volume de 200,0 µL. Tampão fosfato foi utilizado como branco e controle. Solução reagente (600 µL) contendo salicilato de sódio, sulfato de ferro hepta-hidratado e EDTA dissolvidos em tampão fosfato 150 mM pH 7,4 foi adicionada em todos os tubos, além de solução de peróxido de hidrogênio 30% (200 µL). Para o branco, tampão fosfato (200,0 µL). Após agitação os tubos foram incubados durante uma hora no banho maria a 37°C. As análises foram realizadas em triplicata. A absorbância foi mensurada em 510 nm (Bio Tek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA) e o percentual de sequestro de radicais hidroxila foi utilizado para expressar os resultados de acordo com a equação:

$$\%\ inibição = \frac{Abs\ controle - Abs\ amostra}{Abs\ controle - Abs\ branco} \quad (5)$$

4.6 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS

O ensaio foi proposto por Schmidt e Ortega (1983), com adaptações. O método é fundamentado na complexação de flavonoides com o cloreto de alumínio. As amostras foram adicionadas, juntamente com uma solução de cloreto de alumínio, aos tubos de ensaio e a leitura da absorbância foi feita a 425 nm. De forma semelhante, uma curva padrão foi delineada utilizando quercetina como padrão (5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 µg/mL). Os resultados foram expressos como µg EQ / mg de amostra ou µg EQ / µg de amostra.

4.7 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Inicialmente foi realizado um pré-estudo de formulação para analisar as matérias primas viáveis para a obtenção das formulações (Tabela 1), onde diferentes emolientes de cadeias variáveis foram testados como fase oleosa, bem como, diferentes combinações de sistemas tensoativos e agentes estabilizantes.

Tabela 1. Composição das nanoemulsões delineadas obtidas por baixa energia.

Formulação (%)	F1	F1.2	F1.3	F2	F3	F3.2	F4	F4.2	F5	F5.2	F6	F7
Oleato de Etila	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Isostearil Isostearato	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-	-
Diisopropyl Sebacate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
Decil Isostearato (e) Isostearil Isostearato	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	-	-
Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Polisorbato 80	6,2	6,2	6,2	10	10	10	10	10	6,2	6,2	10	10
Oleato de sorbitano	3,8	3,8	3,8	-	-	-	-	-	3,8	3,8	-	-
Goma Xantana	-	0,50	0,25	-	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	-
Água purificada	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100

Fonte: Autoria Própria

Para a obtenção das formulações, o tensoativo foi previamente homogeneizado à fase oleosa por agitação magnética (800 RPM por 30 min) em temperatura ambiente. Em seguida, a fase oleosa com o tensoativo foi gotejada, sob um fluxo de 2 mL/min, sobre a fase aquosa (água purificada) sob agitação magnética (800 RPM). Por fim, a formulação foi mantida sob agitação magnética durante 20 minutos.

A partir dos resultados encontrados, foi realizado um planejamento composto central 2^2 + ponto central (PC) + 2 pontos axiais para determinar a influência da concentração da fase oleosa e do tensoativo no tamanho de gotícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta das formulações e determinação de sua composição para a futura incorporação do extrato de *P. cincinnata* (0,1%). A tabela 2 mostra o código de níveis utilizado para o planejamento composto central e a tabela 3 mostra a composição das nanoemulsões delineadas pelo mesmo.

Tabela 2- Planejamento composto central para o desenvolvimento das formulações.

Fatores	**Código de níveis**				
	-a	**-1**	**0**	**+1**	**+a**
Emoliente (%)	2,93	5,0	10,0	15,0	17,07
Tensoativo (%)	2,93	5,0	10,0	15,0	17,07

Tabela 3- Composição das nanoemulsões delineadas pelo composto central para a incorporação do extrato aquoso de *P. cincinnata.*

Ordem das formulações	**Oleato de etila OU Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (%)**	**Polisorbato 80 (%)**
2	5,00	15,00
6	17,07	10,00
9 (C)	10,00	10,00
8	10,00	17,07
1	5,00	5,00
5	2,93	10,00
11 (C)	10,00	10,00
10 (C)	10,00	10,00
7	10,00	2,93
3	15,00	5,00
4	15,00	15,00

Fonte: Autoria Própria

4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

4.8.1 Análise macroscópica das formulações

A análise macroscópica foi realizada após 24 horas do preparo das formulações, observando as características organolépticas e a homogeneidade das formulações (FERRARI; DA ROCHA-FILHO, 2011).

4.8.2 Teste de centrifugação

No teste de centrifugação, as amostras foram submetidas a 171,36 g, durante trinta minutos à temperatura ambiente, após 24 horas (Anvisa, 2005). Em seguida, as formulações foram analisadas e classificadas em "sem alteração" (N), "levemente modificada" (LM), "modificada" (M) e "intensamente modificada" (IM). As formulações consideradas estáveis foram submetidas aos estudos de estabilidade preliminar.

4.8.3 Estudo de estabilidade preliminar

Para a avaliação da estabilidade, a formulação delineada foi aditivada com 0,1% do extrato de *P. cincinnata.* O extrato foi homogeneizado na fase aquosa e as formulações foram obtidas pelo método já padronizado.

O estudo de estabilidade preliminar consistiu no armazenamento das amostras em câmara climática a 45±5ºC, durante 5 dias, utilizando como parâmetros de análise o tamanho de gotículas, PDI, potencial zeta (DE AZEVEDO RIBEIRO et al., 2015).

4.8.3.1 Determinação do Tamanho de Gotícula e Índice de Polidispersividade

As determinações foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico *(Dynamic Light Scattering – DLS)* (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, United Kingdom) em 25°C utilizando amostras previamente diluídas (1:200) com água purificada.

4.8.3.2 Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado por *Phase Analysis Light Scattering (PALS)* (Malvern, Malvern Zetasizer Nano ZS,Worcestershire, United Kingdom) em 25°C, utilizando amostras previamente diluídas com água purificada (1:200).

4.8.4 Estudo de estabilidade acelerada

As amostras foram obtidas em três lotes diferentes, acondicionadas em tubos cônicos e submetidas a três temperaturas diferentes, sendo a 4ºC, 25ºC e 45ºC. Uma alíquota foi retirada de cada lote em três tempos diferentes, sendo após 24h de preparo

(T0), em 30 (T30) e 60 (T60) dias e, como parâmetros de análise o tamanho de gotículas, PDI, potencial zeta.

4.8.5 Análise estatística

O planejamento composto central foi executado no *software Statistica 16,* enquanto para a análise estatística das formulações foi utilizado o programa Graphpad Prism 10. Para o estudo de estabilidade preliminar, foi realizado o teste *t de student*, enquanto para a avaliação da estabilidade acelerada, foi utilizada a Anova e o pós teste de Tukey.

5 REFERÊNCIAS

ABD-ELGAWAD, A. M. et al. Influence of Season and Habitat on the Essential Oils Composition, Allelopathy, and Antioxidant Activities of Artemisia monosperma Delile. **Separations**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. BrasíliaEditora Anvisa, , 2005.

AHMAD, U. et al. Strategies in Development and Delivery of Nanotechnology Based Cosmetic Products. **Drug Research**, v. 68, n. 10, p. 545–552, 26 mar. 2018.

AJAYI, S. A. et al. Sustainable Sourcing of Organic Skincare Ingredients: A Critical Analysis of Ethical Concerns and Environmental Implications. **Asian Journal of Advanced Research and Reports**, v. 18, n. 1, p. 65–91, 11 jan. 2024.

ALGAHTANI, M. S.; AHMAD, M. Z.; AHMAD, J. Investigation of Factors Influencing Formation of Nanoemulsion by Spontaneous Emulsification: Impact on Droplet Size, Polydispersity Index, and Stability. **Bioengineering**, v. 9, n. 8, 1 ago. 2022.

ALI, A. et al. Nanoemulsion: An Advanced Vehicle for Efficient Drug Delivery. **Drug Research Georg Thieme Verlag**, 1 nov. 2017.

AMBERG, N.; FOGARASSY, C. Green consumer behavior in the cosmetics market. **Resources**, v. 8, n. 3, 1 set. 2019.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1–2, p. 142–147, 30 jul. 2009.

AOUSSAR, N. et al. Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of Pseudevernia furfuracea, Evernia prunastri and Ramalina farinacea from Morocco. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2020.

AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. **Applied Spectroscopy Reviews Bellwether Publishing**, Ltd., 15 fev. 2015.

BARBULOVA, A.; COLUCCI, G.; APONE, F. New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. **Cosmetics MDPI AG**, 1 jun. 2015.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, maio 2012.

BERNACCI, L. C. ; N. T. S. ; M. A. C. ; M.-A. M. A. ; D. C. I. C. A. C. **Passiflora cincinnata Mast. Flora e Funga do Brasil**. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12518>. Acesso em: 25 jul. 2024.

BOUWSTRA, J. A. et al. The skin barrier: An extraordinary interface with an exceptional lipid organization. **Progress in Lipid Research Elsevier Ltd**, 1 nov. 2023.

BYNG, J. W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV**. Botanical Journal of the Linnean Society,** 2016.

CAMPBELL, J. L.; LE BLANC, J. C. Y. Using high-resolution quadrupole TOF technology in DMPK analyses. **Bioanalysis**, mar. 2012.

CAO, Y. et al. Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja. **Forests**, v. 10, n. 8, 2019.

CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora**, 1997.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O ESTADO DA ARTE DA CROMATOGRAFIA ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS TÓXICOS EM ALIMENTOS. **Quim. Nova**, 2008.

COELHO, M. DO S. E. et al. Cytogenetic characterization of the Passiflora edulis Sims × Passiflora cincinnata Mast. interspecific hybrid and its parents. **Euphytica**, v. 210, n. 1, p. 93–104, 1 jul. 2016.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, 4 set. 2014.

CROTTI, A. E. M. et al. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR "ELECTROSPRAY": PROCESSOS QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE ÍONS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS DE BAIXO PESO MOLECULAR. **Quim. Nova**, 2006.

DAS, B. et al. Mitigation Strategies of Emerging Pollutants from Cosmetic Industry Effluent: A Review. **European Journal of Theoretical and Applied Sciences**, v. 2, n. 3, p. 886–899, 1 maio 2024.

DE AZEVEDO RIBEIRO, R. C. et al. Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing Opuntia ficus-indica (L.) Mill extract as moisturizing agent. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2492–2509, 1 fev. 2015.

DE B M TROVÃO, D. M. et al. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga . **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.11, n.3, p.307–311, 2007.

DE LIMA CHERUBIM, D. J. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2020.

DEMARQUE, D. P. et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

DURAZZO, A. et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research** John Wiley and Sons Ltd, 1 set. 2019.

ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: From analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports Royal Society of Chemistry**, 2014.

FARAGE, M. A. et al. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. **International Journal of Cosmetic Science**, abr. 2008.

FARID, N.; BASHIR, A.; ALI, K. Mass Spectrometry for Comprehensive Analysis of Metabolites. **Pakistan Journal of Medical and Health Sciences**, v. 16, n. 6, p. 2–5, 22 jun. 2022.

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

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. Passifloraceae. Em: **Flowering Plants · Eudicots**. Springer Berlin Heidelberg, p. 270–281, 2007.

FIDELES BRAGA, M. et al. **Plantas Para o Futuro-região Centro-oeste Passiflora spp. Maracujá-do-cerrado**. 2016.

FRANCA, C. C. V.; UENO, H. M. Green cosmetics: Perspectives and challenges in the context of green chemistry. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 53, p. 133–150, 1 jun. 2020.

GADIOLI, I. L. et al. A systematic review on phenolic compounds in Passiflora plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007

GOMES, A. F. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of Lippia alba. **Food Chemistry**, v. 273, p. 186–193, 1 fev. 2019.

GUEDES DA SILVA ALMEIDA, J. R. et al. Flavonoids from Passiflora cincinnata (Passifloraceae): HPLC-DAD-MSn characterization, validation of an HPLC-DAD method for quantification and CPC isolation. **Phytochemistry Letters**, v. 62, p. 84–91, 1 ago. 2024.

GÜLÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, mar. 2012.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology** Springer, , 1 mar. 2020.

KADDURAH, H. et al. The Impact of Sunlight on Skin Aging. **Current Geriatrics Reports** Springer New York LLC, , 1 dez. 2018.

KAUSHAL, L.; ALKA, K. Effect of Seasonal Variations on the Phytochemical Composition and antioxidant Activity of the Root Extract of Thalictrum foliolosum. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 80, n. 1, jun. 2023.

KIM, Y. A. et al. Anti-inflammatory and skin-moisturizing effects of a flavonoid glycoside extracted from the aquatic plant nymphoides indica in human keratinocytes. **Molecules**, v. 23, n. 9, 13 set. 2018.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122–128, 2015.

LEPHART, E. D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews** Elsevier Ireland Ltd, , 1 nov. 2016.

LIMBERT, G. et al. Biotribology of the ageing skin—Why we should care. **Biotribology** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2019.

LIMBU, Y. B.; AHAMED, A. F. M. J. What Influences Green Cosmetics Purchase Intention and Behavior? A Systematic Review and Future Research Agenda. **Sustainability (Switzerland)** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2023.

MAHAR, R. et al. Assessment of Tissue Specific Distribution and Seasonal Variation of Alkaloids in Alstonia scholaris. **Metabolites**, v. 12, n. 7, 1 jul. 2022.

MALODE, MRS. G. P. et al. A CRITICAL REVIEW ON NANOEMULSION: ADVANTAGES, TECHNIQUES AND CHARACTERIZATION. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p. 6–12, 8 jan. 2022.

MARKOVIĆ, Z. Study of the mechanisms of antioxidative action of different antioxidants. **Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics / Special Edition**, 2016.

MARTINS, T. E. A. et al. Contribution of topical antioxidants to maintain healthy skin—A review. **Scientia Pharmaceutica** MDPI AG, , 2020.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. **Journal of Dermatological Science**, maio 2010.

MCMULLEN, R. L.; DELL'ACQUA, G. History of Natural Ingredients in Cosmetics. **Cosmetics** MDPI, 1 jun. 2023.

NGUYEN, T. T. H. et al. Greenwash and green purchase intention: The mediating role of green skepticism. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 9, 1 maio 2019.

NHANI, G. B. B. et al. High-Tech Sustainable Beauty: Exploring Nanotechnology for the Development of Cosmetics Using Plant and Animal By-Products. **Cosmetics**, v. 11, n. 4, p. 112, 6 jul. 2024.

NIKOLOVA, K. et al. Chemical Compositions, Pharmacological Properties and Medicinal Effects of Genus Passiflora L.: A Review. **Plants** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jan. 2024.

NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, v. 17, n. 9, p. 905–908, 1 set. 2020.

OLIVEIRA, J. S. et al. As passifloras diversidade e importância econômica. 2019.

ORESAJO, C. et al. Antioxidants and the skin: Understanding formulation and efficacy. **Dermatologic Therapy**, Vol. 25, p. 252–259, 2012.

PAIVA, I. DE A. M.; SANTOS, S. C. L. O maracujazeiro-do-mato (Passiflora Cincinnata mast.) e sua importância econômica: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 18 jun. 2021.

PAVONI, L. et al. Properties and stability of nanoemulsions: How relevant is the type of surfactant? **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, 1 ago. 2020.

PETRUZZI, D. Size of the anti-aging market worldwide from 2021 to 2027. **Statista**, 2024. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/509679/value-of-the-global-anti-aging-market/>

PILON, A. C. et al. Molecular networks: An analysis on annotations and discovery of new assets. **Quimica Nova**, v. 44, n. 9, p. 1168–1179, 2021.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry** Elsevier Masson SAS, , 21 abr. 2015.

POUILLOT, A. et al. The stratum corneum: a double paradox**. Journal of Cosmetic Dermatology**, 2008.

POUILLOT, A. et al. Natural Antioxidants and their Effects on the Skin. **In Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products** (eds N. Dayan and L. Kromidas), 2011.

PRINSLOO, G.; NOGEMANE, N. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. **Phytochemistry Reviews** Springer Netherlands, , 1 ago. 2018.

RIBEIRO, D. A. et al. Influence of seasonal variation on phenolic content and in vitro antioxidant activity of Secondatia floribunda A. DC. (Apocynaceae). **Food Chemistry**, v. 315, 15 jun. 2020.

NUNES, T S.; PAGANUCCI DE QUEIROZ, L. Flora da Bahia: PassiFloraceae**. Sitientibus Série Ciências Biológicas**, 2006.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1219–1232, 2012.

SALEM, M. A. et al. Using an UPLC/MS-based untargeted metabolomics approach for assessing the antioxidant capacity and anti-aging potential of selected herbs. **RSC Advances**, v. 10, n. 52, p. 31511–31524, 26 ago. 2020.

SAMANTA, S. Impacts of Chemical Beauty. **Indian Journal of Physiology and Allied Sciences**, v. 73, 2021.

SATYAVARAPU, E. M.; SINHA, P. K.; MANDAL, C. Influence of Geographical and Seasonal Variations on Carbazole Alkaloids Distribution in Murraya koenigii: Deciding

Factor of Its in Vitro and in Vivo Efficacies against Cancer Cells. **BioMed Research International**, 2020.

SHI, Y. S. et al. Seasonal variation influences flavonoid biosynthesis path and content, and antioxidant activity of metabolites in Tetrastigma hemsleyanum Diels & Gilg. **PLoS ONE**, v. 17, n. 4 April, 1 abr. 2022.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release** Elsevier B.V., , 28 abr. 2017.

SNEHA, K.; KUMAR, A. Nanoemulsions: Techniques for the preparation and the recent advances in their food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2022.

STATISTA RESEARCH DEPARTAMENT. Revenue of the natural cosmetics market worldwide from 2015 to 2028. **Statista**, 2023. Disponível em <https://www.statista.com/forecasts/1264932/worldwide-revenue-natural-organic-cosmetics-market>

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 71–77, 2014.

SUFFREDINI, I. B. et al. Multivariate Analysis of the Terpene Composition of Osteophloeum platyspermum Warb. (Myristicaceae) and Its Relationship to Seasonal Variation Over a Two-Year Period. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 19, n. 6, p. 1380–1393, 17 ago. 2016.

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

TONČIĆ, R. J. et al. Skin barrier and dry skin in the mature patient. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 109–115, 1 mar. 2018.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. **Environmental Chemistry Letters**, ago. 2006.

WANDERLEY, M. DAS G. L. et al. **Flora fanerogâmica do Estado São Paulo. Volume 3**. Editora Hucitec, 2003.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**Nature Publishing Group, , 8 set. 2016.

WANG, X.; WU, J. **Modulating effect of fatty acids and sterols on skin aging**. **Journal of Functional Foods**Elsevier Ltd, , 1 jun. 2019.

WOSCH, L. et al. Comparative study of Passiflora taxa leaves: Ii. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 40–49, 1 jan. 2017.

YANG, L. J.; KNOLL, J.; KUNDU, R. V. Consumer attitudes toward aging skin during the COVID-19 pandemic. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 9, n. 3, p. E095, 14 jul. 2023.

YIN, Y. et al. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, n. 2, p. 89–99, 1 jun. 2013.

ZERMIANI, T. et al. Seasonal variation of gastroprotective terpenoids in Maytenus robusta (Celastraceae) quantified by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 71, n. 11–12, p. 369–373, 1 nov. 2016.

ZILLICH, O. V. et al. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, 1 out. 2015.

ZUCCO, A.; SOUSA, F. S. DE; ROMEIRO, M. DO C. Cosméticos naturais: uma opção de inovação sustentável nas empresas. **Brazilian Journal of Business**, v. 2, n. 3, p. 2684–2701, 2020.

CAPÍTULO I

Eco-friendly pro-age cosmetic using green extraction of *Passiflora cincinnata*

Eco-friendly pro-age cosmetic using green extraction of *Passiflora cincinnata*

Catarina S. Guimarães[a;*], *Paulinne M. Lima*[a], *Maria Clara B. Sousa*[a], *Caio C. Araújo*[a], *Vinícius R. S. Carmo*[a], *Laryana G. Borges*[a], *Denise B. Silva*[b], *Mateus F. Leite*[c], *Gabriel A. B. Damasceno*[a], *Juliano G. Amaral*[a;*].

AUTHOR ADDRESS: [a]Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45029094, Brazil. [b]College of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Costa e Silva Av., Campo Grande/Mato Grosso do Sul, 79002970, Brazil. [c]College of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., Alfenas/Minas Gerais, 37130001, Brazil.

*Corresponding authors: catarinasguimaraes@hotmail.com,

*juliano.amaral@ufba.br.

KEYWORDS: *Passiflora*; antioxidant activity; seasonality; flavonoids; cosmetics.

ABSTRACT: Green cosmetics using native species promote sustainability both through species preservation and by generating value for local communities, a movement increasingly appreciated by consumers. An example of a native Brazilian species is *Passiflora cincinnata*, which is rich in phenolic compounds and resilient to the Caatinga, an extremely hostile Brazilian biome. In this study, using mass spectrometry and molecular networking, to determine the chemical composition

of the species and investigate the influence of the dry and rainy seasons on its antioxidant activity through multivariate analyses. The chemical information supported the development of a nanoemulsion formulation using a spontaneous emulsification method. For this development, a 2^2 + 2 axial points central composite design of experiments was applied. The chemical profile of *P. cincinnata* demonstrated an abundance of flavonoids. The metabolite intensities were not influenced by the different seasons. High antioxidant activity was shown, which was also unaffected by seasonality. Nanoemulsions presented droplet sizes between 95 and 170 nm, zeta potential between -19mV e -38mV and PDI between 0.11 and 0.47 and were considered stable after the stability studies. Finally, it was possible to develop a potential new pro-aging cosmetic using green extract from a native species, highlighting Brazilian natural resources.

INTRODUCTION

The global beauty market has grown exponentially over the years, and along with this growth there is a recent concern on the part of consumers regarding consumption habits and their consequences on the environment. This shift in consumption habits has led to the reevaluation and abandonment of harmful practices, resulting in the redirection of investments toward scientific research focused on adopting more efficient production processes aligned with the use of natural, organic, and locally sourced ingredients.[1]

Thus, green cosmetics represent a branch of the Green Chemistry movement, an approach aimed at eliminating or minimizing the impact of potentially harmful synthetic chemicals on nature through sustainable production and the use of natural raw materials, considering the entire product life cycle.[2] These cosmetics are primarily developed using active ingredients derived from plant species, obtained through sustainable processes, with a preference for locally sourced ingredients to reduce the environmental impact of transportation.[3,4]

Waste reduction concepts can be applied within the framework of a circular economy, where residues that would otherwise be discarded and wasted are repurposed and transformed into valuable resources.[5] An example is the solid shampoo developed by Brito et al.,[6] which utilizes mango peel extracts as its active ingredient. This work exemplifies sustainable formulation by repurposing agricultural waste into a by-product and promoting water savings and the elimination of plastic packaging through the choice of a solid cosmetic form. Another study aligned with the principles of green cosmetics is that of Tafuro et al.,[7] in which three conventional cosmetic formulations were reformulated by replacing environmentally harmful components with natural and eco-friendly raw materials.

Similarly, the study by Damasco et al.[8] demonstrated that certified açaí harvesting areas harbor 50% more tree specimens compared to non-certified areas. This confirms that sustainable forest management can be aligned with industry practices, ensuring the protection of native species and the preservation of the ecosystem. Another example of an Amazonian native plant used as a cosmetic active is cocoa. Garcia et al.[9] developed microemulsions and emulgels containing cocoa seed extract for application in skincare products.

In this context, *Passiflora cincinnata* is a native Brazilian species of the genus *Passiflora*, popularly known as “wild passion fruit” and “Caatinga passion fruit”, present in the Cerrado, Caatinga, Atlantic Forest and Amazon biomes.[10] The chemical composition of the species is primarily made up of phenolic compounds, including flavonoids, which attract the interest of cosmetology as potential antioxidant agents.[11] The chemical structure of this class allows the transfer of hydrogen atoms, neutralizing free radicals and preventing the oxidation of fatty acids.[12,13]

Despite its potential, the species *P. cincinnata* remains underexplored by the cosmetic industry. Only two works have been identified using the leaf extract of *P. cincinnata* as a raw material for sunscreen formulations[14,15] and no work was found on the aqueous extract of *P. cincinnata* leaves and its cosmetic application. These few existing products highlight the importance of further research on this species, both to validate new potential activities for cosmetic applications and to enhance its visibility.

Among the challenges of working with plant extracts are their phytochemical characterization, which is not always known, and the fact that they can change their chemical constitution due to the influence of seasonality, circadian rhythm, development, temperature, and water availability.[16,17] Seasonal variation is a factor that must be considered when collecting the plant. Understanding the variation of secondary metabolites in plant extracts will assist the formulator in choosing the best time for harvest, according to the biological activity intended in the product development, ensuring that the raw material has desirable concentrations of active principles. This understanding is highly beneficial for the industry because, with proper planning, it is possible to avoid waste and optimize production.

The cosmetic industry has been working to develop vehicles capable of overcoming the barrier posed by the stratum corneum and effectively distributing cosmetic actives in the skin,[18,19] as there is currently a growing concern among the population regarding skin health and aging, leading to an increased demand for skincare products. Nanoemulsion systems have the potential to enhance the absorption of active ingredients, delivering them in a controlled manner.[20]

Nanoemulsions are effective as delivery systems, due to their large surface area, which grants them optical clarity and physical stability against phenomena such as gravitational

separation and droplet aggregate on. They exhibit kinetic stability, with droplet sizes ranging from 20 to 200 nanometers.[21,22]

The design of nanoemulsion systems can be influenced by variations in metabolites. One example is saponins, a metabolic class that reduces the system's interfacial tension by acting as a surfactant. Consequently, fluctuations in the concentration of these metabolites can impact the nanoemulsion system, thereby altering its properties.[23]

This work aimed to develop, characterize, and evaluate a new cosmetic raw material from *Passiflora cincinnata*, as well as to study seasonal variation for greater use of metabolites, and their incorporation into nanometric systems with moisturizing, anti-aging, and photoprotective potential.

EXPERIMENTAL SECTION

Plant material and preparation of extracts

A population of *P. cincinnata* was identified and demarcated in Vitória da Conquista – Bahia (14º 52’ 57” S, 40º 47’ 53” W). Three different individuals, designated A, B, and C were selected for the seasonal study. Leaves from each individual were collected monthly over one year (May 2021 to April 2022) and stored in labeled paper bags indicating the individual's code and collection date. The samples were dried at 40 °C for 72 hours in an oven (SSD - 180 L, SolidSteel) and stored at -20 °C in a freezer (FE26, Eletrolux) until processing for analysis.

To obtain the extracts, the leaves were crushed in a knife mill and then subjected to sieving (180/80 μm) for particle size standardization. Extracts corresponding to the pool of individuals A, B and C of each month were prepared, resulting in 12 extracts.

For UFLC-DAD-MS analysis, 10 mg of each sample was suspended in 1.5 mL of ultrapure water, vortex stirred for 10 seconds, subjected to ultrasound for 15 minutes, and then centrifuged for 10 minutes at 3000 RPM. Subsequently, the supernatant of the extracts was filtered using a 0.45 µm syringe filter. A solid-phase extraction (SPE) was performed on all extracts using a 1 mL Discovery Tubo SPE DSC-18 cartridge. The cartridge was conditioned with 3 mL of methanol, followed by 3 mL of ultrapure water. Then, a 1 mL aliquot of the extract was applied, followed by 1 mL of distilled water, and finally, 500 µL of methanol, a fraction that was collected and dried in an oven.

For the analysis of antioxidant activity and total flavonoid content, 100 mg of the samples were suspended in 15 mL of ultrapure water and then subjected to vortex stirred for 10 seconds, ultrasound for 15 minutes, centrifugation for 10 minutes at 3000 RPM, and finally filtered using filter paper. The extract used in the formulations was prepared with 0.67% leaves and 99.33% distilled water, following the same parameters described.

UFLC-DAD-MS/MS analysis

A Shimadzu UFLC chromatograph (Tokyo, Japan) was used for the analyses. This system was also coupled with a high-resolution MicrOTOF-Q III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), featuring electrospray ionization (ESI) and a quadrupole time-of-flight analyzer.

All samples were dissolved in methanol and ultrapure water in a 7:3 (v/v) ratio using 0.6 mL and filtered through syringe filters (0.22 µm, PTFE, Millipore®, Billerica, MA, USA). A volume of 2 µL of each sample was injected into the chromatographic system. A detailed description of the methodology can be found in the supporting information.

Feature Based Molecular networking

The raw data obtained by UFLC-DAD-MS/MS were imported into the MZmine program[24] for the preprocessing step. The molecular networks were created in Feature Based Molecular Networking mode[25] and imported into the Cytoscape 3.10.1 software.[26] A detailed description of the methodology can be found in the supporting information.

Multivariate statistical analysis

The raw data from the 12 extracts obtained by UFLC-DAD-MS/MS were exported to Microsoft Excel and then imported into MetaboAnalyst 6.0.[27] The samples were normalized by sum, and the data were scaled using the Pareto method. From this, the scores plot and biplot of the principal component analysis (PCA) were obtained, along with a heatmap for better visualization of the results.

***In vitro* antioxidant potential**

The extracts from the monthly collections were evaluated for their in vitro antioxidant capacity using different methodologies to identify the steps of the oxidative cascade in which they could act as an antioxidant agent. Except for the DPPH radical scavenging test, in which the extract was diluted to 200 µg/mL because at higher concentrations the extracts reached a plateau, making result comparisons unfeasible, all tests were conducted with the extracts at a concentration of 1.6 mg/mL. The antioxidant activity was evaluated by the following tests: Total Antioxidant Capacity (TAC); scavenging capacity of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical; reduced power; chelation of copper (Cu^{2+}) and iron (Fe^{2+}) ions; scavenging capacity of superoxide radicals (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH^-), whose methodologies are described in the supporting information.[28]

Total flavonoid content

The total flavonoid content was determined according to the method established by Schmidt and Ortega,[29] with a detailed description of the methodology available in the supporting information.

Nanoemulsion formulation

Initially, a pre-formulation study was conducted to analyze the viable raw materials for obtaining the formulations. Based on this, a statistical $2^2 + 2$ axial points central composite design of experiments was performed, with triplicates at the central point, to determine the influence of the concentration of the oil phase and the surfactant on the droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of the formulations (Table 1), as well as to determine their compositions for the incorporation of the *P. cincinnata* extract.

Table 1. Composition of nanoemulsions outlined by factorial design for the incorporation of the aqueous extract of *P. cincinnata*.

Standard Run	Ethyl oleate OR Caprylic Capric Triglyceride (%)	Polysorbate 80 (%)
2	5.00	15.00
6	17.07	10.00
9 (C)	10.00	10.00
8	10.00	17.07
1	5.00	5.00
5	2.93	10.00
11 (C)	10.00	10.00
10 (C)	10.00	10.00
7	10.00	2.93
3	15.00	5.00
4	15.00	15.00

To obtain the formulations, the surfactant was previously homogenized with the oil phase by magnetic stirring (800 RPM for 30 min) at room temperature. Then, this mixture was dripped under a flow of 2 mL/min onto the aqueous phase (purified water) under magnetic stirring (800 RPM). Finally, the formulation was kept under magnetic stirring for 20 minutes.

Macroscopic analysis

Macroscopic analysis was performed 24 hours after the preparation of the formulations, observing the organoleptic characteristics and homogeneity of the formulations.[30]

Centrifugation

In the centrifugation test, the samples were subjected to 3000 RPM for 30 minutes at room temperature, after 24 hours.[31] At the end of this stage, the formulations were analyzed and classified as "unchanged" (U), "slightly modified" (SM), "modified" (M), and "intensely modified" (IM). The stable formulations were subjected to preliminary stability studies.

Preliminary stability study

For stability evaluation, the designed formulation was supplemented with 0.1% of the *P. cincinnata* extract. The extract was homogenized in the aqueous phase, and the formulations were obtained using the already standardized method.

The preliminary stability study consisted of storing the samples in an oven at 45 ±5 ºC for five days, using droplet size, PDI, and zeta potential as analysis parameters.[32]

- Determination of Droplet Size and Polydispersity Index

Determinations were performed by dynamic light scattering (DLS) (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, United Kingdom) at 25 °C using samples previously diluted (1:200) with purified water.

- Determination of Zeta Potential

Zeta potential was determined by Phase Analysis Light Scattering (PALS) (Malvern, Malvern Zetasizer Nano ZS, Worcestershire, United Kingdom) at 25 °C, using samples previously diluted with purified water (1:200).

Accelerated stability study

The samples were obtained in three different batches, stored in conical tubes, and subjected to three different temperatures: 4 ºC, 25 ºC, and 45 ºC. An aliquot was taken from each batch at three different times: after 24 hours of preparation (T0), at 30 days (T30), and 60 days (T60), using droplet size, PDI, and zeta potential as analysis parameters.

Statistical analysis

The design of experiments was executed using Statistica 16 software, while Graphpad Prism 10 was used for statistical analysis. For the preliminary stability study, the Student's t-test was conducted, while ANOVA and Tukey's post hoc test were used for the accelerated stability evaluation.

RESULTS AND DISCUSSION

The aqueous extracts of *P. cincinnata* leaves were standardized for total flavonoid content (Table S1), ranging from 19.45 µg EQ/mg to 31.06 µg EQ/mg throughout the year. Leal et al. [33] conducted a study where the total flavonoid content of the ethanolic extract from *P. cincinnata* leaves was 1.42 µg EQ/mg; this discrepancy in the values found in the studies may be attributed to the use of different solvents in the extraction. This demonstrates the effectiveness of water as a solvent in extracting the plant's metabolites, result also found by Esmaeili et al.,[34] validating the

methodology used. In addition to this successful extraction of compounds, the use of water results in cheaper extraction and less pollution.

A combination of factors contributed to the successful extraction of the compounds, fulfilling four of the six principles that guide green extraction.[35,36] These factors included the methodology employed, as ultrasound-assisted extraction offers advantages such as reduced time and energy consumption (Principle 3);[37] the standardization of particle size, a parameter that directly influences extraction efficiency (Principle 5);[38] and the selection of water as the solvent (Principles 2 and 6).

Study of seasonal variation and antioxidant activity

Using data provided by the National Institute of Meteorology (INMET), an average of the biweekly precipitation index from January 2018 to December 2023 was calculated (Graph S1). Based on this data, the collection period was divided between the dry season (June – November) and the rainy season (December – May).

With the mass spectrometry data obtained from UFLC-DAD-MS/MS, it was possible to analyze the fragmentation profile of the ions. By comparing this data with existing literature and the compounds annotated in the GNPS spectral library, thirteen metabolites belonging to the flavonoid class were annotated (Table 2). The results indicated the presence of *O*-glycosylated, *C*-glycosylated, *C*;*O*-glycosylated, *C*-*O*-glycosylated, and *O*-*O*-glycosylated flavonoid isomers, similar to metabolites previously reported for the genus[39–41] and species.[33,42]

Among the identified substances, a significant portion exhibits characteristic fragmentation of *C*-glycosylated flavonoids (substances 1, 4, 9, 12, 20, and 21), with neutral losses of $[M-H-90]^-$ and/or $[M-H-120]^-$, corresponding to hexose-type sugars. Substances 12, 20, and 21, which correspond to isoorientin, isovitexin, and vitexin, respectively, also exhibited a fragmentation

pattern characterized by the neutral loss of water molecules $[M-H-18]^-$. Additionally, isoorientin showed a typical base peak formation at *m/z* 327, while vitexin and isovitexin produced product ions at *m/z* 341 and *m/z* 311, respectively, consistent with previously reported data for these metabolites in the literature.[41]

Table 2. List of chromatographic signals of the aqueous extract of *Passiflora cincinnata* leaves, identification and mass spectrometry data obtained by UFLC-DAD-MS/MS.

	Substances	r.t. (min)	M.F.	(ESI$^-$) HR/MS (*m/z*)	Error PPM	(ESI$^-$) MS/MS (*m/z*)	Ref
1	Luteolin-*C*-Hex-Hex	16.01	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1458	0.39	593.16; **489.10**; 429.08; 309.04.	Demarque et al., 2016
2	Luteolin-*C*-Hex-*O*-Hex	16.70	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1445	1.74	489.10; **447.09**; 429.08; 357.06; 327.05; 309.04.	CCMSLIB00004683556
3	Apigenin-*C*-Hex-*O*-Hex	18.99	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1507	0.09	503.12; 463.09; 431.10; 413.09; 353,07; **323.06.**	Demarque et al., 2016
4	Apigenin-*C*-Hex-Hex	17.83	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1504	0.41	473.11; **413.09**; 353.07; 311.06; 293.05.	CCMSLIB00000847400
5	Luteolin-*O*-Hex-Deo	19.36	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1495	1.93	503.12; 431.10; 323.05; **285.04.**	CCMSLIB00004702995
6	Saponarin	16.14	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1493	2.27	473.11; 431.10; **311.06**; 297.04.	CCMSLIB00004683868
7	Luteolin-*C*-Hex-*O*-Pen	16.97	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.1345	0.86	519.11; 459.09; 429.08; 357.06; **327.05;** 309.04.	Demarque et al., 2016
8	Apigenin-*C*-Hex-Pen	18.27	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1396	0.85	**413.08;** 311.06; 293.05.	CCMSLIB00000846353
9	Scoparin	19.97	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.1083	0.19	371.08; **341.06**; 298.06.	CCMSLIB00005770991
10	n.i.	12.56	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.1499	0.79	401.14; **269.10;** 233.07; 174.95; 161.04.	-
11	Kaempferol-3-*O*-glucoside	21.14	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0923	0.98	**284.03**; 255.03.	CCMSLIB00004683729
12	Isoorientin	16.65	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0923	0.98	429.08; 357.06; 339.05; **327.05**; 309.04; 297.04; 285.04.	CCMSLIB00005777900
13	n.i.	13.55	$C_{20}H_{36}O_{10}$	435.2240	2.25	422.14; 344.04; **260.09**; 188.11.	-
14	n.i.	17.10	$C_{20}H_{36}O_{10}$	435.2222	1.89	429.08; 389.22; 357.06; **327.05**; 309.03.	-
15	n.i.	16.52	$C_{20}H_{36}O_{10}$	435.2216	3.27	429.08; 411; 389.23; 357.06; 341.10; **327.05**; 297.04; 285; 179.	-
16	n.i.	16.09	$C_{20}H_{34}O_{10}$	433.2086	2.83	**431.10**; 311.06.	-
17	n.i.	18.35	$C_{20}H_{34}O_{10}$	433.2080	1.45	**413.09**; 311.06; 293.05.	-
18	n.i.	15.80	$C_{20}H_{34}O_{10}$	433.2063	2.48	226.16; **174.95**; 153.09.	-
19	n.i.	14.62	$C_{20}H_{34}O_{10}$	433.2058	3.63	427.19; 243.88; 179.05.	-
20	Isovitexin	18.79	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.0975	0.28	413.09; 353.06; 341.06; 323.06; **311.06**; 283.06.	CCMSLIB00004696020
21	Vitexin	18.06	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.0977	0.75	**413.09**; 341.06; 311.06; 293.05; 283.06.	Demarque et al., 2016
22	n.i.	10.02	$C_{17}H_{22}O_{12}$	417.1031	0.48	241.07; **152.01**.	-
23	n.i.	12.56	$C_{18}H_{26}O_{10}$	401.1442	1.43	**269.10**; 233.07; 161.04.	-
24	n.i.	14.31	$C_{16}H_{16}O_8$	335.0773	1.81	255.09; 234.97; 201.02; **179.04**; 161.03.	

r.t.: retention time; **Bold**: base peak; M.F.: Molecular Formula; Hex: hexose; Pen: pentose; Deo: deoxihexose; n.i: not identified.

Substance 5 ($[M-H]^-$ *m/z* 593.1495) exhibits characteristic fragmentations of *O*-glycosides containing one hexose and one deoxyhexose, with neutral losses of $[M-H-162]^-$ and $[M-H-308]^-$. Substance 11 ($[M-H]^-$ *m/z* 447.0923) displayed the neutral loss of the sugar unit $[M-H-162]^-$, which was the most abundant signal, indicating an *O*-glycosidic bond. Substance 7 ($[M-H]^-$ *m/z* 579.1345) showed fragmentations of $[M-H-60]^-$ and $[M-H-150]^-$, while substance 8 ($[M-H]^-$ *m/z* 563.1396) exhibited $[M-H-150]^-$, indicating the presence of pentose. Substances 2, 3 and 6 have as a characteristic of the *C*;*O*-glycosidic bonds the fragmentation of the sugar $[M-H-162]^-$ with relative intensity.[43,44] Substances 10, 13-19, 22-24 did not display recognizable fragmentation patterns.

The molecular network presented in Figure 1 was generated from spectral data obtained by UFLC-DAD-MS/MS in negative ionization mode. The size of the nodes corresponds to the intensity of the metabolite, with isovitexin being the most abundant, followed by Apigenin-*C*-Hex-Hex, isoorientin, Apigenin-*C*-Hex-*O*-Hex, and Apigenin-*C*-Hex-Pen. The nodes are color-coded to represent the dry season (pink) and the rainy season (green), demonstrating that all metabolites are present in both seasons and that no variation can be observed in most of them, a finding that corroborates the results obtained in the Principal Component Analysis (PCA) (Figure 2).

The first principal component explains 51.2%, and the second principal component explains 30.2% of the data variability, totaling 80.4% of the response (Figure 2-A). The PERMANOVA conducted confirms that there is no statistically significant difference in metabolite intensities between the seasons (F-value: 3.1583; R-squared: 0.24003; p-value: 0.058). The scores plot was color-coded according to the dry season (pink) and the rainy season (green), demonstrating that the dissimilarity between the groups is small, as it was not possible to completely separate the samples into two distinct groups.

Figure 1. Molecular network generated in negative ionization mode associated with the data and MS/MS of *P. cincinnata* samples (link to network at GNPS in the Supporting information).

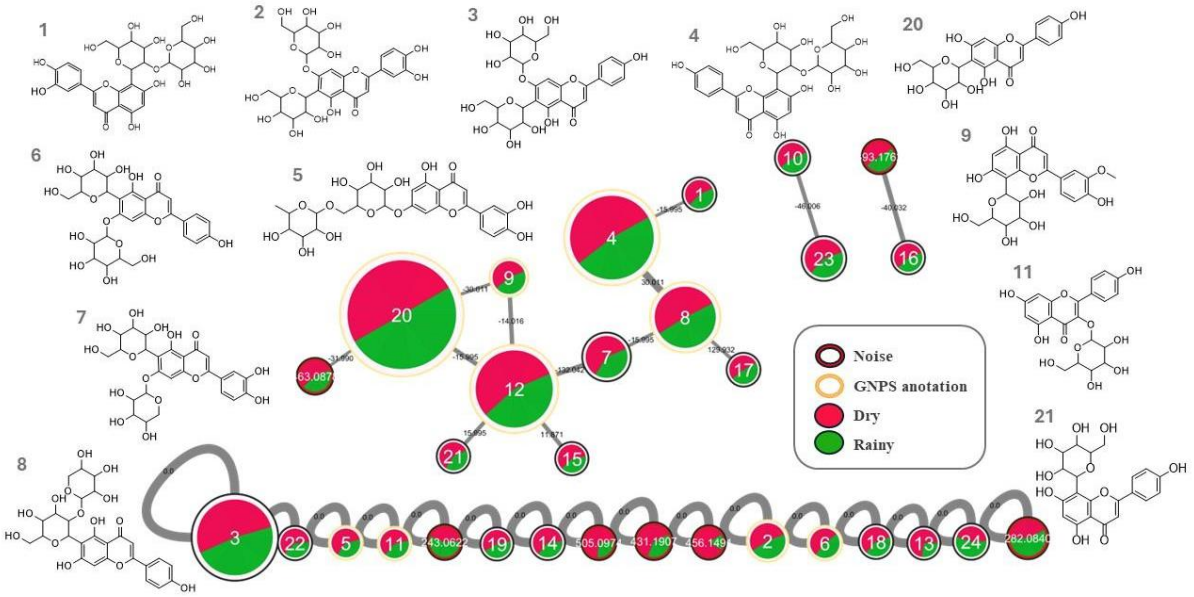
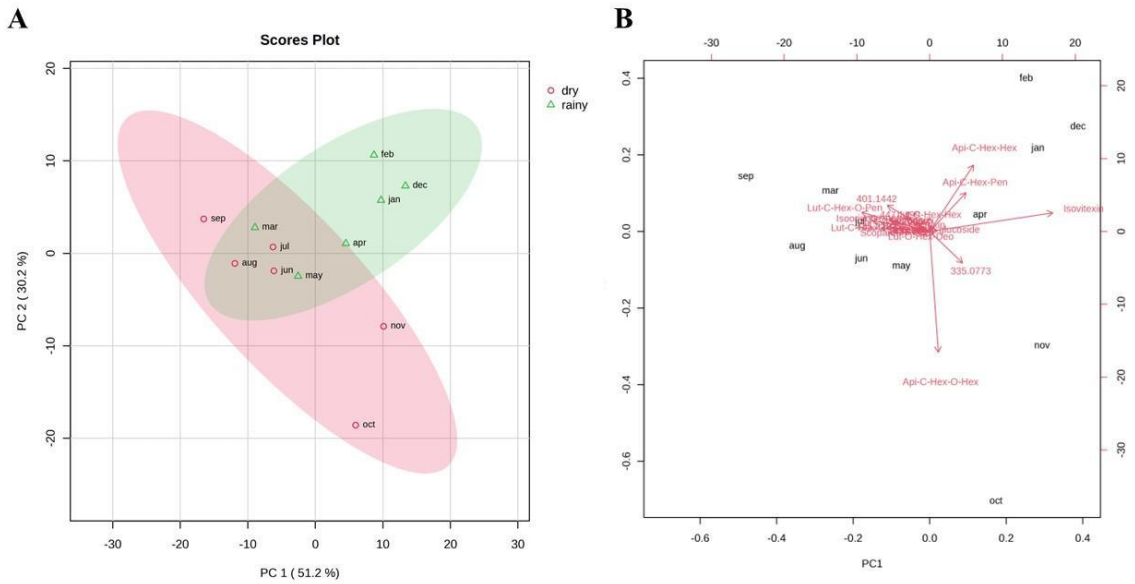
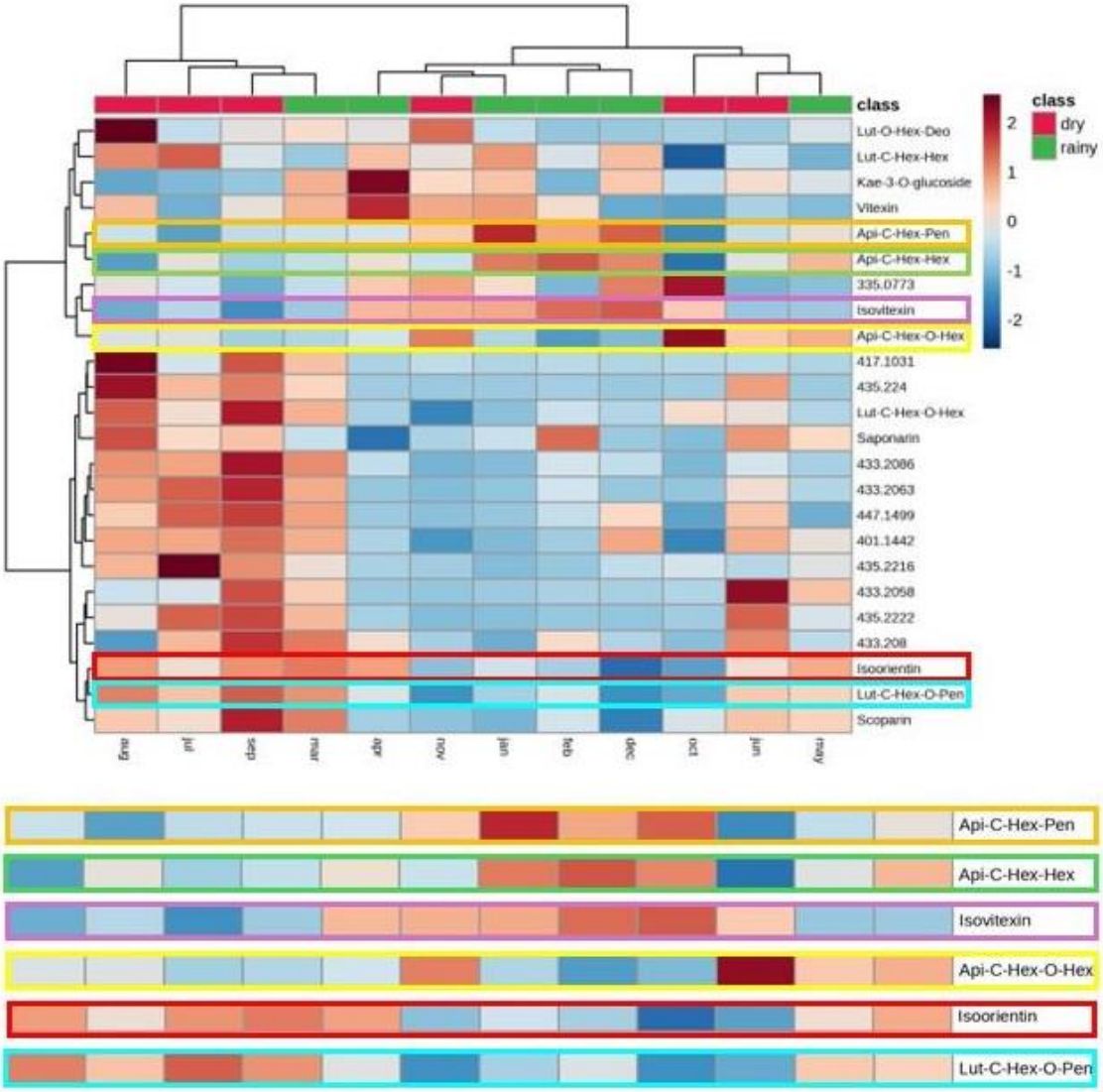


Figure 2. Principal Component Analysis of *P. cincinnata* extracts represented by the months in which they were produced. A: Scores plot. B: Biplot.



The biplot (Figure 2-B) displays the main metabolites that influence variability. The heatmap (Figure 3) allows a better visualization of how these metabolites behave throughout the year, highlighting the three metabolites that have the greatest influence on each principal component (PC1 = substances 20, 7, and 12; PC2 = substances 3, 4, and 8). From this analysis, a trend in the behavior of the aglycones can be observed: the apigenins (20, 3, 4, and 8) were grouped in the same cluster and had a higher incidence during the rainy season, while the luteolins (12 and 7) were grouped in another cluster and had a higher incidence during the dry season.

Figure 3. Heatmap showing the variation in ion intensity throughout the year.



This trend corroborates the antioxidant activity of *P. cincinnata* extracts (Table 3), which was demonstrated in all tests performed (except for the hydroxyl radical scavenging capacity, which yielded no results) and throughout the entire analysis period, showing no statistical difference between the dry and rainy seasons (p value < 0.05).

Table 3. Antioxidant activity of aqueous extracts of *Passiflora cincinnata* in different months.

Month of collection	Season	DPPH	TAC (mg/g of vitamin C)	Reduced power	Copper	Iron	Superoxide
January	Rainy	42.26%	201.74	49.31%	83.91%	68.30%	29.47%
February	Rainy	44.99%	194.04	47.71%	82.55%	55.13%	22.14%
March	Rainy	46.76%	245.41	50.46%	83.70%	64.76%	23.03%
April	Rainy	49.23%	249.77	48.85%	80.58%	69.11%	22.06%
May	Rainy	50.28%	217.38	61.01%	81.68%	53.06%	13.26%
June	Dry	44.47%	176.44	54.82%	80.35%	60.96%	7.70%
July	Dry	58.16%	133.74	50.69%	82.60%	63.30%	27.25%
August	Dry	33.52%	196.44	48.39%	83.75%	61.87%	32.10%
September	Dry	45.89%	203.02	50.46%	84.59%	67.95%	32.02%
October	Dry	47.99%	193.79	51.15%	81.97%	55.98%	29.34%
November	Dry	34.38%	219.34	44.95%	83.39%	67.51%	33.44%
December	Rainy	34.23%	164.38	40.14%	86.43%	64.00%	31.97%

Although it did not show antioxidant activity against hydroxyl radicals (•OH), the *P. cincinnata* extract exhibited high activity against copper and iron ions. These ions play a role in the formation of hydroxyl radicals by acting as catalysts in the Fenton reaction, converting hydrogen peroxide into •OH.[45] Therefore, targeting these substances consequently helps reduce the production of hydroxyl radicals.

The CAT result is expressed as activity equivalent in mg of vitamin C per gram of sample. Specifically, 1 g of the extract exhibited activity equivalent to 133.74–249.77 mg of vitamin C. Similarly, the reducing power is calculated as a percentage of activity relative to 1 g of vitamin C. Accordingly, 1 g of our sample demonstrated activity equivalent to 40.14–61.01% of 1 g of vitamin C.

Comparing the DPPH assay results with the literature, Santos et al.[46] reported 81.55% activity for the ethanolic extract of coffee pulp at a concentration of 10 mg/mL. In contrast, our results using a much lower concentration of the aqueous extract of *P. cincinnata* (200 µg/mL) ranged from 38.92–63.55%. Meanwhile, Mousa et al.[47] reported 92.90% DPPH radical scavenging activity for the ethanolic extract of green tea at a concentration of 100 µg/mL.

Tekin[48] performed extractions from pomegranate leaves using different solvents. For the iron chelation assay, the aqueous extract at 125 µg/mL showed 80% activity, which is higher than the present study's findings, where values ranged from 53.06–69.11% at a concentration of 1.6 mg/mL.

Damasceno et al.[28] evaluated the antioxidant activity of the *Prosopis juliflora* extract, which contains phenolic compounds, including flavonoids derived from luteolin and apigenin, using the same assays as in the present study. In addition to the proven antioxidant activity, Damasceno's study also demonstrated the clinical efficacy of the extract containing these metabolites, showcasing the potential use of these substances in anti-aging cosmetics.

The antioxidant power of isovitexin (substance 20), the metabolite with the highest intensity in all extracts, has been extensively discussed and demonstrated in previous studies using various methodologies. Lee and colleagues[49] assessed this activity through DPPH and hydroxyl (OH) scavenging assays. Chowjarean and colleagues[50] also showed the performance of isovitexin

in scavenging ABTS and superoxide radicals in addition to the DPPH assay. The isomer vitexin (substance 21) was evaluated for its capacity to scavenge superoxide radicals, DPPH, ABTS, and nitric oxide (NO) alongside isovitexin, reinforcing the ability of these metabolites to act as antioxidant substances.[51]

Isoorientin (substance 12) also had its antioxidant capacity evaluated through DPPH and NO radical scavenging assays, as well as the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, and it has been shown to enhance the antioxidant defense system.[52–54] Liu et al. [55] isolated isoorientin from the butanolic fraction of the *Zea mays* L. extract and conducted four antioxidant tests (TAC, DPPH, reducing power, and iron ion chelation), demonstrating the potent antioxidant activity of this compound. From this data, it can be inferred that these metabolites play a fundamental role in the antioxidant activity exhibited by the *P. cincinnata* extracts, since they belong to the class of flavonoids, which act by eliminating or inhibiting the production of reactive oxygen species, in addition to assisting endogenous antioxidant enzymes in their functions.[56]

Studies on the influence of seasonality in various plant species have been widely conducted, as the cultivation and harvesting of specific plants can be strategically planned based on the periods when they produce compounds of interest at optimal concentrations for the pharmaceutical and cosmetic industries. In the case of *Passiflora cincinnata*, the results showed no significant variation in metabolite content or antioxidant activity across different seasons. This indicates that the industry does not need to adhere to a specific collection schedule, allowing to produce the cosmetic throughout the year without compromising its mechanism of action. Furthermore, the extracts demonstrated high antioxidant activity at different stages of the oxidative cascade, providing the cosmetic industry with greater precision and reliability.

Development of formulations

The nanoemulsions were designed using composite central design. This method allows the evaluation of the influence of several factors, determining the best combinations between the concentrations of both the oil phase and the emulsifying agents. It is an advantageous option compared to the pseudo-ternary phase diagram, as it saves time and financial resources by requiring a reduced number of experiments, thereby optimizing the formulation development process.[57]

Moreover, the chosen method for obtaining the nanoemulsions was spontaneous emulsification (SE), whose main advantage is that it does not require specialized equipment, facilitating product scaling. This method relies on reducing the interfacial tension between the phases using an appropriate surfactant, predominantly hydrophilic, which envelops the oil droplets, resulting in the nanoemulsified system.[58] For the development of the nanoemulsified systems, Polysorbate 80 was selected as the surfactant, as its level of hydrophilicity favored the formation of stable nanoemulsions.

Analysis of oil and surfactant concentrations

The values obtained for the response variables from the factorial design using Ethyl Oleate and Caprylic Capric Triglyceride are shown in Table 4, while the figures containing the response surfaces can be accessed in the supporting information (Figures S1 and S2).

Table 4. Analysis of formulations obtained from factorial design.

Formulation	Droplet size (nm)	PDI	Zeta Potential
F1	106.30	0.27	-22.86
F2	97.37	0.30	-15.43
F3	102.66	0.14	-12.70
F4	107.06	0.17	-22.36
F5	195.60	0.23	-39.50
F6	291.70	0.31	-35.50
F7	115.16	0.25	-21.00
F8	101.50	0.21	-23.06
F9	98.11	0.15	-30.13
F10	127.90	0.29	-28.86
F11	112.60	0.27	-18.40
G1	168.93	0.17	-19.04
G2	24.10	0.24	-8.89
G3	569.93	0.52	-47.04
G4	261.40	0.28	-24.77
G5	679.76	0.45	-15.00
G6	251.60	0.30	-34.16
G7	131.17	0.28	-18.17
G8	138.93	0.25	-23.23
G9	172.80	0.23	-26.46
G10	323.80	0.36	-36.90
G11	171.57	0.23	-18.63

From the ANOVA analysis and Pareto diagram, it was found that Ethyl Oleate as the oil phase did not have a significant influence on the dependent variables (droplet size, PDI, and Zeta

potential). However, analyzing the response surface figure (Figure S1), it was observed that intermediate concentrations of Ethyl Oleate and Polysorbate 80, between 8% and 12%, result in suitable droplet sizes. Concentrations above 10% result in adequate PDI, while ideal values for Zeta potential are achieved at the central concentrations.

Evaluating caprylic and capric triglycerides as independent variables, the statistical analysis showed that the use of this oil phase significantly influenced the Zeta potential, while the other dependent variables were not significantly affected. The response surface figure for the caprylic and capric triglycerides (Figure S2) indicates that central concentrations of oil and surfactant result in nanoemulsions with suitable parameters.

Thus, formulations F9 and G9 (10% oil phase and 10% Polysorbate 80) were chosen to be supplemented with 0.1% of the *P. cincinnata* extract. Both formulations were fluid, with a white color and characteristic odor, and exhibited pH values of 7.14 and 7.23, respectively. No macroscopic changes were observed after 24 hours of manipulation, as well as after the centrifugation test; therefore, they proceeded to the preliminary and accelerated stability studies. Table 5 presents the results of the preliminary stability study.

Stability testing

Table 5. Preliminary stability study of formulations F9 and G9.

	Droplet size (nm)		**PDI**		**Zeta Potential**	
	T0	**Post heat stress**	**T0**	**Post heat stress**	**T0**	**Post heat stress**
F9	97.32	81.53	0.145	0.189	31.1	-31.73
G9	208.00	180.76	0.286	0.215	15.80	-27.13

The preliminary stability study occurs in the initial phase of formulation development and aims to evaluate the behavior of the formulation components in extreme temperature conditions to accelerate possible instabilities and analyze whether the physical, chemical and microbiological characteristics of the product will remain preserved over time.[31]

After five days of preliminary stability, both formulations presented adequate results for the parameters analyzed for nanoemulsified systems. Therefore, the formulations were directed to accelerated stability, being evaluated in three times and at three different temperatures (Table 6).

In formulation F9, the droplet size increased after 60 days of stability, both at the lower temperature of 4 °C and at 45 °C, while there was no significant change in size at 25 °C. This increase in size related to rising temperatures can also be observed in the studies by Barreto,[59] Wang[60] and Somala.[61] In the studies by Falleh[62] and Li,[63] an increase in size occurred with the decrease in temperature (4 °C), resulting in a similar outcome as presented in Table 6. Formulation G9 showed a significant increase in size, losing its nanoemulsion characteristic, and therefore was considered unstable. The increase in droplet size in nanoemulsions can be attributed to the Ostwald ripening phenomenon, the primary mechanism of instability in nanoemulsified systems, where droplets grow larger due to the absorption of smaller droplets, altering the stability of the system. Choosing an oil phase with low water solubility is a solution that can be used to prevent this phenomenon.[64] Despite the increase in size, formulation F9 remained within the nanoemulsion size range and showed no variation in macroscopic characteristics, remaining stable. In contrast, formulation G9 exceeded the nanoemulsion size range and was considered unstable.

The polydispersity index is a parameter that represents the variation in droplet size measured through light scattering, where values closer to zero indicate a more monodisperse system.[65] Analyzing the results for F9, the values remained low, showing an inversely proportional

increase with temperature, while a decrease in value was observed after 60 days at elevated temperatures. At room temperature (25 °C), the value observed after the stability period was 0.233, indicating a low propensity for particle aggregation. Formulation G9 stored at 45 °C showed a significant increase in PDI values, indicating a polydisperse system characterized by droplet aggregation.

Table 6. Results of the accelerated stability study of formulations F9 and G9.

	Droplet size				**PDI**				**Zeta Potencial**			
	T0	**T60_4**	**T60_25**	**T60_45**	**T0**	**T60_4**	**T60_25**	**T60_45**	**T0**	**T60_4**	**T60_25**	**T60_45**
F9	96.63 ± 3.72	151.8 ± 20.20*	95.74 ± 3.42	135.9 ± 14.69*	0.189 ± 0.04	0.2723 ± 0.10	0.2331 ± 0.05	0.1117 ± 0.01	25.38 ± 2.02	38.50 ± 5.20*	29.64 ± 3.62	30.74 ± 4.47
G9	157.2 ± 2.86	169.4 ± 8.17	160.3 ± 3.65	1587 ± 554.20*	0.2463 ± 0.02	0.2781 ± 0.08	0.2434 ± 0.08	0.4782 ± 0.33*	19.02 ± 1.89	23.99 ± 8.36	37.89 ± 3.63*	30.11 ± 6.46*

*P-value >0.05.

Zeta potential is a measure of the intensity of electrostatic repulsion or attraction between particles and is one of the main factors influencing stability. As zeta potential increases, the probability of the suspension remaining stable increases, since charged particles repel each other, preventing aggregation. Values above |30| mV are considered indicative of long-term stability in formulations.[20]

After accelerated stability testing, formulations F9 and G9 showed an increase in zeta potential values at all three evaluated temperatures. In F9, a larger increase was observed at 4°C, reaching -38.5 mV, indicating a low tendency for coalescence. The G9 samples initially had zeta potential values below -30 mV; however, significant variations were noted after storage, with the samples stored at 25 °C and 45 °C exhibiting the largest increases, reaching -37.89 mV.

Although formulation F9 showed variations in zeta potential, the characteristics of a nanoemulsion were not lost, and the combined analysis of the data allowed it to be considered stable. In contrast, formulation G9 was deemed unstable and excluded from the study.

For the future transfer of this formulation from laboratory-scale production to industrial-scale manufacturing, a scale-up to an intermediate pilot scale is necessary, enabling the adaptation of production processes to minimize industrial failures. Phenomena such as dispersion and coalescence represent challenges in the scale-up of nanoemulsions. To address these challenges, monitoring key parameters, including temperature, type, duration, and speed of agitation, as well as phase proportions, is essential to ensure the success of industrial-scale production.[66]

The results obtained with the aqueous extract of *P. cincinnata* demonstrate its significant potential as a raw material. However, additional safety and cosmetic efficacy tests are still required for this extract to become a registered cosmetic ingredient and be used in new products launched on the market.

CONCLUSION

The aqueous extracts of *Passiflora cincinnata* leaves presented *C*-glycosylated flavonoids as most of their constituents, as well as *O*-glycosylated, *C*;*O*-glycosylated, *C*-*O*-glycosylated and *O*-*O*-glycosylated flavonoids. After analyzing these extracts for one year, it was possible to determine that there was no variation in metabolites between the dry and rainy seasons. Additionally, the antioxidant activity of *P. cincinnata* was consistently observed in all stages of the oxidative chain and was not affected by seasonality, reinforcing its robustness and efficacy throughout the year.

A nanoemulsion containing aqueous extract of *P. cincinnata* was developed by a low-energy method, demonstrating its potential as an innovative active ingredient due to its antioxidant

properties and chemical composition. These findings highlight *P. cincinnata* as a promising natural bioactive for the formulation of cosmetics aimed at combating skin aging, opening new possibilities for the cosmetics industry and contributing to the valorization of Brazilian natural resources. Although further studies are needed, such as long-term stability tests and in vivo efficacy studies for the product to be ready for the market.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Detailed methodology: UFLC-DAD-MS/MS; Feature Based Molecular networking; Antioxidant assays; Total flavonoid content.

Link to GNPS molecular networking.

Table S1. Results of the standardization of *P. cincinnata* extracts regarding the total flavonoid content, expressed as µg EQ/mg of sample.

Graph S1. Monthly rainfall in Vitória da Conquista - Bahia from January/2018 to December/2023.

Figure S1. Response surface plots with Ethyl Oleate and Polysorbate 80 as independent variables. A: Zeta Potential response plot; B: Droplet size response plot; C: PDI response plot.

Figure S2. Response surface plots with Caprylic Capric Triglyceride and Polysorbate 80 as independent variables. A: Zeta Potential response plot; B: Droplet size response plot; C: PDI response plot

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Catarina S. Guimarães - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil. https://orcid.org/0009-0000-8251-8206 Email: catarinasguimaraes@hotmail.com

Juliano G. Amaral - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil. Email: juliano.amaral@ufba.br.

Authors

Paulinne M. Lima - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil.

Maria Clara B. Sousa - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil.

Caio C. Araújo - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil.

Vinícius R. S. Carmo - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil.

Laryana G. Borges - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil.

Denise B. Silva - College of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Costa e Silva Av., Campo Grande/Mato Grosso do Sul, 79002970, Brazil.

Mateus F. Leite - College of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., Alfenas/Minas Gerais, 37130001, Brazil.

Gabriel A. B. Damasceno - Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45.029-094, Brazil.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/88887.674558/2022-00). We would also like to express our sincere gratitude to Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Dr. Jacqueline Nakau and the entire staff of the NPPNS laboratory for their exceptional technical training in mass spectrometry and all their guidance and support during our research.

REFERENCES

(1) Amberg, N.; Fogarassy, C. Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. *Resources* **2019**, *8* (3). https://doi.org/10.3390/resources8030137.

(2) Ncube, A.; Mtetwa, S.; Bukhari, M.; Fiorentino, G.; Passaro, R. Circular Economy and Green Chemistry: The Need for Radical Innovative Approaches in the Design for New Products. *Energies (Basel)* **2023**, *16* (4). https://doi.org/10.3390/en16041752.

(3) Franca, C. C. V.; Ueno, H. M. Green Cosmetics: Perspectives and Challenges in the Context of Green Chemistry. *Desenvolvimento e Meio Ambiente* **2020**, *53*, 133–150. https://doi.org/10.5380/dma.v53i0.62322.

(4) Limbu, Y. B.; Ahamed, A. F. M. J. What Influences Green Cosmetics Purchase Intention and Behavior? A Systematic Review and Future Research Agenda. *Sustainability*

(Switzerland). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) August 1, 2023. https://doi.org/10.3390/su151511881.

(5) Bhole, A.; Koladia, G. C.; Koladia, S. P.; Bora, N. V.; Bora, L. V. Treatment of Waste Using Waste-Derived Materials and Free Energy: A Practical Concept of Circular-Economy. *Sustain Chem Pharm* **2024**, *37*, 101341. https://doi.org/10.1016/J.SCP.2023.101341.

(6) Brito, I.; Ferreira, S. M.; Santos, L. On the Path to Sustainable Cosmetics: Development of a Value-Added Formulation of Solid Shampoo Incorporating Mango Peel Extract. *Cosmetics* **2023**, *10* (5), 140. https://doi.org/10.3390/COSMETICS10050140/S1.

(7) Tafuro, G.; Costantini, A.; Piatto, M.; Lucchetti, S.; Francescato, S.; Busata, L.; Baratto, G.; Semenzato, A. Eco-Designing Cosmetic Products While Preserving the Sensorial-Application Properties: An Instrumental Approach toward Sustainable Formulations. *Cosmetics 2024, Vol. 11, Page 60* **2024**, *11* (2), 60. https://doi.org/10.3390/COSMETICS11020060.

(8) Damasco, G.; Anhalt, M.; Perdiz, R. O.; Wittmann, F.; de Assis, R. L.; Schöngart, J.; Piedade, M. T. F.; Bacon, C. D.; Antonelli, A.; Fine, P. V. A. Certification of Açaí Agroforestry Increases the Conservation Potential of the Amazonian Tree Flora. *Agroforestry Systems* **2022**, *96* (2), 407–416. https://doi.org/10.1007/S10457-021-00727-2/FIGURES/3.

(9) Garcia, L. B.; Pires, G. A.; Oliveira, D. A. J.; Silva, L. A. O.; Gomes, A. F.; Amaral, J. G.; Pereira, G. R.; Ruela, A. L. M. Incorporation of Glycolic Extract of Cocoa Beans (Theobroma Cacao L.) into Microemulsions and Emulgels for Skincare. *Ind Crops Prod* **2021**, *161*. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113181.

(10) Bernacci, L. C. ; N. T. S. ; M. A. C. ; M.-A. M. A. ; D. C. I. C. A. C. *Passiflora cincinnata Mast. Flora e Funga do Brasil*. https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12518 (accessed 2024-07-25).

(11) Zhou, Y.; Tang, R.-C. Natural Flavonoid-Functionalized Silk Fiber Presenting Antibacterial, Antioxidant, and UV Protection Performance. **2017**. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02513.

(12) Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd March 15, 2011, pp 288–306. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012.

(13) Marković, Z. *Study of the Mechanisms of Antioxidative Action of Different Antioxidants*; 2016; Vol. 10.

(14) Leite, M. F. C. L. S. G. L. B. FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO PARA FOTOPROTEÇÃO CONTENDO PASSIFLORA CINCINNATA. BR 102015032464-2, 2017.

(15) Oliveira-Junior, R.; Reis, S. A. G. B.; de Oliveira, A. P.; Alves Ferraz, C. A.; Rolim, L. A.; Lopes, N. P.; Rocha, J. M.; El Aouad, N.; Kritsanida, M.; da Silva Almeida, J. R. G. Photoprotective Potential of Passiflora Cincinnata Mast. (Passifloraceae) Hydro-Alcoholic Extracts. *Chem Biodivers* **2024**, *21* (11). https://doi.org/10.1002/CBDV.202401271.

(16) Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. *PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS*; 2007; Vol. 30.

(17) Prinsloo, G.; Nogemane, N. The Effects of Season and Water Availability on Chemical Composition, Secondary Metabolites and Biological Activity in Plants. *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands August 1, 2018, pp 889–902. https://doi.org/10.1007/s11101-018-9567-z.

(18) Boonme, P. Applications of Microemulsions in Cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, **2007**, *6*, 223–228.

(19) Scomoroscenco, C.; Cinteza, L. O.; Teodorescu, M.; Gifu, I. C.; Ianchis, R.; Nistor, C. L.; Petcu, C.; Ninciuleanu, C. M.; Alexandrescu, E.; Mihaescu, C. I. VEGETABLE OIL-BASED MICROEMULSIONS WITH DERMATO-COSMETIC APPLICATIONS. *Bull., Series B 82* (2), 2020.

(20) Singh, Y.; Meher, J. G.; Raval, K.; Khan, F. A.; Chaurasia, M.; Jain, N. K.; Chourasia, M. K. Nanoemulsion: Concepts, Development and Applications in Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. April 28, 2017, pp 28–49. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

(21) Tong, K.; Zhao, C.; Sun, Z.; Sun, D. Formation of Concentrated Nanoemulsion by W/O Microemulsion Dilution Method: Biodiesel, Tween 80, and Water System. **2015**. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00903.

(22) Pavoni, L.; Perinelli, D. R.; Ciacciarelli, A.; Quassinti, L.; Bramucci, M.; Miano, A.; Casettari, L.; Cespi, M.; Bonacucina, G.; Palmieri, G. F. Properties and Stability of Nanoemulsions: How Relevant Is the Type of Surfactant? *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *58*. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101772.

(23) Rajput, G.; Pandya, N.; Soni, D.; Vala, H.; Modi, J.; Rajput, G.; Pandya, N.; Soni, D.; Vala, H.; Modi, J. Interfacial Behavior of Saponin Based Surfactant for Potential Application in Cleaning. *Surfactants and Detergents - Updates and New Insights* **2022**. https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.102560.

(24) Schmid, R. , H. S. , K. A. et al. Integrative Analysis of Multimodal Mass Spectrometry Data in MZmine 3. *Nat Biotechnol* **2023**, *41*, 447–449.

(25) Nothias, L. F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protsyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; Aicheler, F.; Aksenov, A. A.; Alka, O.; Allard, P. M.; Barsch, A.; Cachet, X.; Caraballo-Rodriguez, A. M.; Da Silva, R. R.; Dang, T.; Garg, N.; Gauglitz, J. M.; Gurevich, A.; Isaac, G.; Jarmusch, A. K.; Kameník, Z.; Kang, K. Bin; Kessler, N.; Koester, I.; Korf, A.; Le Gouellec, A.; Ludwig, M.; Martin H,

C.; McCall, L. I.; McSayles, J.; Meyer, S. W.; Mohimani, H.; Morsy, M.; Moyne, O.; Neumann, S.; Neuweger, H.; Nguyen, N. H.; Nothias-Esposito, M.; Paolini, J.; Phelan, V. V.; Pluskal, T.; Quinn, R. A.; Rogers, S.; Shrestha, B.; Tripathi, A.; van der Hooft, J. J. J.; Vargas, F.; Weldon, K. C.; Witting, M.; Yang, H.; Zhang, Z.; Zubeil, F.; Kohlbacher, O.; Böcker, S.; Alexandrov, T.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment. *Nat Methods* **2020**, *17* (9), 905–908. https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6.

(26) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* **2003**, *13* (11), 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303.

(27) Pang, Z.; Lu, Y.; Zhou, G.; Hui, F.; Xu, L.; Viau, C.; Spigelman, A. F.; Macdonald, P. E.; Wishart, D. S.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 6.0: Towards a Unified Platform for Metabolomics Data Processing, Analysis and Interpretation. *Nucleic Acids Res* **2024**, *52* (W1), W398–W406. https://doi.org/10.1093/nar/gkae253.

(28) Damasceno, G. A. B.; Barreto, S. M. A. G.; Reginaldo, F. P. S.; Souto, A. L.; Negreiros, M. M. F.; Viana, R. L. S.; Pinto, T. K. B.; Daher, C. C.; Silva-Filho, J. A. A.; Moura, R. A. O.; Silva, M. A.; Silveira, W. L. L.; Medeiros, A. A.; Ostrosky, E. A.; Veríssimo, L. M.; Sassaki, G. L.; Lopes, P. S.; Sales, V. S. F.; Rocha, H. A. O.; Cavalheiro, A. J.; Giordani, R. B.; Ferrari, M. Prosopis Juliflora as a New Cosmetic Ingredient: Development and Clinical Evaluation of a Bioactive Moisturizing and Anti-Aging Innovative Solid Core. *Carbohydr Polym* **2020**, *233*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115854.

(29) Schmidt, P. C. ; G. O. G. Passionsblumenkraut: Bestimmung Des Gesamt Flavonoid Gehaltes on Passiflorae Herba. *Deutsch Apotheker Zeitung* **1993**, *47*, 17–26.

(30) Ferrari, M.; da Rocha-Filho, P. A. Multiple Emulsions Containing Amazon Oil:Açaí Oil (Euterpe Oleracea). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21* (4), 737–743. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000093.

(31) Anvisa. *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*; **2004**. www.anvisa.gov.br/portal_conhecimento/index.htmFontedeinformaçõestécnico-científicasemVigilânciaSanitária.www.anvisa.gov.br/cosmeticos/index.htm (accessed 2024-04-21).

(32) De Azevedo Ribeiro, R. C.; Barreto, S. M. A. G.; Ostrosky, E. A.; Da Rocha-Filho, P. A.; Veríssimo, L. M.; Ferrari, M. Production and Characterization of Cosmetic Nanoemulsions Containing Opuntia Ficus-Indica (L.) Mill Extract as Moisturizing Agent. *Molecules* **2015**, *20* (2), 2492–2509. https://doi.org/10.3390/molecules20022492.

(33) Leal, A. E. B. P.; de Oliveira, A. P.; Santos, R. F. dos; Soares, J. M. D.; Lavor, E. M. de; Pontes, M. C.; Lima, J. T. de; Santos, A. D. da C.; Tomaz, J. C.; Oliveira, G. G. de; Neto, F. C.; Lopes, N. P.; Rolim, L. A.; Almeida, J. R. G. da S. Determination of Phenolic

Compounds, in Vitro Antioxidant Activity and Characterization of Secondary Metabolites in Different Parts of Passiflora Cincinnata by HPLC-DAD-MS/MS Analysis. *Nat Prod Res* **2020**, *34* (7), 995–1001. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548445.

(34) Esmaeili, F.; Hashemiravan, M.; Eshaghi, M. R.; Gandomi, H. Optimization of Aqueous Extraction Conditions of Inulin from the Arctium Lappa L. Roots Using Ultrasonic Irradiation Frequency. *J Food Qual* **2021**, *2021* (1), 5520996. https://doi.org/10.1155/2021/5520996.

(35) Chemat, F.; Vian, M. A.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences 2012, Vol. 13, Pages 8615-8627* **2012**, *13* (7), 8615–8627. https://doi.org/10.3390/IJMS13078615.

(36) Chemat, F.; Abert-Vian, M.; Fabiano-Tixier, A. S.; Strube, J.; Uhlenbrock, L.; Gunjevic, V.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products. Origins, Current Status, and Future Challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *118*, 248–263. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.05.037.

(37) Debnath, S.; Kumar, D.; Das, M. EXTRACTION METHODS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE PLANTS. *Futuristic Trends in Herbal Medicines and Food Products*, 1st ed; IIP Series, 2024; pp 103-122.

(38) Gallina, L.; Cravotto, C.; Capaldi, G.; Grillo, G.; Cravotto, G. Plant Extraction in Water: Towards Highly Efficient Industrial Applications. *Processes*. MDPI November 1, 2022. https://doi.org/10.3390/pr10112233.

(39) Zucolotto, S. M.; Fagundes, C.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E. P. Analysis of C-Glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis* **2012**, *23* (3), 232–239. https://doi.org/10.1002/pca.1348.

(40) Garcia, L. B.; Oliveira, Y.; Lima, P.; Guimarães, C.; Pinho, D.; Lopes, N.; Nunes, T.; Damasceno, G.; Gomes, A.; Juliano, A. Unlocking Hidden Treasures: LC-MS/MS Molecular Networks for Exploring Novel Passiflora Species with Pharmaceutical Potential. *Chem Biodivers* **2024**. https://doi.org/10.1002/cbdv.202400681.

(41) Farag, M. A.; Otify, A.; Porzel, A.; Michel, C. G.; Elsayed, A.; Wessjohann, L. A. Comparative Metabolite Profiling and Fingerprinting of Genus Passiflora Leaves Using a Multiplex Approach of UPLC-MS and NMR Analyzed by Chemometric Tools. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *408* (12), 3125–3143. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9376-4.

(42) Guedes da Silva Almeida, J. R.; Dutra, L. M.; dos Anjos Santos, V. L.; Rolim, L. A.; Lopes, N. P.; Gaslonde, T.; de Oliveira-Júnior, R. G.; Grougnet, R. Flavonoids from Passiflora Cincinnata (Passifloraceae): HPLC-DAD-MSn Characterization, Validation of an HPLC-DAD Method for Quantification and CPC Isolation. *Phytochem Lett* **2024**, *62*, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2024.06.006.

(43) Vukics, V.; Guttman, A. Structural Characterization of Flavonoid Glycosides by Multi-Stage Mass Spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2010**, *29* (1), 1–16. https://doi.org/10.1002/mas.20212.

(44) Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Tomás-Barberán, F. A. Characterization of C-Glycosyl Flavones O-Glycosylated by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2007**, *1161* (1–2), 214–223. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.103.

(45) Jomova, K.; Lawson, M.; Drostinova, L.; Lauro, P.; Poprac, P.; Brezova, V.; Michalik, M.; Lukes, V.; Valko, M. Protective Role of Quercetin against Copper(II)-Induced Oxidative Stress: A Spectroscopic, Theoretical and DNA Damage Study. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, *110*, 340–350. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.042.

(46) dos Santos, É. M.; de Macedo, L. M.; Ataide, J. A.; Delafiori, J.; de Oliveira Guarnieri, J. P.; Rosa, P. C. P.; Ruiz, A. L. T. G.; Lancellotti, M.; Jozala, A. F.; Catharino, R. R.; Camargo, G. A.; Paiva-Santos, A. C.; Mazzola, P. G. Antioxidant, Antimicrobial and Healing Properties of an Extract from Coffee Pulp for the Development of a Phytocosmetic. *Scientific Reports 2024 14:1* **2024**, *14* (1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-024-54797-0.

(47) Mousa, R. B.; Elalim, R. M. A.; Atala, N. E.; Elkayaly, H. A.; Shalaby, E. A. New Methods for Extraction of Phenolic, Flavonoids and Catechin Compounds from Natural Sources. *Chemical Papers* **2024**, 1–17. https://doi.org/10.1007/S11696-024-03778-8/TABLES/12.

(48) Tekin, Z.; Küçükbay, F. Pomegranate Leaves, Buds, and Flowers: Phytochemical, Antioxidant, and Comparative Solvent Analyzes. *Foods and Raw Materials* **2024**, *13* (1), 155–171. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2025-1-630.

(49) Lee, J. S.; Lee, A. Y.; Quilantang, N. G.; Geraldino, P. J. L.; Cho, E. J.; Lee, S. Anti-Oxidant Activity of Avicularin and Isovitexin from Lespedeza Cuneata. *J Appl Biol Chem* **2019**, *62* (2), 143–147. https://doi.org/10.3839/jabc.2019.020.

(50) Chowjarean, V.; Prueksasit, T.; Joyjamras, K.; Chanvorachote, P. Isovitexin Increases Stem Cell Properties and Protects against PM2.5 in Keratinocytes. *In Vivo (Brooklyn)* **2019**, *33* (6), 1833–1841. https://doi.org/10.21873/invivo.11676.

(51) Khole, S.; A Panat, N.; Suryawanshi, P.; Chatterjee, S.; Devasagayam, T.; Ghaskadbi, S. Comprehensive Assessment of Antioxidant Activities of Apigenin Isomers: Vitexin and Isovitexin. *Free Radicals and Antioxidants* **2016**, *6* (2), 155–166. https://doi.org/10.5530/fra.2016.2.5.

(52) Deepha, V.; Praveena, R.; Sivakumar, R.; Sadasivam, K. Experimental and Theoretical Investigations on the Antioxidant Activity of Isoorientin from Crotalaria Globosa. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2014**, *121*, 737–745. https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.12.025.

(53) Ziqubu, K.; Dludla, P. V.; Joubert, E.; Muller, C. J. F.; Louw, J.; Tiano, L.; Nkambule, B. B.; Kappo, A. P.; Mazibuko-Mbeje, S. E. Isoorientin: A Dietary Flavone with the Potential to Ameliorate Diverse Metabolic Complications. *Pharmacological Research*. Academic Press August 1, 2020. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104867.

(54) Yuan, L.; Han, X.; Li, W.; Ren, D.; Yang, X. Isoorientin Prevents Hyperlipidemia and Liver Injury by Regulating Lipid Metabolism, Antioxidant Capability, and Inflammatory Cytokine Release in High-Fructose-Fed Mice. *J Agric Food Chem* **2016**, *64* (13), 2682–2689. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00290.

(55) Liu, J.; Wang, C.; Wang, Z.; Zhang, C.; Lu, S.; Liu, J. The Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities of Extract and Fractions from Corn Silk (Zea Mays L.) and Related Flavone Glycosides. *Food Chem* **2011**, *126* (1), 261–269. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.014.

(56) Thangavel, M.; Gopi, J.; Balakrishnan, D. Protection of Hydrogen Peroxide and Metal Induced DNA Damage by Flavonoids. *International Journal of Experimental Research and Review* **2023**, *32*, 408–421. https://doi.org/10.52756/IJERR.2023.V32.036.

(57) Nogueira, A. B.; Severino, P. B.; Pinheiro, N. B.; Souza, E. F.; Etchegaray, A.; Mendes, R. K. Application of Factorial Design to Optimize Cloud Point Extraction on the Determination of Metals in Eye Makeup. *Revista Virtual de Quimica* **2015**, *7* (4), 1371–1383. https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150075.

(58) Algahtani, M. S.; Ahmad, M. Z.; Ahmad, J. Investigation of Factors Influencing Formation of Nanoemulsion by Spontaneous Emulsification: Impact on Droplet Size, Polydispersity Index, and Stability. *Bioengineering* **2022**, *9* (8). https://doi.org/10.3390/bioengineering9080384.

(59) Barreto, S. M. A. G.; Maia, M. S.; Benicá, A. M.; de Assis, H. R. B. S.; Leite-Silva, V. R.; da Rocha-Filho, P. A.; de Negreiros, M. M. F.; de Oliveira Rocha, H. A.; Ostrosky, E. A.; Lopes, P. S.; de Farias Sales, V. S.; Giordani, R. B.; Ferrari, M. Evaluation of in Vitro and in Vivo Safety of the By-Product of Agave Sisalana as a New Cosmetic Raw Material: Development and Clinical Evaluation of a Nanoemulsion to Improve Skin Moisturizing. *Ind Crops Prod* **2017**, *108*, 470–479. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.064.

(60) Wang, Y.; Geng, M.; Zhang, X.; Yan, M.; Sun, L.; Zhao, Q. Preparation of Lutein Nanoemulsion by Ultrasonic Homogenization Method: Stability and in Vitro Anti-Inflammatory Activity. *Algal Res* **2023**, *73*. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103154.

(61) Somala, N.; Laosinwattana, C.; Teerarak, M. Formulation Process, Physical Stability and Herbicidal Activities of Cymbopogon Nardus Essential Oil-Based Nanoemulsion. *Sci Rep* **2022**, *12* (1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-14591-2.

(62) Falleh, H.; Jemaa, M. Ben; Neves, M. A.; Isoda, H.; Nakajima, M.; Ksouri, R. Formulation, Physicochemical Characterization, and Anti- E. Coli Activity of Food-Grade

Nanoemulsions Incorporating Clove, Cinnamon, and Lavender Essential Oils. *Food Chem* **2021**, *359*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129963.

(63) Li, P. H.; Lu, W. C. Effects of Storage Conditions on the Physical Stability of D-Limonene Nanoemulsion. *Food Hydrocoll* **2016**, *53*, 218–224. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.031.

(64) Guo, Y.; Zhang, X.; Wang, X.; Zhang, L.; Xu, Z.; Sun, D. Nanoemulsions Stable against Ostwald Ripening. *Langmuir* **2024**, *40* (2), 1364–1372. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03019.

(65) Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. MDPI AG May 18, 2018. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057.

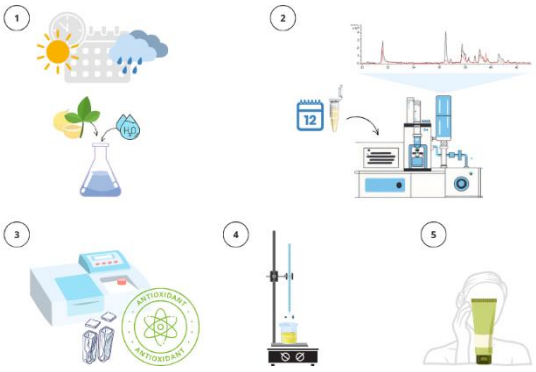
(66) Vasconcellos, E. P.; De Souza, P. M. T. G.; Franco, M. R.; De Castro, V. G.; Souza, L. V.; Lago, R. M.; Speziali, M. G. Escalonamento de Tecnologias: Desenvolvimento de Produto e Processo Do Laboratório à Escala Piloto Conectado Ao Mercado (Parte 1). *Quim Nova* **2021**, *44* (3), 377–384. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170665.

SYNOPSIS

Effect of seasonality on metabolites from green extraction of *Passiflora cincinnata* and their incorporation into a cosmetic formulation for pro-age use.

For Table of Contents Only:

ABSTRACT GRAPHIC



Supporting Information for Eco-friendly pro-age cosmetic using green extraction of *Passiflora cincinnata*

Catarina S. Guimarães[a;*], *Paulinne M. Lima*[a], *Maria Clara B. Sousa*[a], *Caio C. Araújo*[a], *Vinícius R. S. Carmo*[a], *Laryana G. Borges*[a], *Denise B. Silva*[b], *Mateus F. Leite*[c], *Gabriel A. B. Damasceno*[a], *Juliano G. Amaral*[a;*].

[a]Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros St., Vitória da Conquista, Bahia, 45029094, Brazil. [b]College of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Costa e Silva Av., Campo Grande/Mato Grosso do Sul, 79002970, Brazil. [c]College of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., Alfenas/Minas Gerais, 37130001, Brazil.

*Corresponding authors: catarinasguimaraes@hotmail.com,

*juliano.amaral@ufba.br.

Number of pages: 11

Number of tables: 1

Number of graphs: 1

Number of figures: 2

SUPPORTING INFORMATION FOR ECO-FRIENDLY PRO-AGE COSMETIC USING GREEN EXTRACTION OF *Passiflora cincinnata*

Methodology

UFLC-DAD-MS/MS analysis

An UFLC chromatograph from Shimadzu (Tokyo, Japan) was used in the analyses. The equipment consisted of two LC-20AD pumps, SIL-20A auto-injector, SPD-M20A diode array detector (DAD), CBM-20A controller, and CTO- 20A. This system was also coupled to a high-resolution mass spectrometer MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), with electrospray ionization (ESI), and a quadrupole time-of-flight analyzer. The chromatography column used was a Kinetex C18 (Phenomenex, 2.6 µm, 150 × 2.1 mm) connected to a pre-column of the same material. All samples were solubilized in methanol and ultrapure water 7:3 (v/v) using 0.6 mL and filtered through syringe filters (0.22 µm, PTFE, Millipore®, Billerica, MA, USA), after which 2 µL of each sample was injected into the chromatographic system. The mobile phase was composed of ultrapure water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 % formic acid (v/v). Chromatography was performed at 50 ◦C (oven temperature), with flow rate of 0.3 mL/min, and the following gradient: 0–2 min - 3 % B, 2–25 min - from 3 % to 25 % B, 25–40 min - from 25 % to 80 % B, and 40–43 min at 80 % B. MS analyses were performed in positive and negative ion mode, using nitrogen as the nebulizer gas (4 bar), drying gas (9 L/min), and collision gas. The voltage of the capillary was set to 3.5 kV

Feature Based Molecular networking

The molecular network (MN) was created in Feature Based Molecular Networking (FBMN) mode. For this, the raw data obtained by UFLC/MS/MS were converted to mzML in the

MSConvert program and then imported into the MZMine program for the preprocessing steps using the following parameters:[1] mass detection using the exact mass algorithm (noise level, 1E3 for MS and 1E2 for MS/MS); chromatogram builder (minimum group size in number of scans, 2; minimum height, 3E2; m/z tolerance, 50 ppm); chromatogram deconvolution using baseline trimming (minimum peak height, 3E2; peak duration, 0.01 to 2.0 min; baseline level, 1E2); isotope peak grouper (m/z tolerance, 50 ppm; retention time tolerance, 0.2 min; maximum loading, 2; representative isotope, most intense); and alignment using the junction aligner (*m/z* tolerance, 50 ppm; weight for *m/z*, 75; retention time tolerance, 0.1; weight for retention time, 25); filter (minimum peaks in line, 1; minimum peaks in an isotope standard, 1); reanalysis of the data (intensity tolerance, 10; *m/z* tolerance, 50 ppm; retention time tolerance, 0.1 min); download of the generated files.

The files generated in MZMine in .txt; .mgf; and .csv formats were imported into GNPS. The molecular network (FBMN) was created using the following general parameters: precursor ion mass tolerance, 0.01Da; fragment ion mass tolerance, 0.01Da; minimum cosine pairs, 0.7; minimum matching fragment ions, 4; minimum matching library search peaks, 4. The molecular networking created in GNPS was imported into Cytoscape 3.10.1 software for analysis.

Antioxidant assay

Total Antioxidant Capacity:

The samples were evaluated according to the method adapted from Prieto, Pineda and Aguilar (1999).[2] The 5 mL tubes containing 500 μL of the sample and 500 μL of the reagents (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate) were incubated at 95 ºC for 90 min. The readings were performed at 695 nm. The results were expressed as ascorbic acid equivalent (mg of ascorbic acid/g of sample).

DPPH

The samples were evaluated according to the method described by Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995).[3] The 0.1 mM DPPH ethanolic solution (200.0 µL) was added to 100.0 µL of sample. Then, the solution was stirred and kept at room temperature, protected from light, for a period of 30 minutes. The absorbance was measured at 517 nm. The percentage of radical scavenging was measured using equation 1 below:

$$DPPH\ radical\ scavenging\ (\%) = [1 - \left(\frac{Abssample}{Absblank}\right)]x100\ (1)$$

Reduced Power:

The reducing power was evaluated according to the method described by Wang et al. (2008).[4] The samples (200 µL) were incubated with 100 µL potassium ferrocyanide (1%) at 50 °C for 20 min. The reaction was completed by adding 180 µL of trichloroacetic acid (10%) and subsequently homogenized with 20 µL of iron III chloride (0.1%) and 3mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6). The absorbance was measured at 700 nm. The results were expressed as a percentage of activity corresponding to the mass of ascorbic acid.

Chelation of copper ions (Cu^{2+}):

The ability of the samples to chelate copper ions (Cu^{2+}) was evaluated using the method described by Anton (1960).[5] The samples (230 µL) were added to a reagent solution of 4 mM piracotecol (6 µL) and copper II sulfate (100 µL), kept protected from light, and subsequently measured at 632 nm. For the blank, 230 µL of 50 mM phosphate buffer pH 6.0 was used instead of the samples. The analyses were performed in triplicate and the results expressed as a percentage of copper ion chelation using the following equation 2:

$$copper\ chelating\ (\%) = \left[\left(\frac{Abs_{sample} - Abs_{blank}}{Abs_{blank}}\right)\right] x\ 100\ (2)$$

Chelation of iron ions (Fe^{2+}):

The capacity of the samples to chelate iron ions was evaluated spectrophotometrically using a method adapted from Decker and Welch (1990).[6] The extracts of *P. Cincinnata* were added to a reagent solution of 2 mM iron chloride (tetrahydrate) (6.0 µL) and incubated for one minute at room temperature and protected from light. After this period, 5.0 mM ferrozine (12.0 µL) was added and the solutions were incubated at 37°C for 10 minutes. The absorbance was measured at 562 nm, and the results were expressed as a percentage of iron chelation according to equation 3:

$$iron\ chelating\ (\%) = \left[\left(\frac{Abs_{sample} - Abs_{blank}}{Abs_{blank}}\right)\right] x\ 100\ (3)$$

Scavenging capacity of superoxide radicals (O_2^-):

Superoxide radical scavenging was performed using a method based on the ability of the samples to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) in a riboflavin-light-NBT system.[7] A reagent solution containing 50 nM phosphate buffer (pH 7.4), 13 mM methionine, 2 µM riboflavin, 100 µM EDTA, and 75 µM NBT was added to a solution containing the sample to be analyzed and exposed to fluorescent light in a light-dissipating chamber for 10 min to produce formazan blue. Absorbance was evaluated at a wavelength of 560 nm. The percentage of superoxide radical scavenging was obtained using equation 4:

$$superoxide\ radical\ scavenging\ (\%) = [1 - \frac{(Abs\ control - Abs\ sample)}{(Abs\ control - Abs\ blank)}]\ (4)$$

Scavenging capacity of hydroxyl radicals (OH^-):

It was performed by the $FeCl_2/H_2O_2$ method based on Smirnoff and Cumbes (1998).[8] The test samples were placed in test tubes to a volume of 200 µL. Phosphate buffer was used as blank and control. Reagent solution (600 µL) containing sodium salicylate, iron sulfate heptahydrate and

EDTA dissolved in 150 mM phosphate buffer pH 7.4 was added to all tubes, in addition to 30% hydrogen peroxide solution (200 µL). For the blank, phosphate buffer (200 µL). After shaking, the tubes were incubated for one hour in a water bath at 37°C. The analyses were performed in triplicate. The absorbance was measured at 510 nm and the percentage of hydroxyl radical scavenging was used to express the results according to the equation:

$$Hydroxyl\ radical\ scavenging\ (\%) = [1 - \frac{(Abs\ control - Abs\ sample)}{(Abs\ control - Abs\ blank)}]\ (5)$$

Total flavonoid content

The assay was proposed by Schmidt and Ortega (1993),[9] with adaptations. The method is based on the complexation of flavonoids with aluminum chloride. The samples were added, together with an aluminum chloride solution, to the test tubes and the absorbance was read at 425 nm. Similarly, a standard curve was drawn using quercetin as a standard (5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 µg/mL). The results were expressed as µg EQ/mg sample or µg EQ/µg sample.

Results

Link to GNPS molecular networking:

https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=3c80a14a34194b1ab647322ecfe8c437

Table S1. Results of the standardization of *P. cincinnata* extracts regarding the total flavonoid content, expressed as µg EQ/mg of sample.

Month	Season	Total flavonoids
January	rainy	27.25
February	rainy	28.33
March	rainy	28.98
April	rainy	29.41
May	rainy	26.64
June	dry	28.25
July	dry	24.61
August	dry	28.90
September	dry	29.76
October	dry	31.06
November	dry	22.07
December	rainy	19.45

Graph S1. Monthly rainfall in Vitória da Conquista - Bahia from January/2018 to December/2023.

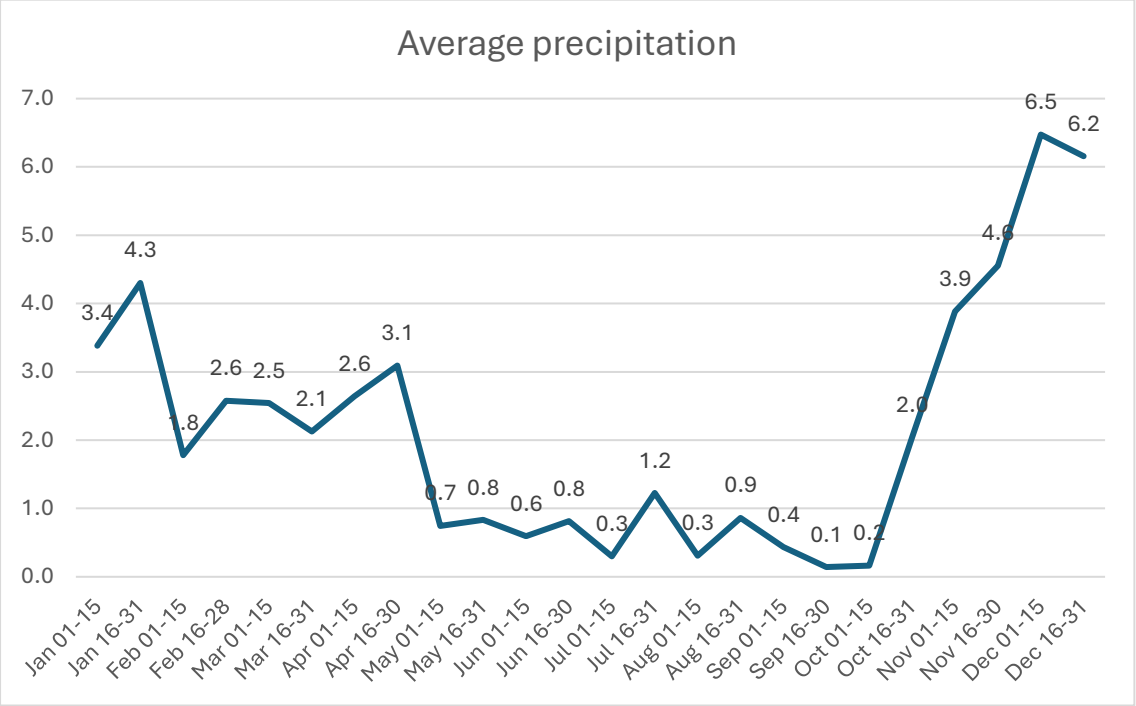


Figure S1. Response surface plots with Ethyl Oleate and Polysorbate 80 as independent variables. A: Zeta Potential response plot; B: Droplet size response plot; C: PDI response plot.

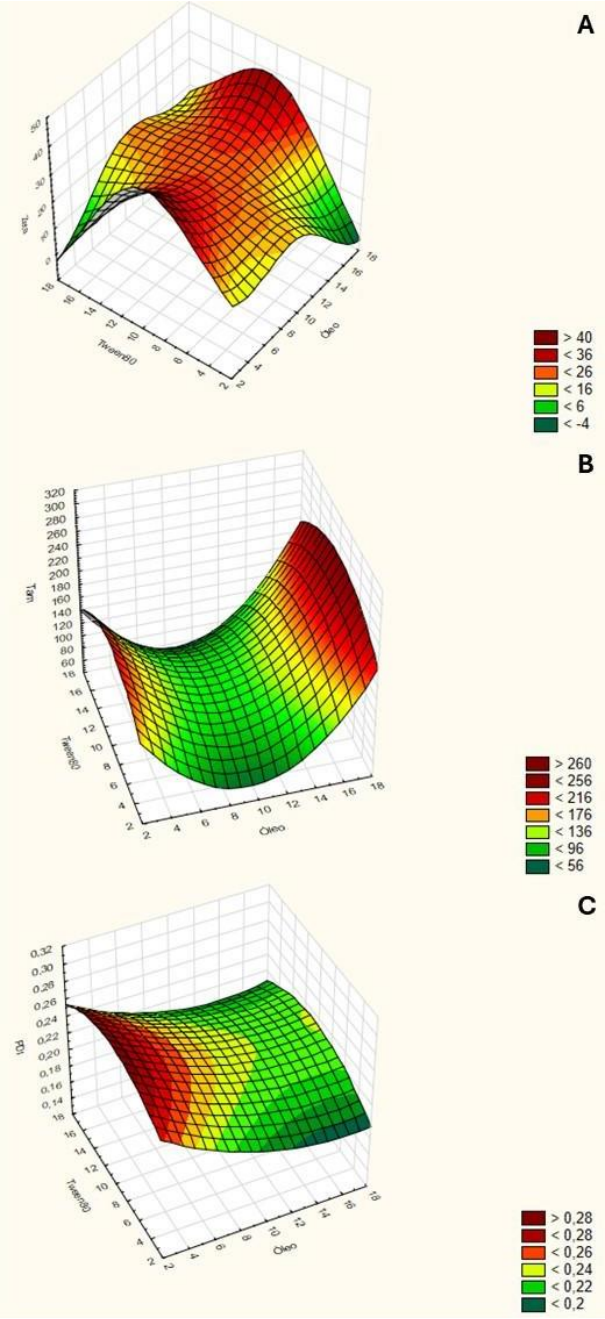
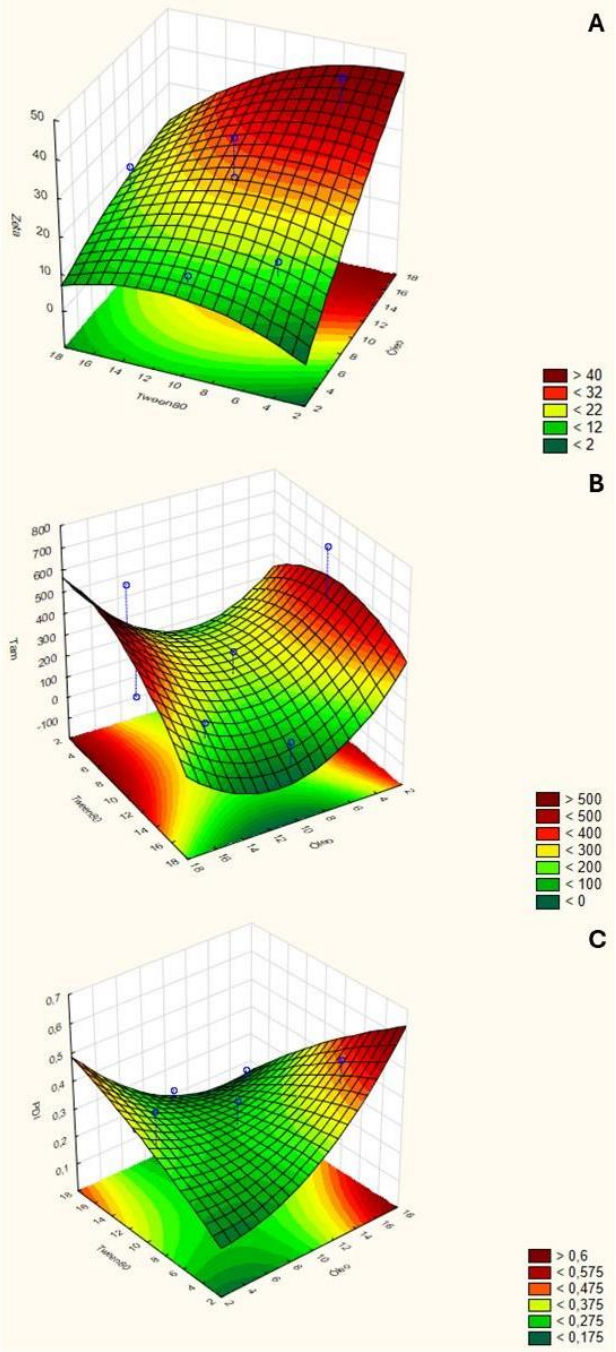


Figure S2. Response surface plots with Caprylic Capric Triglyceride and Polysorbate 80 as independent variables. A: Zeta Potential response plot; B: Droplet size response plot; C: PDI response plot.



References

(1) Pilon, A. C.; Vieira, N. C.; Amaral, J. G.; Monteiro, A. F.; Da Silva, R. R.; Spíndola, L. S.; Castro-Gamboa, I.; Lopes, N. P. Molecular Networks: An Analysis on Annotations and Discovery of New Assets. *Quim Nova* **2021**, *44* (9), 1168–1179. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170777.

(2) Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem* **1999**, *269* (2), 337–341. https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4019.

(3) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, *28* (1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

(4) Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Li, Z. Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharide Fractions Extracted from Laminaria Japonica. *Int J Biol Macromol* **2008**, *42* (2), 127–132. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2007.10.003.

(5) Anthony, A. Colorimetric Estimation of Aluminum with Pyrocatechol Violet. *Analytical Chemistry* **1960**, *32*, 725–726.

(6) Agrie, J.; Voutsinas, L. P.; Cheung, E.; Nakai, S.; Yasumatsu, K.; Sawada, K.; Moritaka, S.; Misaki, M.; Toda, J. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food†. *J Agric Food Chem* **1990**, *38* (3), 674–677. https://doi.org/10.1021/JF00093A019.

(7) Dasgupta, N.; De, B. Antioxidant Activity of Piper Betle L. Leaf Extract in Vitro. *Food Chem* **2004**, *88* (2), 219–224. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.01.036.

(8) Smirnoff, N.; Cumbes, Q. J. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. *Phytochemistry* **1989**, *28* (4), 1057–1060. https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7.

(9) Schmidt, P. C. ; G. O. G. Passionsblumenkraut: Bestimmung Des Gesamt Flavonoid Gehaltes on Passiflorae Herba. *Deutsch Apotheker Zeitung* **1993**, *47*, 17–26.