



Desenvolvimento de uma formulação cosmética de gel anti-idade com extratos de plantas espontâneos e cultivares de *Humulus lupulus* L.

Briolanja Ananias Ferraz dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca no âmbito do Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais

Orientado por

Professora Doutora Maria João de Almeida Coelho de Sousa

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança

2020

Agradecimentos

Esta dissertação de Mestrado só foi possível ser realizada graças a algumas pessoas que de forma directa e indirecta colaboraram, apoiaram-me e contribuíram para que tudo fosse realizado da melhor forma. Sinto-me grata por todas as oportunidades e confiança que me foi depositada, desta forma tenho de expressar o meu agradecimento e profundo reconhecimento em particular:

À minha família, ao meu irmão e principalmente aos meus Pais por me motivarem e apoiarem nesta etapa académica, por sempre acreditarem em mim, por toda a confiança, por todos os valores transmitidos e por estarem sempre lá quando preciso. Amo-vos!

A minha orientadora, a Professora Doutra Maria João de Almeida Coelho de Sousa pela excelente orientação, mas também pela simpatia, disponibilidade e apoio que me proporcionou, também pelo conhecimento que me transmitiu durante este percurso. Vai ser sempre uma referência para mim.

A todos os departamentos do grupo Biologia, Microbiologia e ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) obrigada por toda a ajuda, colaboração que me foi disponibilizada durante a minha permanência no laboratório, pelo vosso profissionalismo e pela boa disposição.

As minhas colegas de laboratório, Silene e Sarra, pelo trabalho em equipa e por aquilo tudo que passamos para fazer este trabalho

À Dona Isabel, à Estela, à Dona Fátima e a Vanessa pelos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho assim como por toda a paciência e disponibilidade que tiveram.

Às minhas amigas, Cláudia, Elisa e Joana, pelo companheirismo, pela amizade, pelas conversas e por tudo o que juntas passamos.

Aos meus colegas e aos professores de mestrado, por terem a paciência de me aturarem, por me ensinarem tantas coisas e obrigada pelos bons momentos que me proporcionaram. Vocês são muito importantes na minha vida, não me irei esquecer.

A todas as pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida, agradeço todos os momentos e agradeço por terem acreditado em mim.

À Professora Doutora Andrea Afonso, por ter partilhado o seu conhecimento para os ensaios de actividade antimicrobiana e pela ajuda e apoio fornecidos.

À Professora Doutora Olívia Pereira, pela ajuda e apoio nas análises de identificação dos compostos fenólicos.

Por fim, agradeço, ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e à Universidade de Salamanca (USAL) por permitirem a realização deste trabalho e por toda a aprendizagem que me foi proporcionada.

A todos o meu sincero, **Muito Obrigada!**

Índice

Abreviaturas e Símbolos	7
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	10
Índice de Gráficos	11
Resumo	12
Resumen	14
Abstract	16
1. ESTADO DA ARTE	19
1.1. Cosméticos	19
1.2. Fitocosmética	22
1.3. <i>Humulus lupulus</i> L.	22
1.3.1. Descrição botânica e aspectos morfológicos	22
1.3.2. Componentes	23
1.3.2.1. Resinas	23
1.3.2.2. Óleos essenciais	23
1.3.2.3. Polifenóis	23
1.3.3. Actividades biológicas dos compostos de Lúpulo	24
1.3.3.1. As propriedades de <i>Humulus lupulus</i> L.	24
1.3.4. Aplicações dos extractos de Lúpulo	24
1.3.5. Xanthohumol	25
1.4. <i>Thymus zygis</i> L. (Tomilho)	25
1.5. Pele	26
1.5.1. Tipos de pele	27
1.5.2. Estrutura anatómico da pele humana	28
1.5.2.1. Epiderme	28
1.5.2.1.1. Estrato córneo	28
1.5.2.1.2. Estrato lúcido	29
1.5.2.1.3. Estrato granuloso	29
1.5.2.1.4. Estrato espinhoso	29
1.5.2.1.5. Estrato basal	29
1.5.2.2. Derme	30
1.5.2.2.1. Estrato papilar	30

1.5.2.2.2. Estrato reticular.....	31
1.5.2.3. Hipoderme	31
1.5.3. Envelhecimento da pele.....	31
1.5.4. Cuidados a ter com a pele.....	32
2. OBJETIVO	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Material Vegetal	36
3.1.1. Preparação das amostras.....	36
3.2. Desenvolvimento de formulação cosmética.....	36
3.3. Extracção e análise de óleos essenciais (GC e GC MS).....	36
3.4. Extracção e análise de voláteis	37
3.5. Extractos hidroalcoólico de <i>Humulus lupulus</i> L.....	37
3.5.1. Determinação de compostos fenólicos totais	37
3.6. Identificação dos compostos fenólicos do Lúpulo	37
3.7. Testes de estabilidade da formulação cosmética	38
3.7.1. Teste organoléptico.....	38
3.7.2. Teste de temperaturas e humidades	38
3.7.3. Teste de temperaturas extremas.....	39
3.7.4. Teste espectrofotométrico.....	39
3.8. Testes físico-químicos	39
3.8.1. Teste de pH.....	39
3.8.2. Densidade	39
3.8.3. Teste de vibração mecânica.....	40
3.8.4. Teste de centrifugação	40
3.8.5. Teste da textura.....	40
3.8.6. Teste de luz.....	40
3.8.7. Teste de cor.....	41
3.9. Testes microbiológicos dos extractos de Lúpulo e tomilho	41
3.9.1. Actividade antibacteriana	41
3.9.2. Actividade antifúngica.....	42
3.10. Aceitação em painel de voluntários do produto cosmético	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Composição química	45

4.1.1. Composição do óleo essencial de <i>Thymus zygis zygis</i>	45
4.1.2. Composição fenólica de extractos de Lúpulo.....	46
4.1.3. Identificação dos compostos fenólicos do Lúpulo	46
4.2. Testes de estabilidade do produto cosmético	50
4.2.1. Teste organoléptico.....	50
4.2.2. Teste de temperaturas e humidades	50
4.2.3. Teste de temperaturas extremas.....	51
4.2.4. Teste espectrofotométrico.....	53
4.3. Testes físico-químicos	54
4.3.1. Teste do pH.....	54
4.3.2. Densidade	55
4.3.3. Teste de vibração mecânica.....	56
4.3.4. Teste de centrifugação	56
4.3.5. Teste da textura.....	56
4.3.6. Teste da luz.....	58
4.3.7. Teste da cor.....	58
4.4. Teste microbiológicos	61
4.4.1. Actividade antibacteriana	61
4.4.2. Actividade antifúngica.....	62
4.5. Aceitação em painel de voluntários do produto cosmético	62
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
5.1. Conclusão	73
5.2. Perspectivas futuras	75
Referências bibliográficas.....	76
Anexos:	83

Abreviaturas e Símbolos

C	Cascade
MBC	Concentração mínima bactericida
MIC	Concentração mínima inibitória
CQA	Ácido cafeoilquínico
DAD	Detecção de Díodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
<i>Dr</i>	Densidade relativa
E	Espontâneo
ESI	Ionização por electrospray
F	Flores
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
<i>m</i>	Massa
MH	Müeller Hinton
[M-H]	Ião pseudomolecular
MS	Espectrometria de Massa
MS ²	Espectrometria de Massa em tandem
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>n</i>	Número de indivíduos
ND	Não determinado
NI	Não identificado
NP	Número do pico
P	Polaris
PV	Extracto de Partes Vegetativas
RPM	Rotações por minuto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RT	Tempo de retenção
UPLC	Cromatografia Líquida Ultrarrápida

UV	Radiação ultravioleta
UV-VIS	Radiação ultra violeta-visível
v/v	Volume/volume
V	Partes Vegetativas
v	Volume

Índice de Figuras

Figura 1: A planta <i>Humulus lupulus</i> L.....	222
Figura 2: Representação química da molécula xanthohumol.....	25
Figura 3: Teor de água em % representado nas camadas da pele	27
Figura 4: Tipos e o aspecto da pele e o seu respectivo tratamento estético	27
Figura 5: Representação histológica da pele	31
Figura 6: Formação de rugas.....	33
Figura 7: Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) da variedade Cascade de <i>Humulus lupulus</i> L. a 280 nm. Os números na figura correspondem aos picos UHPLC-DAD-ESI-MSn descritos na Tabela 16.	49
Figura 8: Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) do Polaris de <i>Humulus lupulus</i> L. a 280 nm. Os números na figura correspondem aos picos UHPLC-DAD-ESI-MSn descritos na Tabela 16.	49
Figura 9: Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) do Espontâneo de <i>Humulus lupulus</i> L. a 280 nm. Os números na figura correspondem aos picos UHPLC-DAD-ESI-MSn descritos na Tabela 16.	49
Figura 10: O gel com extracto da variedade Cascade flor a 1,25%, com a observação de separação de fases.....	58
Figura 11: Representação do sólido de cor no espaço para L*, a* e b*, em termos Munsell Hue	59

Índice de Tabelas

Tabela 1: Rendimentos e composição percentual do óleo essencial das partes aéreas de <i>Thymus zygis</i>	45
Tabela 2: Rendimento de extracção (%) e compostos fenólicos (mg GAE / g planta) de um Lúpulo espontâneo e duas variedades.	46
Tabela 3: Densidade relativa de cada formulação com as suas respectivas variedades em várias concentrações.	55
Tabela 4: A capacidade bactericida para o tomilho.....	61
Tabela 5: Representação da actividade antifúngica do tomilho e controlo e os halos de inibição em centímetros.....	62
Tabela 6: Representação da actividade antifúngica do Lúpulo e os halos de inibição em centímetros.	62
Tabela 7: Frequência com que realiza os seguintes comportamentos de saúde.	63
Tabela 8: Os produtos cosméticos de rejuvenescimento de rosto que os inquiridos utilizaram (e/ou está a utilizar) e com que periodicidade (tendo em consideração os últimos 12 meses).	64
Tabela 9: Autoavaliação da pele dos inquiridos.....	65
Tabela 10: Identificar o nível de concordância com as seguintes afirmações relativamente aos cosméticos naturais.....	66
Tabela 11: Determinação a nível de conhecimento de produtos cosméticos naturais. .	67
Tabela 12: O grau de satisfação com a performance do gel de metilcelulose de produtos naturais que experimentou referente aos seguintes aspectos indicados.	68
Tabela 13: O grau de satisfação com a performance do gel com extracto hidroalcoólico de cultivar Polaris de produtos naturais que experimentou referente aos seguintes aspectos indicados.	68
Tabela 14: Para o gel de metilcelulose acerca da recomendação da compra deste produto e os motivos.	69
Tabela 15: Para o gel de Lúpulo acerca da recomendação da compra deste produto e os motivos.	70
Tabela 16: Composição fitoquímica de extractos hidroalcoólicos de <i>Humulus lupulus</i> L. determinada por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	83
Tabela 17: Composição do meio de crescimento bacteriano	86
Tabela 18: Composição do meio de crescimento de leveduras.....	86
Tabela 19: Valores do rendimento em percentagem dos extractos hidroalcoólicos liofilizados das várias variedades de Lúpulo.....	86
Tabela 20: Características sociodemográficas.....	93

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Representação do pH lido a diferentes dias e temperaturas de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a $60\% \pm 5\%$ de humidade relativa (HR) e $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a $75\% \pm 5\%$ de HR. (média \pm DP)	52
Gráfico 2: Espectro UV-VIS das amostras em diferentes concentrações; C.F.- Cascade flor; C.V. – Cascade vegetal; E.F. – Espontâneo flor; E.V. – Espontâneo vegetal; P.F. – Polaris flor; P.V. – Polaris vegetal.	53
Gráfico 3: O pH das amostras em diferentes concentrações; C.F.- Cascade flor; C.V. – Cascade vegetal; E.F. – Espontâneo flor; E.V. – Espontâneo vegetal; P.F. – Polaris flor; P.V. – Polaris vegetal. (média \pm DP).....	54
Gráfico 4: Os valores dos parâmetros firmeza, consistência, índice de viscosidade, e coesividade, medidos pelo equipamento texturómetro. (média \pm DP).....	56
Gráfico 5: Representação gráfica dos valores de medição da cor para L^* , a^* , b^* , c^* e h . (média \pm DP)	60

Resumo

Apesar de mais envelhecida, e talvez por isso mesmo, a população em geral dá bastante relevância à sua aparência, recorrendo cada vez mais à utilização de produtos cosméticos. O processo de envelhecimento da pele resulta da perda das funções fisiológicas, morfológicas e propriedades bioquímicas, determinadas por factores extrínsecos e intrínsecos, deste modo devem ser tomadas precauções, no sentido de controlar e ou retardar esse processo.

É determinante conhecer a estrutura e fisiologia da pele de modo a compreender como atuam os produtos cosméticos para que, desta forma, se possa combater o seu envelhecimento.

As formulações cosméticas são compostas por veículo, princípio activo e excipientes, que, dependendo dos objectivos, são necessários ter em conta e especial cuidado na sua utilização, nomeadamente ao tipo de pele, local de acção e efeito desejado. De acordo com a Farmacopeia Portuguesa, os géis são preparações cosméticas, constituídas por líquidos gelificados com auxílio de agentes gelificantes para aplicação cutânea.

Assim o Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é conhecido mundialmente como um sabor essencial na indústria cervejeira. Seus compostos têm demonstrado benefícios à saúde nos perfis fitoquímicos, farmacológico e biológico, devido às suas actividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígeno. No entanto é empregado em diversos fins, nomeadamente na indústria cosmética, em perfumes, champôs, loções e cremes. A sua utilização no gel tem como função principal, aliviar os sinais de envelhecimento da pele, tornando as rugas menos evidentes e melhoria da estrutura e firmeza da pele, através da acção do xanthohumol, um prenil flavonóide produzido exclusivamente na planta de *Humulus lupulus* L.

Este estudo pretende desenvolver uma formulação em gel incorporando extractos hidroalcoólicos das diferentes cultivares de Lúpulo Cascade, Polaris e Lúpulo espontâneo, a partir de cones e partes vegetais, em diferentes percentagens.

O óleo essencial de *Thymus zygis zygis* foi utilizado como conservante natural e a análise da sua composição foi feita por GC e GC-MS. Posteriormente foi feita avaliação dos parâmetros físico-químicos, estabilidade e capacidade de inibir o crescimento antimicrobiano do gel.

Os resultados da medição do pH das formulações é que são muito estáveis e levemente ácidas. A densidade relativa obteve valores de 1 e 0,857. Verificou-se que não houve alterações na separação de fases nos testes de temperatura e humidade, temperaturas, vibração mecânica e centrifugação. No entanto, foram observadas alterações nos espectros de UV-Visível, na textura, consistência e viscosidade, e no teste de cor. No teste de luz houve separação de fases nas amostras, o que pode indicar alguma instabilidade da formulação. Na identificação dos compostos fenólicos do Lúpulo verificamos que o xanthohumol só se encontra nas flores. No teste antimicrobiano confirmamos que o óleo de tomilho tem propriedades antibacterianas e antifúngicas e o Lúpulo propriedades antifúngicas. Com isto, foi possível confirmar qual o melhor extracto para a formulação cosmética, no qual obtemos a variedade Polaris com extracto hidroalcoólico de cones de Lúpulo a 2,5%. Para avaliação do produto cosmético foi feito um estudo em painel de voluntários em que obtivemos uma opinião geralmente positiva, em relação ao gel com extracto *versus* controlo.

No geral, a realização deste trabalho permitiu confirmar que a incorporação de extractos hidroalcoólicos de Lúpulo em formulações de gel de metilcelulose, obteve-se bons resultados de estabilidade físico-química, as características organolépticas mantendo-se ao longo do tempo, a sua estabilidade microbiológica e a presença de compostos bioactivos podem ser usados na formulação cosmética em pesquisas futuras. Quanto à sua bioactividade, *Humulus lupulus* L. apresentou propriedades: antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas,

Por ser uma região rica em Lúpulo. O desenvolvimento de produtos cosméticos natural com extractos de Lúpulo, com base nas suas propriedades, poderá ser uma mais valia para a região.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* L., fenóis, cosmética, terpenos, compostos fenólicos

Resumen

A pesar de ser mayor, y quizás por eso mismo, la población en general le da mucha relevancia a su apariencia, recurriendo cada vez más al uso de productos cosméticos. El proceso de envejecimiento de la piel es el resultado de la pérdida de propiedades fisiológicas, morfológicas y bioquímicas, determinadas por factores extrínsecos e intrínsecos, por lo que se deben tomar precauciones para controlar y / o retrasar este proceso.

Es fundamental conocer la estructura y fisiología de la piel para comprender cómo funcionan los productos cosméticos para que, de esta forma, pueda combatir su envejecimiento.

Las formulaciones cosméticas están compuestas por vehículo, principio activo y excipientes, los cuales, según los objetivos, es necesario tener en cuenta y un especial cuidado en su uso, es decir, el tipo de piel, lugar de acción y efecto deseado. Según la Farmacopea Portuguesa, los geles son preparaciones cosméticas, que consisten en líquidos gelificados con la ayuda de agentes gelificantes para aplicación cutánea.

Así, el lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es conocido mundialmente como un sabor esencial en la industria cervecera. Sus compuestos han demostrado beneficios para la salud en perfiles fitoquímicos, farmacológicos y biológicos, debido a sus actividades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Sin embargo, se utiliza para varios fines, a saber, en la industria cosmética, en perfumes, champús, lociones y cremas. Su uso en gel tiene la función principal de aliviar los signos del envejecimiento cutáneo, hacer menos evidentes las arrugas y mejorar la estructura y firmeza de la piel, mediante la acción del xanthohumol, un prenilo flavonoide producido exclusivamente en la planta *Humulus lupulus* L.

Este estudio pretende desarrollar una formulación en gel incorporando extractos hidroalcohólicos de los diferentes cultivares de Hops Cascade, Polaris y lúpulos espontáneos, a partir de conos y partes de plantas, en diferentes porcentajes.

El aceite esencial de *Thymus zygis zygis* se utilizó como conservante natural y el análisis de su composición se realizó mediante GC y GC-MS. Posteriormente, se realizó una evaluación de los parámetros físico-químicos, estabilidad y capacidad para inhibir el crecimiento antimicrobiano del gel.

Los resultados de medir el pH de las formulaciones son que son muy estables y ligeramente ácidas. La densidad relativa obtuvo valores de 1 y 0,857. Se encontró que

no hubo cambios en la separación de fases en las pruebas de temperatura y humedad, temperaturas, vibración mecánica y centrifugación. Sin embargo, se observaron cambios en los espectros UV-Visible, en textura, consistencia y viscosidad, y en la prueba de color. En la prueba de luz, hubo separación de fases en las muestras, lo que puede indicar cierta inestabilidad de la formulación. En la identificación de los compuestos fenólicos del lúpulo, comprobamos que el xantohumol solo se encuentra en flores. En la prueba antimicrobiana confirmamos que el aceite de tomillo tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas y propiedades antifúngicas del lúpulo. Con ello se pudo constatar cuál es el mejor extracto para la formulación cosmética, en la que obtenemos la variedad Polaris con extracto hidroalcohólico de conos de lúpulo al 2,5%. Para evaluar el producto cosmético se realizó un estudio en un panel de voluntarios en el que obtuvimos una opinión generalmente positiva, en relación al gel con extracto versus control.

En general, este trabajo permitió constatar que la incorporación de extractos hidroalcohólicos de Lúpulo en formulaciones de gel de metilcelulosa, obtuvo buenos resultados de estabilidad físico-química, manteniéndose las características organolépticas en el tiempo, su estabilidad microbiológica. y la presencia de compuestos bioactivos puede usarse en formulaciones cosméticas en investigaciones futuras. En cuanto a su bioactividad, *Humulus lupulus* L. mostró propiedades: antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas,

Porque es una región rica en lúpulo. El desarrollo de productos cosméticos naturales con extractos de lúpulo, basados en sus propiedades, podría ser un activo para la región.

Palabras clave: *Humulus lupulus* L., fenoles, cosméticos, terpenos, compuestos fenólicos

Abstract

Despite being older, and perhaps for this very reason, the general population gives a lot of relevance to their appearance, resorting more and more to the use of cosmetic products. The aging process of the skin results from the loss of physiological, morphological functions and biochemical properties, determined by extrinsic and intrinsic factors, so precautions must be taken in order to control and or delay this process.

It is crucial to know the structure and physiology of the skin in order to understand how cosmetic products work so that, in this way, it can fight its aging.

Cosmetic formulations are composed of vehicle, active ingredient and excipients, which, depending on the objectives, are necessary to take into account and special care in their use, namely the type of skin, place of action and desired effect. According to the Portuguese Pharmacopoeia, gels are cosmetic preparations, consisting of gelled liquids with the aid of gelling agents for cutaneous application.

Thus, Hops (*Humulus lupulus* L.) is known worldwide as an essential flavor in the beer industry. Its compounds have demonstrated health benefits in phytochemical, pharmacological and biological profiles, due to its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. However, it is used for several purposes, namely in the cosmetic industry, in perfumes, shampoos, lotions and creams. Its use in the gel has the main function of relieving the signs of skin aging, making wrinkles less evident and improving the structure and firmness of the skin, through the action of xanthohumol, a flavonoid prenyl produced exclusively in the *Humulus lupulus* L. plant.

This study aims to develop a gel formulation incorporating hydroalcoholic extracts from the different cultivars of Hops Cascade, Polaris and spontaneous hops, from cones and plant parts, in different percentages.

The essential oil of *Thymus zygis zygis* was used as a natural preservative and the analysis of its composition was done by GC and GC-MS. Subsequently, an assessment was made of the physical-chemical parameters, stability and the ability to inhibit the antimicrobial growth of the gel.

The results of measuring the pH of the formulations are that they are very stable and slightly acidic. The relative density obtained values of 1 and 0.857. It was found that there were no changes in phase separation in the tests of temperature and humidity, temperatures, mechanical vibration and centrifugation. However, changes were

observed in the UV-Visible spectra, in texture, consistency and viscosity, and in the color test. In the light test, there was phase separation in the samples, which may indicate some formulation instability. In the identification of the phenolic compounds of Hops, we verified that xanthohumol is only found in flowers. In the antimicrobial test we confirmed that thyme oil has antibacterial and antifungal properties and Hops antifungal properties. With this, it was possible to confirm which is the best extract for the cosmetic formulation, in which we obtain the Polaris variety with 2.5% hydroalcoholic extract of Hop cones. To evaluate the cosmetic product, a study was carried out in a panel of volunteers in which we obtained a generally positive opinion, in relation to the gel with extract versus control.

In general, this work allowed us to confirm that the incorporation of hydroalcoholic extracts of Hops in methyl cellulose gel formulations, obtained good results of physical-chemical stability, the organoleptic characteristics being maintained over time, its microbiological stability and the presence of bioactive compounds can be used in cosmetic formulation in future research. As for its bioactivity, *Humulus lupulus* L. showed properties: antimicrobial, antioxidants, anti-inflammatory and anticancer,

Because it is a region rich in hops. The development of natural cosmetic products with hops extracts, based on their properties, could be an asset for the region.

Keywords: *Humulus lupulus* L., phenols, cosmetics, terpenes, phenolic compounds

Capítulo 1: Estado da arte



1. ESTADO DA ARTE

1.1. Cosméticos

O cosmético (do grego *kosmetikós* = hábil em adornar) segundo a definição legal, “é qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspecto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais” (Infarmed, 2019).

As formulações cosméticas são compostas por veículos, principio activo e excipientes, dando origem a vários tipos de cosméticos que são utilizados de acordo com os objectivos (Leonardi, *et al.*, 2001).

Os tipos de formulações como emulsões, loções, leites, géis, óleos e misturas para banho e duche, produtos de uso externo para cuidados íntimos, para protecção solar e pós-solar e produtos anti-idade, entre outros, são alguns dos produtos cosméticos mais comuns usados pela maioria da população mundial. É pois importante, atendendo a diversidade de produtos que, cada individuo antes de usar uma formulação cosmética, deva ter em atenção o tipo de pele, local de acção e efeito desejado que pretende.

A aplicação directa de uma planta representava, uma das formas farmacêuticas mais antigas usadas em cosmética, contudo, tinha as suas desvantagens de utilização, como a sua difícil aplicação, (atribuídas às partículas sólidas na formulação), potenciais problemas microbiológicos, e/ou a exigência de uma quantidade significativamente elevada de material vegetal que, liberte a concentração correcta de substância activa. (Ruivo, 2012)

Hoje em dia, em oposição á utilização directa das plantas, utiliza-se os extractos vegetais na indústria cosmética. É assim, necessário fazer referência, nas formulações cosméticas, sobre os tipos e modo de obtenção dos respectivos extractos, assim como os aspectos gerais de fórmulas galénicas, e as principais preparações cosméticas (Jesus, *et al.*, 2020).

Os cosméticos quando são disponibilizados no mercado, devem ser seguros para a saúde humana, quando utilizados em condições normais (Araldi, 2013).

Deste modo é importante avaliar a possível resistência à contaminação antimicrobiana das diversas formulações cosméticas. A presença de microrganismos no produto cosmético identificados como espécies patogénicas para a pele, como leveduras

indesejáveis, ou bactérias aeróbias mesófilas, pode indicar uma falha no processo de fabrico do mesmo.

Pode ocorrer em grupos de risco, como crianças, grávidas, idosos, entre outros, assim como a sua utilização frequente e a longo prazo, tendo em conta a toxicidade que pode provocar irritações/alergias.

Em laboratório, são elaborados testes de toxicidade, como por exemplo absorção percutânea, ou por ingestão oral, como em produtos de higiene oral ou batons, a sua avaliação é feita em cultura de células, de tecidos e de órgãos, modelos matemáticos, utilização de bactérias e organismos unicelulares, entre outros. Os seus resultados, não são possíveis de determinar absolutamente o efeito/risco que pode causar ao ser humano, devido as características diferentes que temos (Frazão, 2017).

A toxicidade de uma planta e dos seus extractos, está relacionada com a composição química da mesma, e conseqüentemente com o efeito biológico dos compostos (Frazão, 2017).

A formulação em gel é uma preparação cosmética utilizada, frequentemente, sobre a pele e mucosas, com finalidade terapêutica. A característica comum, é a capacidade de adesão à superfície, por possuir propriedades plásticas, permitindo a alteração da sua forma quando é aplicada uma força externa por um período de tempo razoável, que produz uma sensação de frescura sobre a pele. Os géis têm a vantagem de serem facilmente eliminados na lavagem, no entanto apresentam tendência para perderem água, perdendo a sua textura original. Para evitar esta situação, é adicionada à formulação uma substância higroscópica como a glicerina ou o propilenoglicol. Como o meio é propício à proliferação de microrganismos, é frequente incorporar-se um agente conservante que apresente actividade contra fungos e bactérias, num largo intervalo de pH (Ramalho, 2007).

Conforme a Farmacopeia Portuguesa, os géis são formulações cosméticas constituídas por líquidos gelificados com o auxílio de agentes gelificantes (rede tridimensional constituída por macromoléculas) apropriados, de consistência semi-sólidas correspondente a um estado particular de solução coloidal para aplicação cutânea (Ramalho, 2007).

Os géis fazem parte de numerosas preparações cosméticas, tais como géis anti celulíticos, máscaras faciais e produtos antienvhecimento (Oliveira, 2009).

Os géis são produtos cosméticos bem aceites pelo consumidor por serem de fácil aplicação devido ao seu aspecto opaco e transparente. Os géis mais simples, são

compostos por água à qual são adicionadas gomas naturais, materiais semi-sintéticos, materiais sintéticos ou argilas. Quanto à viscosidade de um gel, geralmente é dependente da massa molecular e da quantidade do agente espessante (Frazão, 2017).

Os géis formam uma rede de polímeros hidrofílicos que podem reter 10- 20% de água até mil vezes o seu peso seco. Assim, a grande quantidade de água presente nos géis contribui para a hidratação e elasticidade cutânea.

Os polímeros naturais de acordo com a origem vegetal, como a goma Guar, são usados numa multiplicidade de funções cosméticas, nomeadamente como agentes modificadores da reologia (espessantes, podem prevenir a sedimentação durante o transporte e armazenamento, mas permitem que o produto flua quando for vertido ou bombeado durante a aplicação), condicionadores, apresentam propriedades hidratantes, emolientes conferem maciez e suavidade à pele resultando numa superfície lisa. Actualmente, os polímeros naturais têm sido mais usados pelo consumidor que, procura cada vez mais produtos naturais (Ramalho, 2007).

Os géis são formados por:

- Agente gelificante;
- Água ou solvente orgânico;
- Humectante: glicerina, propilenoglicol, ou sorbitol, que impede a evaporação rápida;
- Substâncias activas.

Os agentes gelificantes são classificados em função da sua origem e da natureza dos polímeros:

- ❖ Polímeros naturais
 - ◆ Origem vegetal:
 - Exsudados vegetais (goma arábica, goma adraganta)
 - Extractos de sementes (goma guar, amido e derivados)
 - Extractos de algas (carragenina, alginatos)

Dependendo da natureza do solvente, os géis podem ser:

- Hidrogeles ou géis hidrófilos;
- Oleogéis ou géis lipófilos.

(Oliveira, 2009)

1.2. Fitocosmética

A fitocosmética (do termo *fito* vem do latim que significa planta) é o segmento da cosmetologia, se dedica ao estudo e aplicações das substâncias activas extraídas de materiais vegetais. Pode-se referir como qualquer preparação composta por substâncias de origem natural, a ser posta em contacto com as diversas partes superficiais do corpo humano (Ruivo, 2012).

Actualmente, a fitocosmética tem evoluído e avançado bastante, a nível da investigação científica, tendo como base as vantagens que, as aplicações de produtos de origem vegetal naturais têm, comparativamente a alguns produtos sintéticos, que podem apresentar um certo grau de toxicidade. A sociedade exige produtos inovadores e tecnológicos, económicos, ecológicos e seguros, o que requer um enorme esforço por parte dos investigadores, na pesquisa de compostos distintos, naturais e eficazes (Ruivo, 2012).

1.3. *Humulus lupulus* L.

1.3.1. Descrição botânica e aspectos morfológicos

O Lúpulo (espécie *Humulus lupulus* L.) é uma planta perene pertencente à família Cannabaceae, são trepadeiras e herbáceas, cujos caules enrolam-se em qualquer estrutura para lhes servirem de suporte, são dióicas, isto é, têm flores femininas e masculinas em plantas diferentes que geralmente são diplóides. As folhas são de cor verde-escuras, em forma de coração com 3 a 5 lóbulos, dentadas e com uma superfície muito rugosa. As inflorescências masculinas apresentam panículas multiflorais. As inflorescências femininas formam os cones da planta onde se desenvolvem glândulas secretoras de lupulina, capazes de sintetizar e armazenar resinas e óleos essenciais ricos em terpenos fenólicos e polifenóis, alfa e beta ácidos (Almeida, 2017), são estes os compostos principais responsáveis pelo aroma e sabor, e conservação natural da cerveja (Silva, 2019).



Figura 1: A planta *Humulus lupulus* L.; Fonte: Flora-on: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 29-01-2020.

1.3.2. Componentes

Os produtos do metabolismo secundário que são a base da sua utilização, têm a sua produção muito influenciada por diferentes factores edafoclimáticos e não só, como: condições de cultivo, localização, ponto de maturação durante a colheita, método de secagem e condições climáticas e de armazenamento (Silva, 2019).

Os principais produtos naturais, resultante do metabolismo secundário das plantas de Lúpulo, produzidos nos cones de Lúpulo são resinas, óleos essenciais e polifenóis (Astray, *et al.*, 2020).

1.3.2.1. Resinas

As resinas totais podem ser divididas em dois tipos: resinas moles e duras, e são caracterizadas por sua solubilidade e insolubilidade em hexano. As resinas moles são formadas por dois ácidos amargos diferentes: α -ácidos e β -ácidos (humulonas e lupulonas, respectivamente), e as resinas duras formam-se a partir da oxidação das resinas moles (Astray, *et al.*, 2020).

1.3.2.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais obtêm-se a partir das matérias-primas de origem vegetal, por hidrodestilação. O óleo essencial do Lúpulo é produzido nas glândulas de lupulina, que são órgãos secretores, (Durelloa, Silvaa, & Jr, 2019) os seus componentes são divididos em três grandes grupos: hidrocarbonetos (alifáticos, monoterpénos e sesquiterpénos), oxigenados (álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres) e enxofre (tioésteres e terpenóides cíclicos sulfetos). Esses compostos têm aromas (sensação reconhecida pelo paladar) potentes e baixos limiares de odor (sensação reconhecida pelo olfacto), portanto, desempenham um papel fundamental no sabor geral da cerveja (Paventi, *et al.*, 2020).

1.3.2.3. Polifenóis

Os polifenóis são um amplo grupo de metabólitos secundários biologicamente activos, que podem ser agrupados em flavonóis, flavan-3-óis, ácidos carboxílicos fenólicos e outros compostos polifenólicos. Os extractos de Lúpulo com alto teor polifenólico podem ser usados como antioxidantes e/ou antimicrobianos de origem natural (Carbone, *et al.*, 2020).

1.3.3. Actividades biológicas dos compostos de Lúpulo

1.3.3.1. As propriedades de *Humulus lupulus* L.

Para além do Lúpulo ser conhecido como matéria-prima que fornece o sabor amargo e o aroma característicos à cerveja, também têm vindo a ser utilizados há muito tempo para fins medicinais, por revelar benefícios para a saúde como o seu potencial antioxidante, a sua actividade antimicrobiana (Nowak, *et al.*, 2020). Estas características devem-se ao seu alto teor de ácidos amargos e polifenóis, que inibem o crescimento de um amplo espectro de microrganismos. Também os seus compostos bioactivos como os β -ácidos humulona e lupulona e o prenilflavonóide o xantohumulol possuem propriedades com forte actividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e anticancerígenas (Machado, *et al.*, 2020).

1.3.4. Aplicações dos extractos de Lúpulo

Actualmente, o Lúpulo é uma espécie bem conhecida pela sociedade, devidos as suas múltiplas utilizações, como planta medicinal é utilizada para vários fins, como sedativo, anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidantes (estas propriedades provém da lupulina) (Goes, *et al.*, 2019). Também em produtos alimentares, para prolongar o prazo de validade de bebidas, industriais, como fonte alternativa de fibras para indústria têxtil, em medicina para auxiliar no tratamento dos sintomas da menopausa e no uso terapêuticos contra o cancro (Machado, *et al.*, 2020), mas a sua principal utilização é, no entanto, na produção de cerveja que representa o seu maior valor económico a nível internacional.

Os extractos de Lúpulo são frequentemente utilizados em produtos cosméticos devido à sua bioactividade e diversificação de aplicação, que são comercializados através de perfumes, champôs, loções e cremes (Sousa, 2005). Os cones de Lúpulo são incorporados em formulações, devido às suas propriedades antifúngicas e anti-seborreicas, para o tratamento da oleosidade e da caspa nos cabelos. E pelas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, destaca-se os efeitos do extracto do Lúpulo em bactérias causadoras da acne, podendo ser utilizado como uma alternativa para tratamento de pele, bem como para redução da queda ou crescimento capilar (Machado, *et al.*, 2020).

A aplicação do *Humulus lupulus* L. no gel serve como agente de anti-idade para aliviar os sinais de envelhecimento da pele. No caso do composto de xanthohumulol,

um dos flavonóides isolados da planta do Lúpulo, resultou eficaz na melhoria da estrutura e firmeza da pele, o que implica, um maior efeito protector na elastina, colagénio e fibrilina (Scarci, *et al.*, 2016).

1.3.5. Xanthohumol

A planta de Lúpulo tem um composto, o xanthohumol no qual é um produto natural encontrado nas inflorescências femininas, (Sun, *et al.*, 2020) é o composto principal das chalconas preniladas, uma subclasse derivada dos prenilflavonoides (Almeida N. E., 2014).

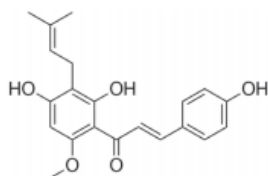


Figura 2: Representação química da molécula xanthohumol (Nowak, *et al.*, 2020)

Vale a pena destacar também que o xanthohumol só se encontra única e exclusivamente, no Lúpulo. Este composto, tem interesse pelos seus benefícios potenciais para a saúde, incluindo efeitos hepatoprotetores, actividades antivirais, antibacterianas, anticancerígenas e antioxidantes por possuir capacidade de inibir a produção de excessiva de ROS (espécies reactivas do oxigénio) e supressão da peroxidação (Lou, *et al.*, 2020)

1.4. *Thymus zygis* L. (Tomilho)

É um sub-arbusto perene, amplamente cultivado em todo o mundo, da família Lamiaceae. São usadas comumente as flores e folhas, por possuírem propriedades antimicrobianas para bactérias de Gram positivas e Gram negativas, assim como, capacidade antioxidante (Rota, *et al.*, 2008). O principal constituinte do óleo essencial de tomilho é o timol (com maior actividade), (Lee, *et al.*, 2005), podendo proporcionar benefícios à saúde, como no tratamento de doenças relacionadas com a produção de espécies reactivas e stresse oxidativo e também na prevenção do envelhecimento e danos celulares (Martins, *et al.*, 2013).

Em termos comerciais e científicos, nos últimos anos tem havido um aumento substancial do interesse e desenvolvimento de formulações cosméticas e metodologias, para manter uma aparência jovem, reduzindo os sinais de envelhecimento (Daudt,

2016). Desde muito cedo na história da humanidade, extractos de plantas têm sido utilizadas nesta perspectiva, por serem ricas em compostos como terpenos, alcaloides e fenóis (Binic, *et al.*, 2013). Além da importância dos compostos bioactivos presentes na formulação cosmética, também é fundamental o uso de conservantes eficazes, sendo que, existem plantas aromáticas e medicinais com actividade antimicrobiana já bem descritas, como é o caso do *Thymus zygis*. Foi com esse objectivo que o óleo essencial de tomilho foi utilizado como conservante nesta formulação cosmética.

1.5. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, com aproximadamente 2 m² de superfície e o mais pesado, cerca de um sexto do peso corporal (Gonçalves, 2016). Cobre quase todo o corpo à excepção dos orifícios genitais e alimentares, olho e superfícies mucosas genitais. É um órgão elástico e duro que se regenera em condições normais (Ferreira, Mejia, & Barros, 2015). Estudos recentes têm revelado que, a pele apresenta pH levemente ácido, além disso, pode apresentar valores compreendidos entre 4,0 e 5,9 uma vez que o pH da pele é frequentemente alterado em consequência de produtos tópicos inadequados (Frazão, 2017).

A *cúrtis* desempenha importantes funções, tanto químicas e físicas como protecção entre o ambiente exterior e interior do corpo. É uma barreira contra agressões externas, também protege contra a radiação ultravioleta (UV) através da produção dum pigmento: a melanina que dá cor à pele, percepção de estímulos: térmico, táctil, pressão, dor (através das células de Merkel) e protegendo o corpo da perda de água. Além destas, tem também funções microbiológicas e fisiológicas essenciais, como a defesa imunológica (através das células de LangerHans), defesa antioxidante, a termorregulação e síntese da vitamina D (Ferreira F. J., 2019).

A nossa pele, também é constituída por água, dando origem à plasticidade e elasticidade nas camadas superiores. Verifica-se que o conteúdo de água é mais elevado na epiderme (mais que 70%) e vai diminuindo na junção entre o estrato córneo e estrato granuloso, que pode ir entre 15 a 30% da sua capacidade de hidratação da pele, que é essencial para sua aparência, protecção, suavidade e reforço (Galvão, 2015).

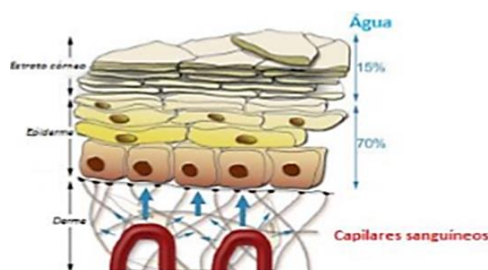


Figura 3: Teor de água em % representado nas camadas da pele; Fonte: BONTÉ,2011 Adaptado por (Galvão, 2015)

1.5.1. Tipos de pele

As várias formulações cosméticas são adequadas para uso tópico consoante o tipo de pele, neste contexto podemos considerar diferentes tipos e características de pele, como está resumido no quadro seguinte:








Tipos e Estados de Pele	Aspeto	Limpeza	Tratamento
 Normal	Mate, pele flexível, firme e sólida, poros apenas visíveis a olho nu, equilíbrio de secreções	Leites levemente detergentes, que mantenham o pH cutâneo	Crems diversos para peles normais, e de vez em quando usar cremes adstringentes
 Oleosa	Luzidio, com brilho oleoso pelo excesso de sebo, presença de comedões (pele seborreica) e microquistos (pela acneica)	Mais enérgica, com leites detergentes e adstringentes (não abusar)	Crems diversos, hidratantes, nutritivos e não untuosos (preferencialmente ácidos)
 Seca Alipica	Baço por insuficiência de matéria lipídica, tipo pergaminho, presença de prurido	Leites e cremes francamente gordos e pobres em detergentes	Crems protetores gordos (tipo A/O) ácidos, cremes hidratantes alternados com cremes antirrugas (evitar massajar)
 Seca Desidratada	Tipo pergaminho, insuficiência de água, tipo de pele dos idosos, com descamação		
 Mista	Zona "T" oleosa (testa, nariz e queixo) em simultâneo com superfícies deslipidadas (tendência a secura)	Tanto a limpeza como o tratamento deverão ter em conta ambas as realidades em separado, aplicando produtos adequados (pele seca e pele oleosa)	
 Sensível	Reativa, irritável, com tendência a desenvolver vermelhidões com prurido ou picadas como reação a intempéries ou após aplicação de produtos	Crems contendo extratos vegetais com ação calmante e venotónica, produtos cosméticos com extratos de plantas com ação hidratante, pulverizar com águas termais, protetores solares com fotoproteção adequada	
 Hiper-hidratada	Infiltrada, aspeto congestivo e túrgido, tendência para <i>couperose</i> , origem patológica ou medicamentosa	Evitar lavar a face com água extremamente quente ou fria, uso de sabões desaconselhado, optar por loções hipo-alérgicas	Geles com ação calmante (camomila), cremes hidratantes (calêndula), protetores solares com fotoproteção adequada, máscaras faciais hidratantes

Figura 4: Tipos e o aspeto da pele e o seu respectivo tratamento estético; Fonte: (Ruivo, 2012)

1.5.2. Estrutura anatómico da pele humana

1.5.2.1. Epiderme

É constituída por uma camada superficial, tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, apresentando ainda outros três tipos de células: melanócitos que proporcionam a pigmentação e fotoprotecção da pele, células de Langerhans e células de Merkel, que estão em constante actividade. A taxa de mitose nesta camada iguala a taxa de descamação que se calcula que, para a epiderme humana, equivale á renovação total a cada 15 a 30 dias, dependendo principalmente do local do corpo e da idade da pessoa (Galvão, 2015). Esta camada é rica em enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Adere estreitamente à camada mais profunda, a derme, essa junção é irregular. Ela também não é vascularizada, sendo nutrida por difusão a partir dos capilares da derme (Ferreira, 2019).

A epiderme é formada por cinco estratos: estrato córneo (superficial), estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal (profundo) (Ferreira & Rocha, 2018)

1.5.2.1.1. Estrato córneo

É a parte mais externa da pele, é a mais fina, é hidratada por um filme hidrolipídico, tem uma espessura variável, não é homogénea, tem diferenças significativas na sua estrutura e composição química, nas diferentes zonas do corpo. É composta de células achatadas, camadas de queratinócitos mortos e sem núcleo, descamando continuamente. Está constantemente exposto a fontes de radicais livres de oxigénio, como a luz ultravioleta e poluição. A sua principal função é proteger o organismo do meio exterior, actuando como uma barreira efectiva para a maioria dos microorganismos, produtos químicos e perda excessiva de fluidos, também dificultam a penetração de formulações dermatológicas e cosméticas, impedindo a acção dos fármacos e dos princípios activos (Ramalho, 2007).

Existem factores naturais de hidratação no estrato córneo, como a sua película hidrolipídica, resultante de uma mistura de moléculas higroscópicas, que através da sua ligação à moléculas de água, aumentam a sua plasticidade, e assim atuam como humectantes eficientes, mantendo o teor de água constante e retardando a perda de água para o ambiente.

Dentro deste estrato existem duas regiões, a proteica e a lipídica intersticial, a lipídica intersticial é contínua, estruturada e estável, ocupando cerca de 20% do volume e está organizada numa estrutura multi-lamelar. É composta por colesterol (27%), e ceramidas, que são lípidos (ácidos gordos complexos) presentes naturalmente na pele, essenciais para a sua barreira e para reter a hidratação) (41%), juntamente com ácidos gordos livres (9%), estéres de colesterol (10%), e sulfato de colesterol (2%) (Ramalho, 2007).

1.5.2.1.2. Estrato lúcido

É constituído por uma delgada camada de células achatadas. Representa meramente uma zona de transição comprimida entre o estrato córneo e granuloso (Ramalho, 2007).

1.5.2.1.3. Estrato granuloso

Contém células densas e numerosas, grânulos basófilos, definidos por queratinócitos (Ramalho, 2007), sendo responsáveis pela resistência da pele à abrasão e à perda de água por evaporação. Esses grânulos incorporam-se na membrana plasmática, expulsando o seu conteúdo para o espaço intercelular da camada granulosa, onde o material lipídico se deposita, contribuindo para formar uma barreira contra a penetração de substâncias, tornando a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo (Galvão, 2015).

1.5.2.1.4. Estrato espinhoso

É constituído por células grandes e poliédricas, ligeiramente achatadas, de elevada actividade proteica, com curtas expansões que, contêm feixes de filamentos de queratina. Essas expansões aproximam-se e mantêm-se unidas às células vizinhas através de desmossomas (adesão intercelular), o que confere à célula um aspecto espinhoso e mantém a coesão entre as células da epiderme e resistência ao atrito (Galvão, 2015).

1.5.2.1.5. Estrato basal

É rico em células estaminais e por isso é também chamado de germinativo, ou de Malpighii. Apresenta intensa actividade mitótica, sendo responsável, as células partem do estrato mais profundo (basal) e vão empurrando as células mais antigas que, se vão

achatando à medida que sobem, até ao estrato superior (córneo), através de um processo designado por queratinização que, por sua vez é responsável pela renovação da epiderme (Galvão, 2015). Também contêm filamentos de queratina, que se tornam numerosos à medida que a célula avança para a superfície. Os melanócitos, responsáveis pela pigmentação da pele, estão confinados a esta camada (Ramalho, 2007).

1.5.2.2. Derme

Abaixo da epiderme encontra-se a derme a camada profunda da pele, do ponto de vista histológico, e é mais espessa. É composta por tecido conjuntivo, essencialmente fibras de colagénio (dá resistência à pele) e elastina (proporciona flexibilidade), tem espessura variável, irregular devido à presença de papilas dérmicas que aumentam a área de contacto entre a derme e a epiderme que trocam nutrientes entre elas (Barata, 2019). As principais funções são: dar suporte à epiderme, unir a pele ao tecido subcutâneo. É resistente e protege o corpo contra danos mecânicos (Galvão, 2015).

São encontradas na derme as seguintes estruturas, derivadas da epiderme: folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Também estão presentes fibroblastos, macrófagos, anexos cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos e terminações nervosas e sensoriais, que tem origem na profundidade da derme, e terminam na superfície da epiderme (Barata, 2019).

A derme é constituída por dois estratos: o papilar (mais externa), e o reticular (mais profunda). Ambas as camadas contêm muitas fibras proteicas, sintetizadas pelos fibroblastos, assim como fibras elásticas, responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele.

1.5.2.2.1. Estrato papilar

É mais superficial e delgado, constituído por tecido conjuntivo frouxo com feixes de fibras de colagénio, fibras elásticas finas que forma as papilas dérmicas que aumentam o contacto entre a derme e a epiderme, permitindo a entrada de substâncias para a derme, é vascularizada tendo como função o transporte de nutrientes e de oxigénio para a camada epidérmica, sendo também responsável pela termorregulação (Santos, *et al.*, 2015).

1.5.2.2. Estrato reticular

É mais espesso, constituído por tecido conjuntivo denso não modelado, contém muitas fibras de elastina, responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele. É caracterizada por um entrelaçado reticular de fibras de colagénio (Ferreira, 2019).

1.5.2.3. Hipoderme

Por baixo da derme encontra-se a hipoderme que é a camada subcutânea mais profunda da pele, formada por tecido conjuntivo frouxo e constituído por células adiposas, ligadas à derme por fibras de colagénio, e estabelece a união aos órgãos internos. Sendo responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia (Ferreira, 2019).

Dependendo da região corporal e da variação da quantidade de gordura com os seguintes factores: idade, sexo e alimentação, esta camada tem uma espessura variável de tecido adiposo que, quando desenvolvida, constitui o panículo adiposo, que modela o corpo e constitui uma reserva energética, proporcionando protecção contra o frio e choques mecânicos. Exerce função de isolamento, reserva energética e protecção, possibilita a mobilidade das estruturas adjacentes (Ferreira, 2019).

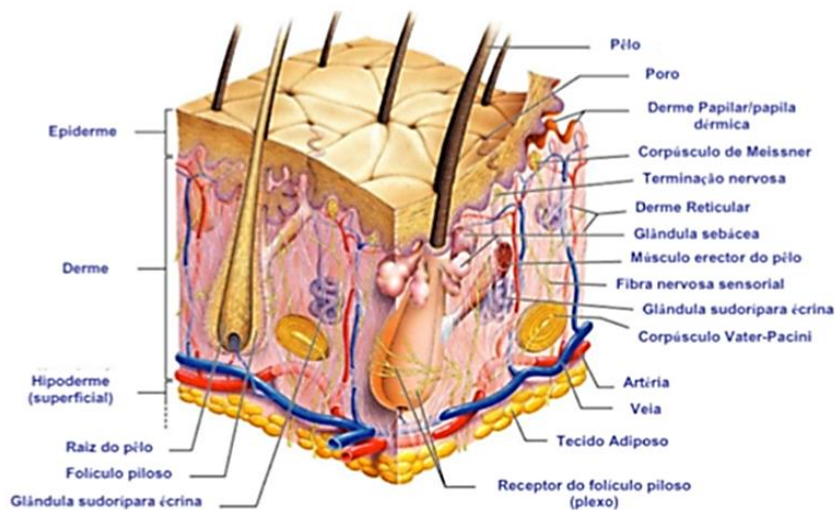


Figura 5: Representação histológica da pele; Fonte: (Ramalho, 2007)

1.5.3. Envelhecimento da pele

As pessoas têm necessidade de recorrer a soluções cosméticas, para cuidar da sua aparência com produtos de rejuvenescimento cutâneo, para manterem uma aparência mais jovem, bonita e firme. O processo de envelhecimento resulta numa

perda das funções fisiológicas, morfológicas e propriedades bioquímicas que, ocorrem progressivamente no organismo, ao longo do tempo, nos órgãos e tecidos, e em particular nas diferentes camadas da pele, acima descritas (Ferreira & Rocha, 2018).

Com a idade a pele envelhecida, mostra alterações profundas, mais na derme do que a epiderme. No entanto, a epiderme torna-se mais fina e a quantidade de colagénio diminui, a pigmentação vai-se tornando irregular, as infecções e lesões da pele tornam-se mais frequentes, e a reparação tecidular torna-se mais lenta (Barata R., 2019).

Há também uma diminuição na vascularização do tecido, e uma profunda atrofia no tecido conjuntivo, dérmico e epidérmico. Todo esse processo leva ao aparecimento de depressões e sulcos, chamados vulgarmente rugas. Também, as fibras de elastina da derme e a gordura da hipoderme, começam a diminuir, originando a flacidez, a desidratação da pele aumenta, pois, as glândulas sudoríparas e sebáceas perdem a sua funcionalidade (Barata R., 2019). Ao longo do tempo, a pele vai-se danificando por estar sujeita à radiação, com tendência a ganhar cada vez mais rugas. A radiação UV é responsável por 90% dos danos causados na pele, afecta a renovação celular, aumentando a produção de radicais livres que estão fortemente relacionados ao fotoenvelhecimento cutâneo. Adicionalmente, a radiação também promove a redução da síntese do colagénio (Ferreira & Rocha, 2018)

Com o objectivo de controlo do envelhecimento cutâneo, aos cosméticos são adicionados princípios activos com a finalidade de actuar como defesa antioxidante, estimular a renovação celular, síntese de colagénio e elastina e melhorar a hidratação, para reverter os sinais de envelhecimento e manter uma tez uniforme, ou adoptar uma acção de prevenção (Ferreira F. J., 2019). Este conceito básico de anti-idade é mais global e está associado a uma melhoria na qualidade de vida tanto física como psicológica. Assim, apesar de aceitarmos que o envelhecimento da pele é inevitável, a forma como envelhece, pode tornar-se mais lenta com a ajuda dos produtos cosméticos.

1.5.4. Cuidados a ter com a pele

Como referido anteriormente, o envelhecimento cutâneo é um processo complexo, onde ocorre perda de funções, mudanças nas características da pele e eventual senescência e / ou morte das células, que são determinadas por factores extrínsecos e intrínsecos.

Factores intrínsecos ou cronológicos ocorrem com o passar dos anos é o envelhecimento natural, sendo mais suave, lento e gradual. Está relacionado com

factores genéticos, hormonais, nutricionais e vasculares (Ferreira & Rocha, 2018), dos quais a presença de radicais livres, a diminuição da exfoliação fisiológica da epiderme, inibição da regeneração e crescimento tecidual, e inibição de processos de diferenciação (Barata R., 2019).

A pele sofre acções de diversos factores extrínsecos, como agressões do meio ambiente: poeira, calor, frio e a exposição às radiações solares (UV), as quais têm um papel acentuado no envelhecimento cutâneo. A radiação UVA atinge indirectamente a molécula de DNA, resultando em mutações, o seu poder de penetração consegue chegar até à derme. A radiação UVB possui uma acção directa sobre o DNA, danificando-o, esta fica retida ao nível da epiderme, não chegando à derme. Deste modo, a radiação UVA, é responsável por quase todas as características visíveis relacionadas com o fotoenvelhecimento, levando à formação de radicais livres que degradam os lípidos, provocando lacunas na barreira lipídica e mudanças na estrutura do colagénio e da elastina sendo o culpado por alterações como rugas, manchas e o próprio cancro de pele (Parrinha, 2014). Além do sol, há outros factores como, por exemplo o tabagismo, o consumo abusivo de álcool, privação de sono, alimentação inadequada, sedentarismo e stress (Ferreira & Rocha, 2018).

O envelhecimento intrínseco é um fenómeno inevitável, enquanto o extrínseco, ou fotoenvelhecimento, ou envelhecimento prematuro, é evitável, ou pelo menos controlável. Para cuidarmos da nossa pele e não ter uma aparência com papos e olheiras, sardas, hiperpigmentada e rugas associadas ao envelhecimento cutâneo, os cosméticos são importantes no embelezamento, tratamento, prevenção ou no retardar das alterações cutâneas causadas pelo envelhecimento.

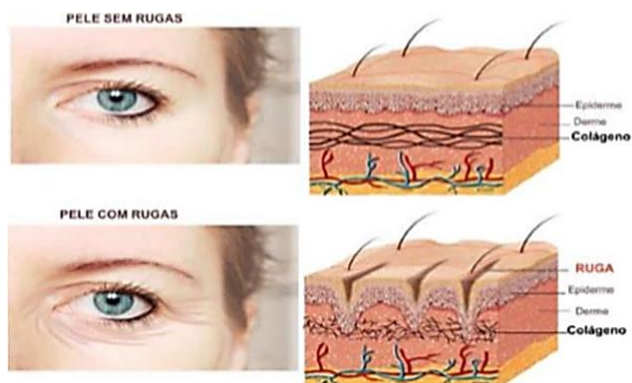


Figura 6: Formação de rugas; Fonte: (Ferreira & Rocha, 2018)

2. OBJETIVO

O objectivo deste trabalho é desenvolver um produto cosmético natural, à base de plantas, numa formulação em gel anti-idade no sentido de regenerar, proteger, opor-se à oxidação contra o envelhecimento e hidratar a pele, incorporando diferentes percentagens de extractos hidroalcoólicos obtidos de cones (flores) e partes vegetativas (folhas) de *Humulus lupulus* L. (Lúpulo) espontâneo e das cultivares Cascade e Polaris. Como conservante natural e por ser antimicrobiano, o óleo essencial de tomilho, foi opção escolhida para introduzir na formulação cosmética. Pretende-se também estudar os compostos fenólicos derivados do Lúpulo, como o xanthohumol que, é utilizado na cosmética, para tratamento e prevenção de rugas, e analisar a estabilidade físico-química da formulação e microbiológica dos extractos de Lúpulo e tomilho da formulação desenvolvida com esses extractos, com vista a determinar a melhor concentração de extractos e cultivar/espontâneo de Lúpulo a usar.

Capítulo 2: Procedimiento Experimental



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

3.1.1. Preparação das amostras

As amostras da planta Lúpulo das cultivares Polaris e Cascade foram recolhidas do campo experimental de Lúpulo na Quinta do Poulão da Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. A amostra do Lúpulo Espontâneo, foi recolhido na Quinta do Poulão afastada da área de influência do campo experimental. Foram recolhidas cones e partes vegetativas das plantas (folhas) em separado.

A amostra da planta *Thymus zygis* L. (Tomilho) subsp. *zygis* (serpão-do-monte), foram recolhidas em Rebordãos (Serra da Nogueira), Bragança, Portugal.

As amostras foram congeladas em fresco a uma temperatura de -20°C e assim mantidas até á sua utilização nas extracções subsequentes.

3.2. Desenvolvimento de formulação cosmética

A formulação cosmética foi desenvolvida com base nas seguintes matérias-primas: Metilcelulose (3,7%); Álcool 96% (18,9%); Água destilada (78%); Glicerina (0,13%); Extracto de *Humulus lupulus* L. (variável); e óleo essencial *Thymo zygis zygis* (variável). A quantidade de extracto de Lúpulo e do óleo de tomilho depende da concentração em estudo em cada amostra.

3.3. Extracção e análise de óleos essenciais (GC e GC MS)

O óleo essencial da parte aérea de *Thymus zygis* L., usado como conservante natural das formulações cosméticas, foi obtido por hidrodestilação dos cones femininos e folhas, usando um sistema Clevenger. Para tal pesou-se 70g da amostra que foi colocada num Erlenmeyer com 800ml de água ultrapura, o material foi deixado 3 horas a destilar após a água se encontrar em ebulição. Seguidamente recolheu-se, determinou-se o rendimento, identificou-se e armazenou-se o óleo essencial a -20 °C. Para uma análise qualitativa, recorreu-se a Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) (Figueiredo, Martinez, Burity, & Chanway, 2008).

3.4. Extracção e análise de voláteis

Para a extracção de voláteis do Lúpulo foi utilizado um destilador Likens-Nickerson (LN) durante três horas, tendo-se utilizado como solvente pentano previamente destilado. Para tal pesou-se 10g de amostra de cada variedade de Lúpulo que foi colocada num Erlenmeyer com 800ml de água ultrapura. Neste sistema, foi deixado três horas a destilar após a água se encontrar em ebulição, a partir do erlenmeyer que está sobre uma placa de aquecimento com temperatura entre 95-96°C, e no condensador (Heto HMT 200), com temperatura 5°C, ocorre a extracção com o solvente (pentano), que é fornecido pelo balão menor. Devido a suas diferenças de densidade e solubilidade, a água e o solvente podem ser separados sendo o óleo recolhido com o solvente, evitando o contacto posterior com a água aquecida. Após a extracção dos voláteis, o extracto obtido foi concentrado utilizando um evaporador rotativo (Rotavapor R110, Sotel) e a amostra foi recolhida num vial âmbar com rolha de teflon, colocada a -20°C e posteriormente analisada em Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) (Figueiredo, *et al.*, 2008).

3.5. Extractos hidroalcoólico de *Humulus lupulus* L.

Para a preparação dos extractos hidroalcoólicos, 5 g das partes florais e a mesma massa das partes vegetativas de cada cultivar, ou espontâneo, em separado, foram submetidas a uma lavagem com água corrente. De seguida preparou-se uma mistura de etanol/água (80:20, v/v) sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, por trinta minutos. O preparado foi filtrado através de um filtro de papel Whatman N° 4 e o resíduo re-extraído pela repetição do procedimento mais duas vezes.

3.5.1. Determinação de compostos fenólicos totais

A extracção sólido-líquido com solução etanólica 80% foi utilizada para preparar os extractos de cones e partes vegetativas de Lúpulo espontâneo e das variedades Cascade e Polaris. Os compostos fenólicos totais foram determinados usando o método Folin-Ciocalteu (Rota, *et al.*, 2008).

3.6. Identificação dos compostos fenólicos do Lúpulo

Os extractos hidroalcoólicos foram evaporados a 40 °C com 400mbar (Rotavapor R110, Sotel). A fracção resultante foi congelada, liofilizada e mantida sob vácuo em condições de -44°C e 0,5mbar (Telstar LyoQuest), em um exsiccador no

escuro, para uso subsequente e foi obtido o rendimento das amostras liofilizadas que se encontra em anexo na tabela 19.

Para a identificação dos compostos fenólicos, o perfil fenólico do extracto hidroalcoólicos de Lúpulo (10 mg/mL) foi determinado por análise de cromatografia líquida usando um aparelho Ultimate 3000 (Dionex Co., San Jose, CA, EUA) equipado com um detector de diodo ultimate 3000 (Dionex Co., San Jose, CA, EUA) e um espectrómetro de massa Thermo LTQ XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), seguindo um método descrito por Afonso, *et al.*, (Afonso, *et al.*, 2018). A eluição do gradiente foi realizada com uma mistura de 0,1% (v / v) de ácido fórmico em água (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). O gradiente de solvente usado consistia em uma série de gradientes lineares a partir de 5% do solvente B e aumentando para 23% em 14,8 min, a 35% em 18 min, e a 100% em 21 min ao longo de três minutos, seguido por um retorno para as condições iniciais. As condições de operação do espectrómetro de massa foram realizadas usando as previamente descritas (Afonso, *et al.*, 2018). Alguns compostos fenólicos foram identificados utilizando compostos *standard*. Nos casos em que o composto comercial padrão não estava disponível, a identificação do composto fenólico foi baseada na interpretação dos dados espectrais de ultravioleta (UV) e espectrometria de massa (MS), além de comparação com a literatura (Afonso, *et al.*, 2018).

3.7. Testes de estabilidade da formulação cosmética

3.7.1. Teste organoléptico

Este teste tem como objectivo ver as características: visualmente, táctil, aroma e consistência, de uma forma empírica da formulação em gel, para poder avaliar de uma forma simples, a homogeneidade e a qualidade.

3.7.2. Teste de temperaturas e humidades

Para este teste utilizou-se um grama de cada amostra, colocadas em eppendorfs de 1,5ml com três repetições cada, no total 57 eppendorfs e foram armazenadas numa incubadora (Mettler) a uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $60\% \pm 5\%$ de humidade relativa (HR) por duas semanas e a uma temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $75\% \pm 5\%$ de HR durante o mesmo tempo. As características organolépticas de cada formulação (cor, cheiro, separação de fases, textura e consistência), assim como o valor de pH, foram analisadas de oito em oito dias.

3.7.3. Teste de temperaturas extremas

Testou-se a variação de temperaturas extremas, consecutivamente, com o objectivo de observar, se havia ocorrência de separação de fases, formação bolhas, ou alguma alteração na formulação que, não fosse a ideal para o produto cosmético final.

Foi submetida 1 grama de amostra em eppendorfs de 1,5ml, em ciclos de congelamento e descongelamento. Estes ciclos alternavam 24 horas em temperaturas baixas, num congelador, e 24 horas em temperaturas elevadas, numa incubadora (pol-eko aparatura). As temperaturas foram as seguintes: -12°C, 37°C, -12°C, 45°C, -12°C, 50°C e -12°C.

3.7.4. Teste espectrofotométrico

As amostras foram diluídas em água destilada, colocadas em cuvetes de quartzo e posteriormente submetidas à análise espectrofotométrica, em espectrofotómetro (vwr uv-1600pc spectrophotometer), sendo o espectro traçado, na região do UV-Visível, entre 210 e 600 nm. Foi usado como controlo negativo, o gel sem princípio activo, nem conservante, o branco foi feito com o solvente (água destilada).

3.8. Testes físico-químicos

3.8.1. Teste de pH

Usou-se 3 gramas de cada formulação, em gel e dissolveu-se em água destilada, para a medição do pH com ajuda de um medidor de pH digital (pH 7310 wtw xylem brand inolab).

3.8.2. Densidade

A densidade relativa foi determinada pela fórmula:

$$Dr = \frac{m}{v}$$

Dr : Densidade relativa

m : Massa (g)

v : Volume (ml)

Foi usado como método o deslocamento de água, para determinar a densidade relativa (Chorilli, 2007).

3.8.3. Teste de vibração mecânica

Este teste visa replicar as condições de transporte, indicando se os movimentos de vibração, do mesmo, podem alterar a amostra. O procedimento utilizado foi 1 grama de cada amostra, em eppendorfs de 1,5ml, submetidos a 2000 RPM em vibração em um agitador vórtex (Velp científica zx3 advance vortex mixer) por 10 segundos, foram feitas 3 réplicas por amostra.

3.8.4. Teste de centrifugação

Para verificar a estabilidade da formulação, na qual pode haver tendência à separação de fases, centrifugamos a 25°C, 3000 RPM, por 30 minutos numa centrifuga (hettich mikro 24-48 r zentrifugen) com 1 grama de cada amostra em eppendorfs de 1,5ml, foram feitas 3 réplicas por amostra.

3.8.5. Teste da textura

Este teste tem como objectivo demonstrar a coesividade, consistência, firmeza e índice de viscosidade das amostras, para tal, as amostras foram avaliadas num texturometro (Stable Micro Systems TA-XT Plus), equipado com uma sonda acoplada de um disco de compressão de 35mm, que imprime uma força sobre um recipiente cilíndrico, de 50mm de diâmetro. O equipamento operou a 100mm de altura, a coluna de gel tinha 50mm (50g) e ocupava cerca de 50% do volume total do recipiente, foram usadas 38 amostras em duplicado, uma foi o controlo que é o gel de metilcelulose e as amostras foram os géis com os extractos das cultivares e espontâneo com diferentes percentagens (1,25%, 2,55 e 5%). Após iniciar o seu movimento, o disco de compressão exerce uma força na superfície da amostra por um curto período de tempo, e desce a uma profundidade de 20mm, a uma velocidade constante, utilizando uma velocidade de retorno de 20mm.min⁻¹ até retornar à superfície da amostra.

3.8.6. Teste de luz

Foram colocados 15 gramas de cada amostra, o gel de metilcelulose e as amostras com os géis com os extractos das cultivares e espontâneo a 1,25%, 2,55 e 5%, em placas de Petri de plástico transparente estéril, estas foram submetidas a condições extremas de iluminação, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, usando uma lâmpada de luz “daylight”, a uma temperatura de 24°C ±2, durante 15 dias.

Foi avaliada a ocorrência de separação de fases, a alteração da coloração das amostras ou desidratação das mesmas.

3.8.7. Teste de cor

Este teste foi feito em conjunto com o teste de luz, as mesmas amostras e durante o mesmo tempo. Foi feito com um colorímetro (Chroma meter cr-400 konica minolta) um equipamento de medição de cor, no qual medimos no primeiro dia e no último dia, desses 15 dias.

3.9. Testes microbiológicos dos extractos de Lúpulo e tomilho

A pele e as mucosas têm, entre outras funções, o papel de defesa do organismo de ataques microbianos. Contudo, estas podem ser danificadas aumentando a probabilidade de ocorrer uma infecção microbiana ao ser utilizado um produto cosmético. Deste modo, é importante avaliar a possível contaminação microbiana dos extractos hidroalcoólicos de Lúpulo e do óleo essencial de *Thymus zygis*. Neste estudo procedeu-se à análise microbiológica de espécies patogénicas para a pele.

3.9.1. Actividade antibacteriana

Testou-se a actividade antibacteriana dos extractos hidroalcoólicos de Lúpulo e do óleo essencial de *Thymus zygis* a 5%, para podermos avaliar o desenvolvimento de microrganismos no produto cosmético identificados como espécies patogénicas para a pele, como as bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* NCTC 6571) e bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* NCTC 9001, e *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662) da National Collection of Type Cultures, operada pela Public Health England. Neste estudo todas as estipes foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (Himedia) e incubadas a 37°C por 24 h. A concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, usando um protocolo padrão modificado e descrito por Afonso, *et al.*, (Afonso, *et al.*, 2017). As suspensões bacterianas foram preparadas por suspensões de colónias directas em água destilada esterilizada, e ajustadas para obter $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (UFC) / mL, aproximadamente equivalente a 0,5 unidades McFarland. Um inóculo final de $1,5 \times 10^5$ UFC / mL foi necessário para suspensões diluídas na proporção de 1:100 em meio líquido Mueller-Hinton (MH). Em seguida, cem

microlitros do meio líquido de Mueller-Hinton foram distribuídos em poços de placas de microtitulação de 96 poços (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

As soluções hidroalcoólicas dos extractos de Lúpulo foram adicionadas a uma concentração final de 10 mg/ml e em seguida diluído em série (1:2) na placa para uma concentração final de 0,625 mg/ml, e o óleo essencial de tomilho foi diluído em DMSO a 5%, em seguida adicionada na placa e diluído em série (1:2) para uma concentração final de 0,020 mg/ml. Para finalizar 100 microlitros de suspensão de bactérias foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Para cada bactéria, extracto de planta e para o meio de Mueller-Hinton, foi realizado um controlo positivo para garantir a viabilidade do crescimento da bactéria e um controlo negativo para a esterilidade dos extractos da água e do meio.

O ensaio para cada microrganismo foi repetido 2 vezes. Todos os processos descritos foram realizados na câmara de fluxo laminar para segurança biológica de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

O MIC foi definido como a concentração mais baixa na qual o crescimento visível foi inibido, enquanto o MBC é a concentração mais baixa da substância testada que tem um efeito bactericida. Os valores de MBC foram determinados subcultivando 10 µL da cultura de cada poço negativo em ágar Mueller-Hinton e, em seguida, determinando a diluição na qual o crescimento foi detectado. O solvente sem extractos serviu como controle negativo (Afonso, Pereira, Neto, Silva, & Cardoso, 2017).

3.9.2. Actividade antifúngica

Testou-se pelo método de difusão em disco em agar (meio de leveduras sólido) a actividade antifúngica nos extractos hidroalcoólicos de Lúpulo e do óleo essencial de *Thymus zygis* a 5%, no crescimento de levedura, nomeadamente *Candida albicans*. Após a elaboração dos respectivos meios de cultura (Anexos na tabela 17 e 18) estes foram autoclavados a 125 °C durante 20 minutos e posteriormente colocados em placas de Petri estéreis (10 mL). Em cada uma das placas foram colocados 100 microlitros de *C. albicans* e espalhado, homogeneamente pela superfície, utilizando um espalhador. Seguidamente cada placa foi dividida em quatro partes tendo-se colocado em cada uma um disco de papel (6mm de diâmetro), previamente esterilizados e embebido em 100 microlitros das respectivas diluições seriadas (1:2) do óleo em DMSO e dos extractos em Tween 80, e no centro um círculo de papel com antibiótico Fluconazol. Controlos: Foram adicionalmente seleccionadas 4 placas de Petri por cada meio, uma apenas com o

meio, com o microrganismo, com o microrganismo mais o disco do antibiótico (fluconazol), com o microrganismo e o tween 80, com o microrganismo e DMSO e outra com o microrganismo e água. Por fim todas as placas de Petri nas quais foram inoculadas a levedura foram guardadas a 25^oC por 24 horas. As placas foram observadas após 24 horas na estufa, tendo-se verificado se existia halo de inibição em cada uma, o que permitiu observar se ocorria inibição do crescimento microbiano (Frazão, 2017).

3.10. Aceitação em painel de voluntários do produto cosmético

O estudo realizou-se através de dois questionários de autopreenchimento, previamente estruturado de acordo com os objectivos deste estudo. O primeiro questionário é constituído por quatro secções, a primeira secção contém perguntas sociodemográficas para obter informação geral e estilos de vida do inquirido, na segunda secção pretende-se avaliar os cuidados de pele, a terceira secção é autoavaliação da pele do inquirido, já a quarta pretende-se determinar o nível de conhecimento de produtos cosméticos naturais. Para o segundo questionário os participantes usaram o gel com extracto versus controlo (gel de metilcelulose) e foi aplicado por um período de 10 dias. O segundo inquérito é sobre a satisfação pós-uso do gel no qual metade dos inquiridos usou o controlo e a outra metade usou o gel anti-idade com extracto de Polaris flor a 2,5% (o que foi o melhor extracto nos ensaios organolépticos e de estabilidade físico-química), de forma a avaliar a eficácia do mesmo na perspectiva do utilizador.

Os dados utilizados no presente estudo foram feitos com o consentimento informado dos inquiridos, assegurando-se a todos os valores e direitos constitucionais dos indivíduos. Os inquiridos foram informados previamente sobre carácter voluntário da sua participação, sobre os objectivos da investigação. A informação recolhida foi tratada de forma a garantir a confidencialidade e anonimato e os dados exclusivamente usados para o âmbito desta investigação.

Capítulo 3: Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição química

4.1.1. Composição do óleo essencial de *Thymus zygis zygis*

O rendimento do óleo essencial da parte aérea de *Thymus zygis zygis*, com base na massa fresca da planta, foi de 1,14% (Tabela 1), em que carvacrol, terpinen-4-ol, p-cimeno e trans- hidrato de sabineno foram os compostos principais (43,60%, 25,80%, 24,10% 15,8%, respectivamente). Apesar de Rota, *et al.*, (2008), apontarem o timol e linalol, como os compostos comuns mais abundantes entre as variadas espécies de tomilho, o mesmo não se verificou neste estudo, em que estes ocorrem em menores quantidades (Rota, *et al.*, 2008). No entanto, vários autores reforçam a actividade antimicrobiana e antioxidante, que o tomilho tem, como ele é rico nestes derivados fenólicos, apresenta fortes características de conservação (Amarti, *et al.*, 2011; Martins, *et al.*, 2013).

Tabela 1: Rendimentos e composição percentual do óleo essencial das partes aéreas de *Thymus zygis*.

Compostos	Valores médios (%)
óxido de cis-linalol	0.60
hidrato de cis-sabineno	0.10
Cânfora	3.20
Borneol	1.2
terpinen-4-ol	25.8
α -terpineol	11.8
Timol	0.30
Carvacrol	43.60
α -tujeno	1.60
α -pineno	0.80
Canfeno	1.00
3-octanol	1.00
β -mirceno	1.00
α -terpineno	1.40
p-cimeno	24.10
Limoneno	0.20
trans- β -ocimen	1.10
hidrato de trans-sabineno	15.80
Rendimento (% , v/w)	1.14

4.1.2. Composição fenólica de extractos de Lúpulo

Os compostos fenólicos do Lúpulo encontram-se principalmente nos cones de Lúpulo, (Durelloa, Silvaa, & Jr, 2019), que apresentam um bom resultado como antioxidante e antimicrobiano (Silva, 2019).

Em geral, os compostos fenólicos, nos extractos hidroalcoólico, encontram-se em maior quantidade nas flores, do que nas partes vegetativas. A maior quantidade de fenóis detectada foi na parte vegetativa do espontâneo e nas flores da cultivar Polaris (tabela 2), estatisticamente não são significativos.

Esses compostos são produzidos principalmente em cones, estão presentes logo na formação, acumulando-se ao longo de sua maturação, enquanto outras partes da planta apenas os sintetizam em pequenas quantidades, os compostos fenólicos são utilizados na fabricação de cerveja, para conferirem o amargor e os aromas e as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Bocquet, Sahpaz, Hilbert, Rambaud, & Rivière, 2018).

Tabela 2: Rendimento de extração (%) e compostos fenólicos (mg GAE / g planta) de um Lúpulo espontâneo e duas variedades, (média ± DP).

Amostras	Rendimentos (%) ¹	Compostos fenólicos totais (mg GAE/g planta) ²
E.F.	13.11	ND
E.V.	21.1	3.1±0.52
C.F.	30.3	10.4±2.1
C.V.	9.3	2.1±0.7
P.F.	25.8	22.7±2.4
P.V.	11.8	1.1±0.2

¹Valores médios; ²Valores médios ± DP; **F**- Flores; **V**- Partes Vegetativas; **E**- Espontâneo; **C**- Cascade; **P**- Polaris; ND- Não determinado; GAE- Equivalentes de ácido gálico.

4.1.3. Identificação dos compostos fenólicos do Lúpulo

O conhecimento sobre os compostos fenólicos presentes na planta do Lúpulo é de suma importância, em virtude de estes estarem relacionados com o potencial bioactivo, nomeadamente com o poder antioxidante e a capacidade antimicrobiana, entre outros (Silva, 2019) A caracterização do perfil de compostos fenólicos nas amostras do Lúpulo foi realizada por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ tendo-se obtido, dados de tempo de retenção (RT), o máximo de ultravioleta (UVmax), ião pseudomolecular ([M-

H]), iões do fragmento principal em MS², permitindo a identificação dos compostos fenólicos apresentado na tabela 16 nos anexos.

Em detalhe, o pico definido como o número 1 ([M-H]- a *m/z* 191) foi identificado como ácido quinico (UVmax em torno de 264 nm e fragmentos MS² em *m/z* 173,111), este ácido orgânico está presente em todos os extractos (McMurrough, *et al.*, 1984; Choi, *et al.*, 2017), uma vez que, segundo a literatura, é um composto fenólico natural desta planta, na forma de ácido quinico livre e de baixa massa molecular (Monteiro & Trugo, 2005).

O ácido protocatecuico 4-*O*-glucosídeo (UVmax em torno de 315 nm e fragmentos MS² em *m/z* 269,153 (como o mais abundante), 109), encontra-se no pico 2 ([M-H]- a *m/z* 315), este ácido aparece nos cromatogramas somente no espontâneo flor (Tang, Dunshea, & Suleria, 2019). O ácido ferúlico 4-*O*-glucosídeo (UVmax em torno de 309 nm e fragmentos MS² em *m/z* 337,209,191 (como o mais abundante), 181), encontra-se no pico 4 ([M-H]- a *m/z* 355), este ácido aparece nos cromatogramas somente em *Polaris* vegetal (Tang, Dunshea, & Suleria, 2019). O pico 37 ([M-H]- a *m/z* 353) foi identificado como xanthohumol (UVmax em torno de 281, 346 nm e fragmentos MS² em *m/z* 247, 233 (como o mais abundante), 199), apenas nas flores do Lúpulo, conforme anterior descrito (Loureiro, Jiménez, Sendón, Quirós, & Barbosa-Pereira, 2019).

A fracção dos α -ácidos é composta por uma mistura de cinco humulonas análogas, sendo os seus principais constituintes a humulona, a cohumulona, que são os mais abundantes, a adhumulona, a prehumulona e a poshumulona presentes no Lúpulo (Durelloa, Silvaa, & Jr, 2019). Nesta análise comprovamos que existe adprehumulona/prehumulona (UVmax em torno de 283 nm e um fragmento MS² em *m/z* 306), encontra-se no pico 41 ([M-H]- a *m/z* 375), este α -ácido aparece nos cromatogramas somente nas flores de *Polaris* (Hsu & Kao, 2019).

Identificamos, como consta na tabela 16 nos anexos, *beta*-ácidos tipo lupulona como a mais abundante e nos flavonóides temos derivados como os hexósidos do caempferol, representado no pico 21 como o mais abundante na *Cascade*, e da quercetina no Lúpulo (Durelloa, Silvaa, & Jr, 2019).

Para outras variedades de Lúpulo foi também encontrada idêntica distribuição destes compostos. A título de exemplo, foram identificados compostos como a rutina, quercetina e ácido ferúlico, inclusive na *Cascade* (Almeida, *et al.*, 2020).

O ácido protocatecuico 4-O-glucosídeo, derivado hidroxilado de ácido benzóico, bem como o ácido ferúlico e ácido quínico, derivados do ácido cinâmico, estão presentes na variedade espontânea do Lúpulo. Além da reconhecida atividade antioxidante, destacando-se a propriedade sequestra-te de radicais livres, mesmo em reduzidas concentrações, estes possuem ainda actividade antiviral, efeitos antialérgicos, antimicóticos (Broinizi, *et al.*, 2007; Silva, 2016; Wang, *et al.*, 2009)

Vários autores apontam o xanthohumol como o principal flavonóide prenilado do Lúpulo, possuindo propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e sedativas (Legette, *et al.*, 2012; Maietti, *et al.*, 2017).

Os α -ácidos detém vários modos de acção na prevenção ou tratamento potencial de muitas doenças, incluindo doenças metabólicas, inflamatórias, e prevenção de carcinogénese (Seliger, *et al.*, 2018).

A quercetina-O-rutinósido, quercetina-3-O-glucosídeo, derivados da quercetina, bem como o caempferol-3-O-glucósido e caempferol-3-O-rutinósido, derivados do caempferol, foram também identificados no cultivar espontânea, como se verifica na tabela 16 em anexos. Estes foram igualmente reconhecidos na espécie *Humulus lupulus* L. selvagem, em estudos realizados por Maietti, *et al.*, (2017), reconhecendo para todos a grande capacidade antioxidante.

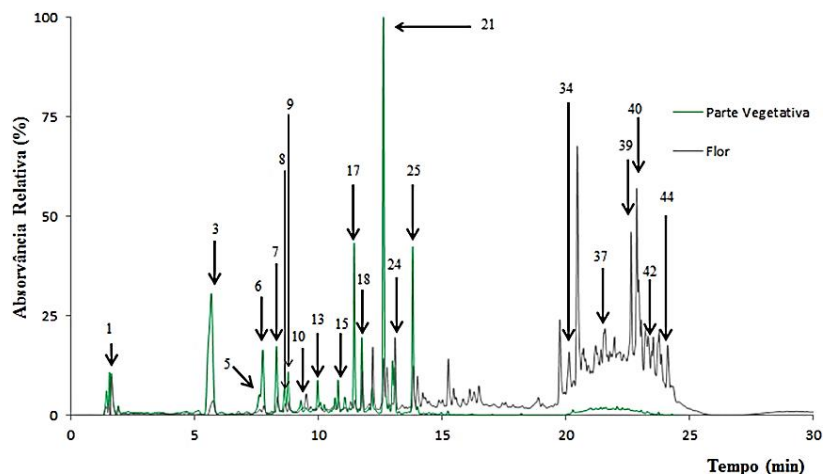


Figura 7: Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) da variedade Cascade de *Humulus lupulus* a 280 nm. Os números na figura correspondem aos picos UHPLC-DAD-ESI-MSn descritos na Tabela 16.

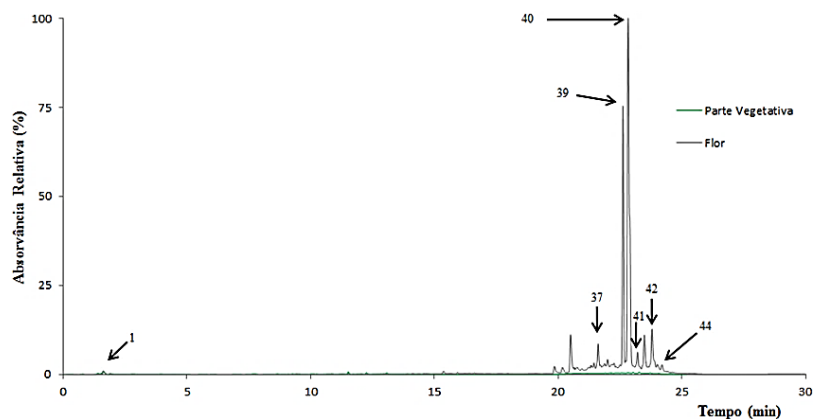


Figura 8: Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) do Polaris de *Humulus lupulus* a 280 nm. Os números na figura correspondem aos picos UHPLC-DAD-ESI-MSn descritos na Tabela 16.

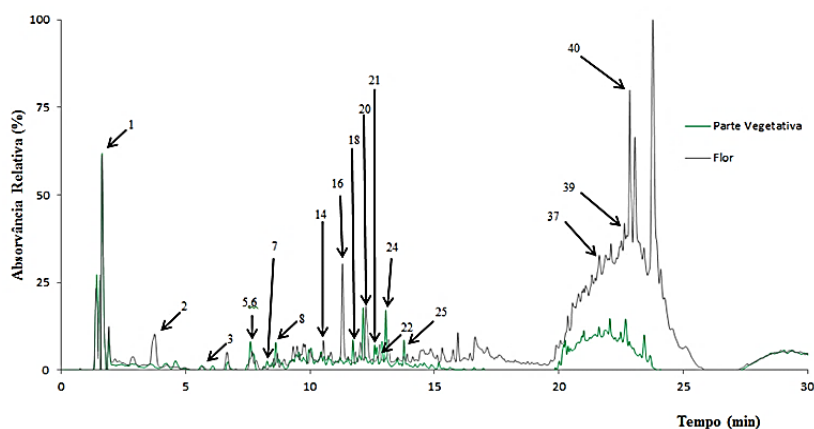


Figura 9: Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) do Espontâneo de *Humulus lupulus* a 280 nm. Os números na figura correspondem aos picos UHPLC-DAD-ESI-MSn descritos na Tabela 16.

4.2. Testes de estabilidade do produto cosmético

4.2.1. Teste organoléptico

As características organolépticas do gel de metilcelulose são as seguintes: têm a cor transparente, um odor fresco a álcool, aspecto homogêneo, consistência boa e não pegajosa, a sua textura é suave e refrescante, espalha-se bem e seca/absorve rápido na pele e fácil remoção. No gel com extractos de Lúpulo, ficou com as características iguais ao gel de metilcelulose, e ficou com uma cor levemente amarelada e o odor a Lúpulo, em que a cor não influencia na pele, nem o odor a Lúpulo fica na pele. Ademais, todas as formulações apresentaram odor característico a tomilho, relativo ao óleo essencial adicionado à formulação com finalidade de conservação. Estas são características importantes para facilitar a aplicação e absorção na pele nas formulações cosméticas (Lopes, *et al.*, 2020).

4.2.2. Teste de temperaturas e humidades

Após este período de 15 dias, foi verificado as características organolépticas de cada amostra (cor, odor, separação de fases, textura e consistência), na qual foram comparadas com as amostras no seu estado natural/inicial e no final do ensaio. Tanto a uma temperatura de $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ a $60\% \pm 5\%$ de humidade relativa (HR) e a uma temperatura de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ a $75\% \pm 5\%$ de HR, não houve alteração as características organolépticas, permaneceram estáveis fisicamente durante os 15 dias, não apresentando separação de fases ou indícios de instabilidade, mas o valor de pH teve uma ligeira diminuição, como podemos observar no gráfico 1. Segundo, Pianovski, *et al.*, (2008) a diminuição do pH pode representar uma oxidação da formulação mas não foi considerada instável, pois não apresentou alteração nas características organolépticas e para além dessa diminuição ligeira do ph, a formulação, manteve-se dentro da faixa do pH dermatológico (Peruzzi & Georgetti, 2015; Pianovski, *et al.*, 2008).

4.2.3. Teste de temperaturas extremas

Neste teste de variação de extremas temperaturas consecutivamente, com o objectivo de acelerar possíveis reacções como separação de fases que se dá por instabilidade na formulação, que pode se originar de uma incompatibilidade entre matérias-primas ou pela evaporação de água da formulação (Silva, Bortolotto, Deuschle, Claudino, & Deuschle, 2019), ou alguma alteração na formulação para detecção de sinais de instabilidade. As mudanças de ciclos de congelamento e descongelamento alternam 24 horas em temperaturas elevadas e 24 horas em temperaturas baixas, verificando a não ocorrência de qualquer alteração/mudança nas amostras analisadas, ou seja, o gel é estável e não precisa de alterar nada na formulação, nem em termos de condições de armazenagem (Ferreira & Zatti, 2013).

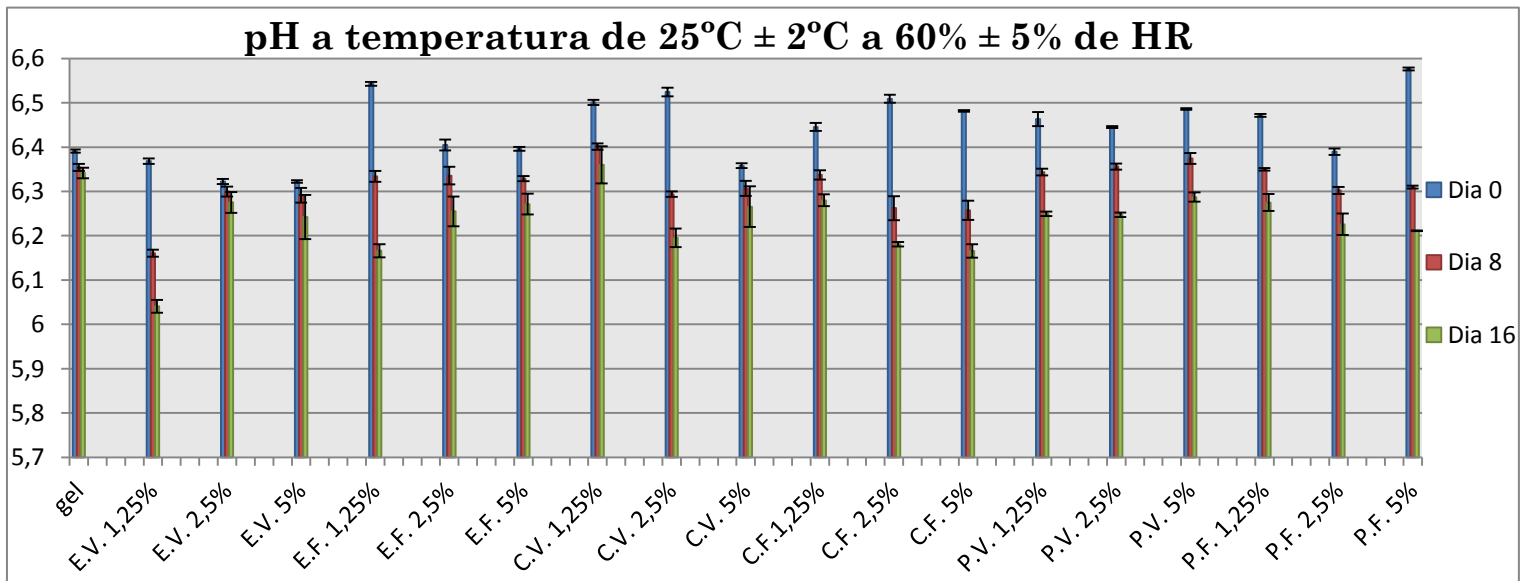
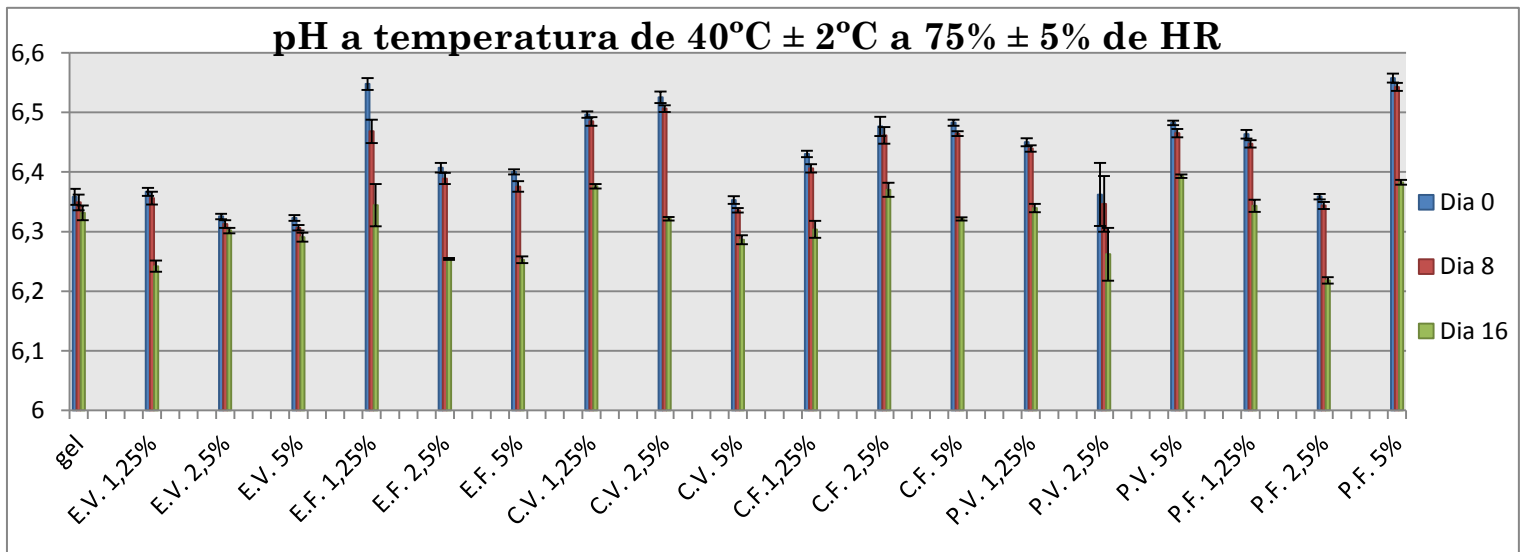


Gráfico 1: Representação do pH lido a diferentes dias e temperaturas de 25°C ± 2 °C a 60% ± 5% de umidade relativa (HR) e 40°C ± 2 °C a 75% ± 5% de HR. (média ± DP)

4.2.4. Teste espectrofotométrico

Este teste visa verificar o comportamento do gel, determinado se ele é diferente ao adicionar os extractos de Lúpulo em diferentes concentrações, verificando a ocorrência de mudanças na intensidade das bandas (efeitos hiperocrômico (aumento da intensidade de absorção) ou hipocrômico (diminuição da intensidade de absorção)) ou variações no comprimento de onda em que ocorre a absorção máxima (efeitos batocrômicos (mudança na absorção para maiores comprimentos de onda, devido à substituição ou efeito do solvente) ou hipsocrômico (mudança na absorção para menores comprimentos de onda, devido à substituição ou efeito do solvente)) indicam a ocorrência de alteração na sua cor ou intensidade, o que pode ser um indicativo de instabilidade da formulação.

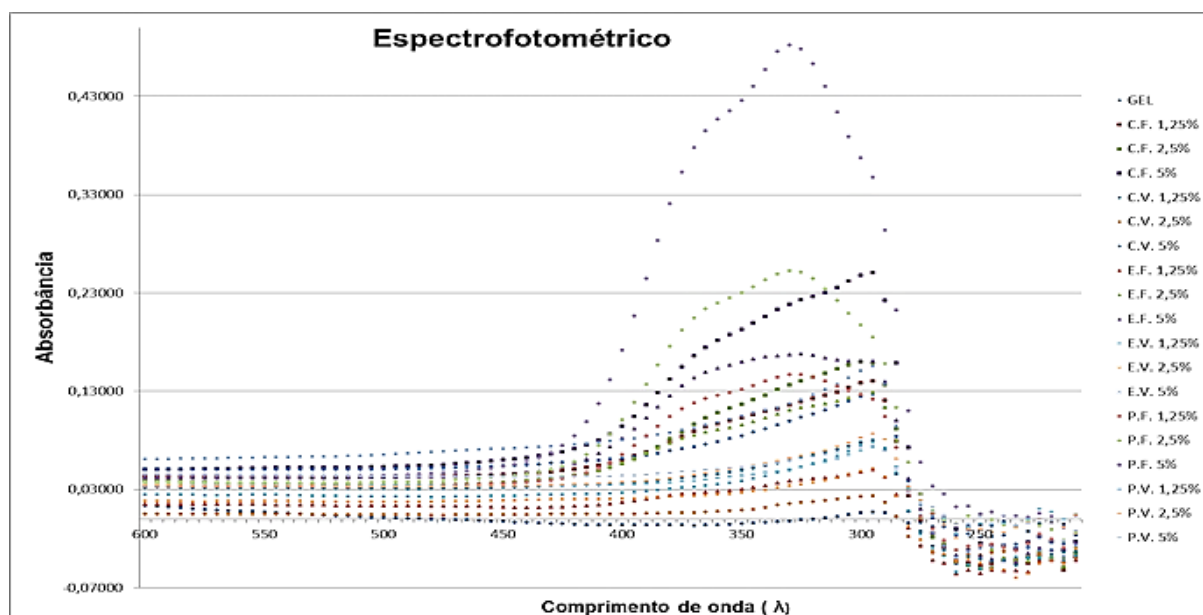


Gráfico 2: Espectro UV-VIS das amostras em diferentes concentrações; C.F.- Cascade flor; C.V. – Cascade vegetal; E.F. – Espontâneo flor; E.V. – Espontâneo vegetal; P.F. – Polaris flor; P.V. – Polaris vegetal.

No gráfico 2, pode-se observar que nos dezanove espectros as bandas de absorção estão na mesma posição, verificando a existência de um pico máximo de absorção, entre 300 nm a 350 nm de comprimentos de onda. No qual o pico máximo é do gel de variedade Polaris dos cones a 5% com uma absorvância de 0,482, a seguir está a variedade Polaris dos cones a 2,5% com uma absorvância de 0,252, no entanto o gel de metilcelulose foi o mais neutro em absorvância devido que se manteve próximo do zero. Esses picos devem-se aos compostos na formulação testada, que possivelmente possuem os grupos funcionais como os fenóis, os quais apresentam bandas típicas nesses comprimentos de onda (Spies, 2018).

Nas formulações existe um efeito hipercrômico em relação ao gel. Essa mudança possivelmente deve-se às proporções de alguns compostos, o que se traduz em uma mudança na intensidade das bandas. Percebe-se também que existe um efeito hipsocrômico em que é respectivo devido aos baixos comprimentos de onda que se localizam mais próximos do azul. Isto é, considerando os compostos fenólicos que existem na variedade de Polaris nos cones, como já referido nesta dissertação, os compostos possíveis entre 300 nm a 350 nm de comprimentos de onda são Cohulupona, Xanthohumol, Cohumulona, Humulona, Colupulona e Lupulona (Tedone, *et al.*, 2020; Durello, 2019; Durello, Silveira, & Jr, 2019).

4.3. Testes físico-químicos

4.3.1. Teste do pH

Como se pode observar no gráfico 3, no dia zero foi medido o pH do gel sem os extractos hidroalcoólicos e em seguida com os extractos hidroalcoólicos de Lúpulo Espontâneo e as variedades Cascade e Polaris, e também o controlo (gel de metilcelulose, sem os extractos). O pH foi medido passados três dias, uma semana e quinze dias após a produção, com duas repetições, os valores apresentados são valores médios \pm desvio padrão correspondentes (DP).

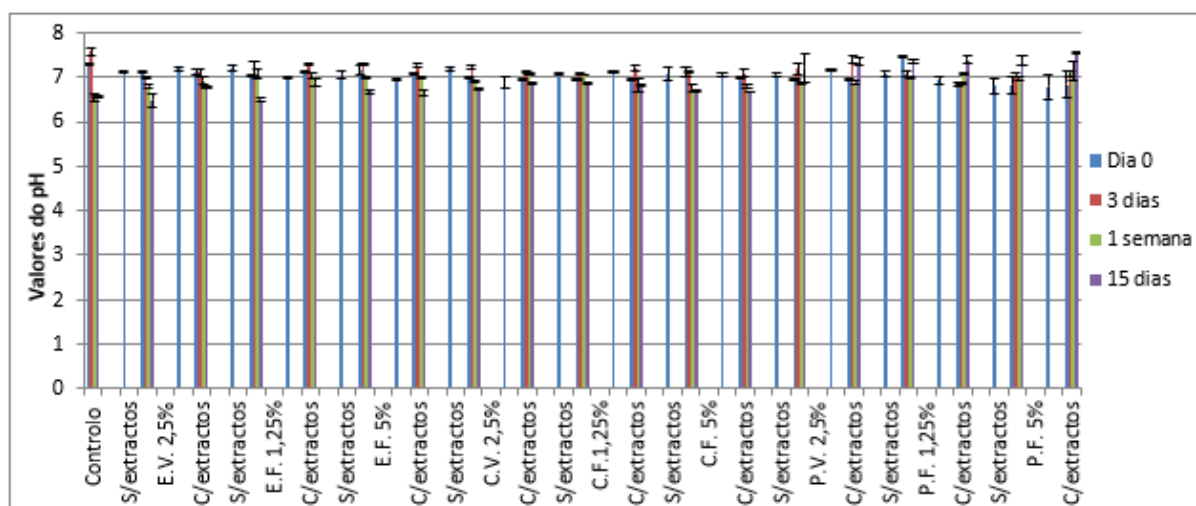


Gráfico 3: O pH das amostras em diferentes concentrações; C.F.- Cascade flor; C.V. – Cascade vegetal; E.F. – Espontâneo flor; E.V. – Espontâneo vegetal; P.F. – Polaris flor; P.V. – Polaris vegetal. (média \pm DP)

A formulação controlo (Gel) apresentou um valor de pH levemente ácido. Contudo, após os quinze dias todas as formulações com as variedades apresentaram uma tendência de pH entre 7,5 a 6,5. No gráfico é possível ver que o pH é muito estável e levemente ácido. O controlo teve no dia zero e três o maior valor de pH 7,299 e 7,590 depois uma semana e

quinze dias o pH desceu para 6,5. Todas as amostras diminuiram ligeiramente o pH durante os 15 dias excepto a variedade Polaris que aumentou o seu pH sem passar 7,5.

Dessa forma, produtos destinados a um contato prolongado com a pele devem possuir pH entre 4,0 e 5,9 aproximando-se do pH cutâneo, (Frazão, 2017), logo, as amostras analisadas apresentam-se incompatíveis com o pH cutâneo, precisando de ajustes.

4.3.2. Densidade

Foi medida a densidade relativa de cada formulação com o extracto de Lúpulo respectivo variedade em várias concentrações.

Tabela 3: Densidade relativa de cada formulação com as suas respectivas variedades em várias concentrações.

	Densidade relativa		Densidade relativa
Esponâneo vegetal		Esponâneo flor	
1,25%	1	1,25%	0,857
2,5%	1	2,5%	0,857
5%	1	5%	0,857
Cascade vegetal		Cascade flor	
1,25%	1	1,25%	1
2,5%	1	2,5%	1
5%	1	5%	1
Polaris vegetal		Polaris flor	
1,25%	1	1,25%	0,857
2,5%	1	2,5%	0,857
5%	1	5%	0,857
Gel	1		

Na medição da densidade relativa foram obtidos valores de 1 e 0,857 tal como se pode observar na tabela 3. Pode verificar-se que as formulações com as cultivares de Lúpulo espontâneo e Polaris, tanto para as partes vegetativas como para as florais possuem os mesmos valores de densidades relativas (1 e 0,857, respectivamente) para todas as concentrações de extracto. Já a cultivar Cascade, na parte floral apresentou valores de densidade 1, diferentes das restantes. A determinação da densidade relativa é importante, visto que pode estar relacionada ao controle de aeração da formulação cosmética, ou seja, se a densidade diminuiu isso poderá querer dizer que, houve a incorporação de ar no produto, pois pode influenciar essa diferença de densidade (Chorilli, 2007; Coelho, 2014).

4.3.3. Teste de vibração mecânica

Neste parâmetro avaliamos o comportamento do cosmético em relação ao transporte. Todas as amostras foram submetidas ao referido teste, não tendo sido verificadas quaisquer alterações ou separação de fases, o que pode indicar a estabilidade do produto relativamente a este parâmetro, pelo que se pode concluir que podem ser transportados por transporte terrestre sem ocorrer alterações nas mesmas (Farias, 2009).

4.3.4. Teste de centrifugação

Neste teste, a centrifugação promove o stresse nas amostras, simulando o aumento da força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases e formação de sedimento (Vieira, 2017). As amostras consideradas, por este ensaio, inicialmente estáveis, foram então submetidas a centrifugação e verificando-se que continuavam iguais e não havendo alterações nas amostras logo nem ocorrência de instabilidade, que é indicativo da não necessidade de reformular o gel.

4.3.5. Teste da textura

A textura das várias amostras de gel foi avaliada em texturómetro, com realização de testes de extrusão inversa (back extrusion), com registro dos parâmetros firmeza, consistência, índice de viscosidade, e coesividade. O gráfico 4, mostra os resultados fornecidos pelo software texturómetro para as amostras, possibilitando a identificação dos parâmetros registados pelo equipamento.

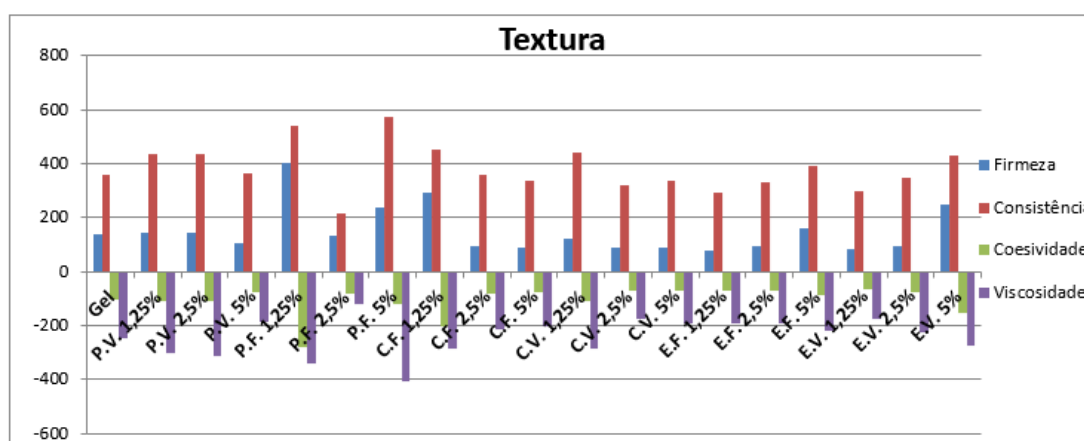


Gráfico 4: Os valores dos parâmetros firmeza, consistência, índice de viscosidade, e coesividade, medidos pelo equipamento texturómetro. (média \pm DP)

A análise do perfil da textura é importante sobre o comportamento do gel para o desenvolvimento da formulação e para a percepção sensorial serem otimizadas. Fizemos

uma comparação com o gel de metilcelulose com o gel de extractos hidroalcoólicos com várias percentagens de Lúpulo, uma vez que a adição desses extractos pode levar alteração dos parâmetros, comprometendo a qualidade da formulação.

No gráfico 4, permite observar que a firmeza foi considerada muito superior para P.F. 1,25% 401,19g, em relação às demais amostras avaliadas e em comparação com o gel de metilcelulose que é de 139,4g. Isso significa que foi mais difícil para a sonda comprimir essa amostra, o que pode sugerir que apresenta uma dureza maior que as demais amostras.

No mesmo gráfico 4, permite observar que, assim como a firmeza, a consistência das amostras foi considerada mais expressiva para P.F. 1,25% com 542,32g.sec e P.F. 5% 575,15g.sec, em relação às demais amostras avaliadas e em comparação com o gel de metilcelulose que é de 360,06g.sec.

No mesmo processo de extrusão inversa permite observar a coesividade, que de acordo com o gráfico 4, a coesividade da amostra foi considerada a mais expressiva para P.F. 1,25% com -280,04g, P.F. 2,5% com -79,48g esta entre a media das restantes amostras avaliadas e em comparação com o gel de metilcelulose que é de -103,39g. O oposto acontece para E.V. 1,25% com -62,86g que, por serem fluidas, facilitam o movimento de extrusão da sonda.

Por fim, a viscosidade foi observado como sendo superior para P.F. 5% com -406,57g.sec em relação às demais amostras avaliadas e em comparação com o gel de metilcelulose que é de -247,29g.sec. A mais inferior foi a P.F. 2,5% com -118,6g.sec, o que revela que a sua viscosidade é menor.

Estas informações do texturómetro são importantes para os atributos sensoriais relativos à etapa pré-aplicação e ficamos a saber mais sobre a formulação cosmética. Estes atributos, a consistência, a firmeza, a pegajosidade, a fluidez e a espalhabilidade são percebidos antes da aplicação do produto sobre a pele, por exemplo quando a pessoa retira um pouco do produto cosmético da sua embalagem com os dedos.

4.3.6. Teste da luz

A exposição do produto à radiação luminosa pode alterar a cor, odor, separação de fases e levando à degradação dos componentes da formulação aumentando a velocidade de decomposição do produto, essas alterações dependem da facilidade com que a luz se propaga na amostra. Por isso, avaliação de estabilidade é importante no teste à exposição de luz no qual ocorreu separação de fases, isto é, indicativo de instabilidade no produto cosmético devido a ocorrência de desidratação, embora não exista alteração da coloração. Isto quer dizer que o produto não pode estar exposto à luz, para minimizar esse efeito, tem de estar devidamente numa embalagem não transparente para proteger da luz (Almeida M. M., 2012; Silva, Bortolotto, Deuschle, Claudino, & Deuschle, 2019).



Figura 10: O gel com extracto da variedade Cascade flor a 1,25%, com a observação de separação de fases.

4.3.7. Teste da cor

O espaço de cores $L^* a^* b^*$ (também conhecido como CIELAB) é actualmente um dos espaços de cores mais populares para medir a cor do objecto e é amplamente utilizado em praticamente todos os campos como alimentares, têxteis, cosméticos, entre outros. É um dos espaços de cores uniformes definidos pela CIE em 1976, a fim de reduzir um dos principais problemas do espaço de cores Yxy original no qual as distâncias iguais no diagrama de cromaticidade x, y não corresponderam a diferenças de cores percebidas iguais (Minolta, 1994).

A determinação de cor é um importante parâmetro para indicar a qualidade de um produto, com estes valores conseguimos avaliar as amostras e conseguir identificar a diferença de cor, pois então neste espaço de cores o L^* é a luminosidade (claro a escuro), a^* e b^* são coordenadas rectangulares de cromaticidade (Croma) em que $+a^*$ direcção vermelha e $-a^*$ direcção verde, $+b^*$ direcção amarela e $-b^*$ direcção azul, o centro é acromático. O c^* é o croma, em que o zero é o centro e aumenta de acordo com a distância do centro o que indica a saturação, o h é o ângulo de cor (HUE) da matriz no qual os valores do ângulo 0° vermelho,

90° amarelo, 180° verde e 270° azul (Souza, *et al.*,2020). e quanto maior for o valor do ângulo HUE da amostra mais amarela ela será.

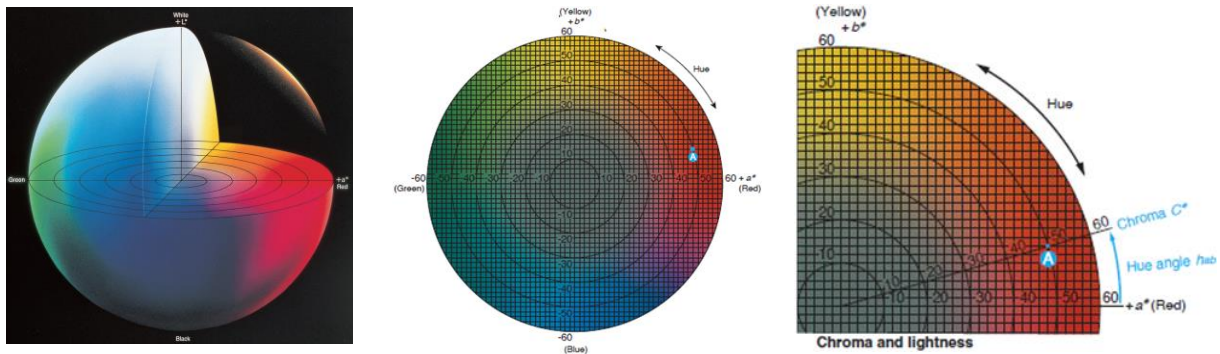


Figura 11: Representação do sólido de cor no espaço para L^* , a^* e b^* , em termos Munsell Hue (Mínolta, 1994).

Sendo assim, como se pode ver na figura 11, juntamente com o gráfico 5, verificamos que a luminosidade é alta, por isso está clara, está mais próxima a cor branca, o c^* como tem valores pequenos entre 1,34 a 2,85 está mais perto do centro, tem pouca saturação, como a^* tem valores baixos entre 0,09 a 0,39 e o b^* tem valores baixos entre 1,25 a 2,85 logo não há grande cor nas amostras e o ângulo (HUE) com valores entre 74° a 87° da amostra é ligeiramente amarela. Em comparação com o gel sem nenhum extracto com os géis com as variedades dos extractos hidroalcoólicos, em relação ao primeiro dia, que se observa no gráfico 5, e após 15 dias, estão todos entre os mesmos valores, logo o gel com adição de extractos não altera muito a cor. Apesar da adição dos extractos que têm ainda pigmentos, e, portanto, cor, não alteram substancialmente a absorvência das formulações (Souza, *et al.*,2020).

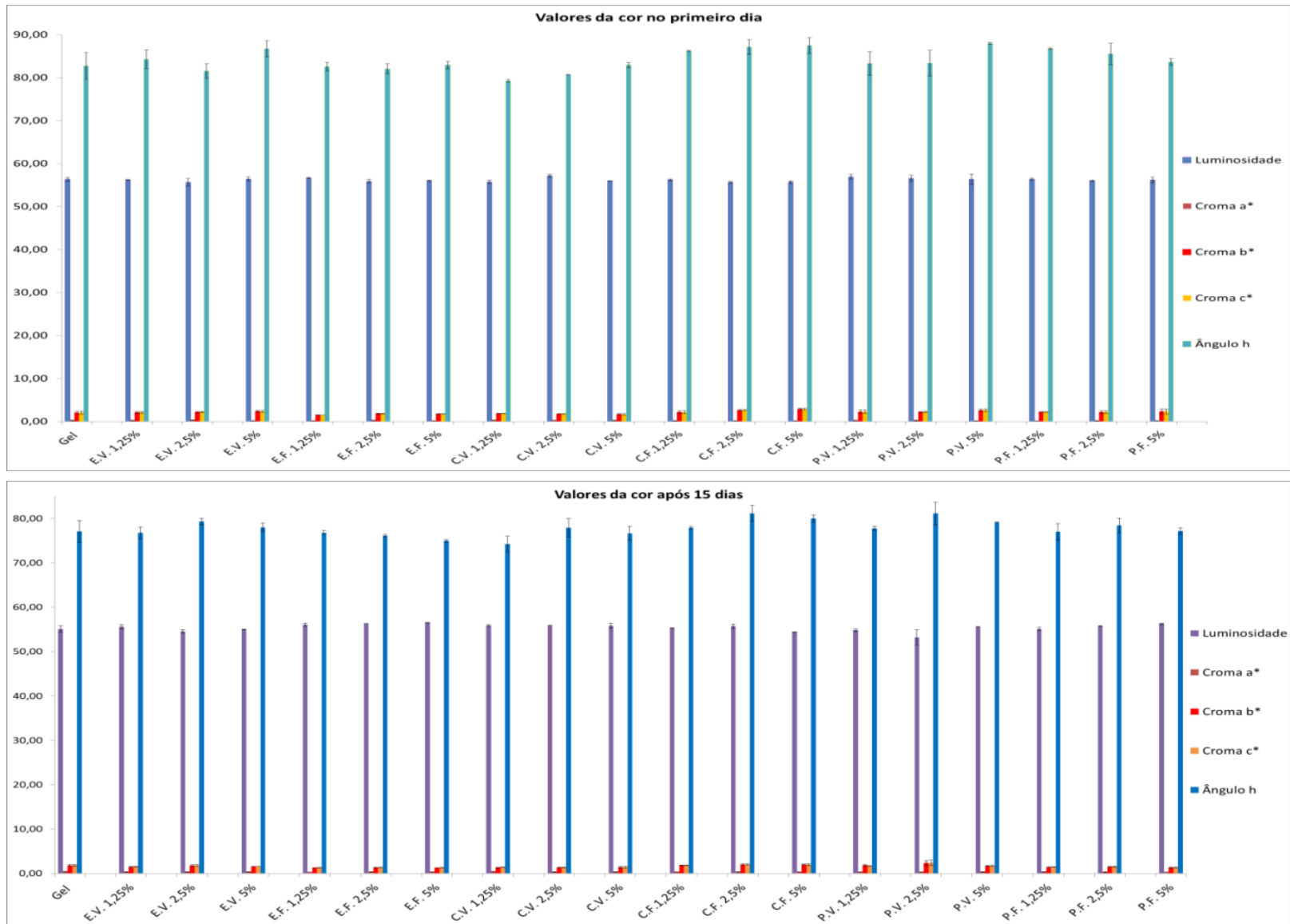


Gráfico 5: Representação gráfica dos valores de medição da cor para L*, a*, b*, c* e h. (média ± DP)

4.4. Teste microbiológicos

4.4.1. Actividade antibacteriana

Procedeu-se à avaliação da actividade antimicrobiana para verificar que tanto os extractos hidroalcoólicos de Lúpulo, como o óleo essencial de tomilho têm, ou não, propriedades antibacterianas para a conservação e preservação do produto cosmético e comprovar a sua segurança. Pela análise dos resultados conclui-se que por se tratar de extractos hidroalcoólicos, o solvente, etanol, inibiu o crescimento bacteriano, uma vez que não se registrou nenhum crescimento bacteriano para além do crescimento nos controlos positivos com o solvente água. Tendo-se verificado que no Lúpulo não houve actividade antimicrobiana nas diluições sucessivas (1:2) do extracto até a quarta diluição, levando a concluir que os valores dos respectivos MIC e MBC, são superiores aos valores das concentrações testadas. No óleo apresentou uma capacidade inibitória e bactericida para *Staphylococcus aureus* de MIC e MBC mais de 0,031mg / ml, respectivamente, *Escherichia coli* de MIC e MBC de 0,31 mg / ml, respectivamente e *Pseudomonas.aeruginosa* de MIC e MBC de 1,25 mg / ml, respectivamente, visto na tabela 4.

Tabela 4: A capacidade bactericida para o tomilho.

	<i>T. zygis</i> (mg/ml)	
	MIC	MBC
Bactérias		
<i>Escherichia coli</i>	0,31	0,31
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,031	0,031
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,25	1,25

Como não foi observada qualquer actividade antimicrobiana nos extractos do Lúpulo, nas concentrações testadas, contra as estirpes de bactérias utilizadas, no qual vários estudos feitos ao Lúpulo defendem que possui propriedades antibacterianas e antifúngicas (Bartmanska, et al., 2018), com o óleo essencial de tomilho foi eficaz. Segundo estes autores o *T.zygis* mostrou uma elevada inibição e bactericida devido ao componente fenólico o timol e linalol para as mesmas bactérias estudadas neste ensaio (Rota, et al., 2008).

4.4.2. Actividade antifúngica

Neste estudo o Lúpulo e o óleo apresentam actividade antifúngica contra a levedura *Candida albicans*, tendo um halo de inibição três vezes maior que o controlo, como podemos observar nas tabelas 5 e 6 onde estão registados os tamanhos dos halos de inibição.

Tabela 5: Representação da actividade antifúngica do tomilho e controlo e os halos de inibição em centímetros.

	Diluições de serie (1:2)			
	1/2	1/4	1/8	1/16
Óleo essencial de tomilho				
Halos	0,95cm	0,6cm	0,2cm	Não teve
Fluconazol (Controlo)			100µg	
Halo		0,3cm		

Tabela 6: Representação da actividade antifúngica do Lúpulo e os halos de inibição em centímetros.

	Diluições de serie (1:2)			
	1/2	1/4	1/8	1/16
Cascade				
Flor	0,5cm	0,5cm	0,4cm	0,3cm
Vegetal	0,5cm	0,5cm	0,5cm	0,5cm
Polaris				
Vegetal	0,75cm	0,74cm	0,70cm	0,70cm
Flor	0,70cm	0,70cm	0,65cm	0,65cm
Espontâneo				
Vegetal	0,5cm	0,5cm	0,4cm	0,3cm
Flor	0,5cm	0,5cm	0,3cm	0,3cm

De acordo com os estudos sobre o óleo essencial de *Thymus zygis* L., está comprovado que apresenta actividade antifúngica contra a *Candida albicans*, devido aos compostos carvacrol, timol e p-cimeno, presentes no tomilho (Frazão, 2017). Para o Lúpulo, também se comprova actividade antifúngica contra a *Candida albicans*, devido aos (alfa e beta ácidos) ácidos amargos que contem (Olsovska, *et al.*, 2016).

4.5. Aceitação em painel de voluntários do produto cosmético

Relativamente à caracterização sociodemográfica (tabela 20 que se encontra em anexo) participaram neste estudo um total de 20 indivíduos, dos quais, 16 (80%) pertencem ao sexo

feminino e 4 (20%) pertencem ao sexo masculino. A idade dos inquiridos encontra-se entre os 18 e os 59 anos, sendo que, 45% têm idades compreendidas entre os 18 e os 29 anos. No que diz respeito ao estado civil dos inquiridos, 90% são solteiros, 5% estão casados ou em união de facto, 0% estão divorciados e 5% são viúvos. Relativamente às habilitações literárias, 5% dos inquiridos possuem habilitações 9º ano, 5% concluiu o ensino secundário, 10% têm o Bacharelato ou curso tecnológico pós-secundário e a grande maioria 80% possui graus académicos superiores. Relativamente ao rendimento económico, foi possível observar que 10% dos indivíduos tem menos de 500 €, 45% recebem um rendimento entre 500€ a 1000€ e 45% recebem entre 1000€ a 3000€. Quanto ao local de residência, dos 20 questionados, 14 (70%) residem em Portugal numa zona urbana e 6 (30%) em Portugal numa zona rural. A situação profissional a maioria é estudante com 55%, não é activo profissionalmente 5%, trabalhador por conta de outrem a 35% e trabalhador por conta própria 5%, a maioria da profissão 55% é estudante. A maioria dos agregados familiares até 3 pessoas (55%). Relativamente ao peso 35% está entre 50kg a 60kg, 50% com 60kg a 70kg e 15% com mais de 70kg. As alturas com 60% estão entre 150cm a 160cm, 30% entre 160cm a 170cm e com mais de 170cm temos 10%. Sobre os problemas/doenças de pele do inquirido, 5% tem rosácea, 20% acne, 5% dermatite atópica e a maioria não tem qualquer problema de pele 70%. Avaliamos, na perspectiva do inquirido, a frequência com que realiza os seguintes comportamentos de saúde, como podemos observar na tabela 7.

Tabela 7: Frequência com que realiza os seguintes comportamentos de saúde.

	% (n)			
	Nunca ou raramente	Às vezes	Frequentemente	Sempre
Estar ao sol durante longos períodos de tempo	60%(12)	30%(6)	10%(2)	0
Dormir 7 a 8 horas por noite	5%(1)	30%(6)	60%(12)	5%(1)
Fazer uma alimentação rica em peixe	15%(3)	25%(5)	60%(12)	0
Fazer uma alimentação rica em frutas, vegetais e fibras (legumes, cereais)	10%(2)	25%(5)	60%(12)	5%(1)
Comer alimentos pré cozinhados	30%(6)	40%(8)	30%(6)	0
Consumir refrigerantes	30%(6)	40%(8)	30%(6)	0
Tomar pequeno-almoço	5%(1)	5%(1)	5%(1)	85%(17)
Fazer exercício físico	15%(3)	30%(6)	55%(11)	0
Beber álcool	30%(6)	60%(12)	5%(1)	5%(1)

Fumar	30%(6)	55%(11)	10%(2)	5%(1)
Usar protector solar	55%(11)	30%(6)	15%(3)	0
Beber 1,5l-2l água por dia	5%(1)	15%(3)	50%(10)	30%(6)

Nesta segunda secção no qual pretendemos avaliar os cuidados de pele, fez-se as seguintes questões: “Se apenas pudesse escolher um dos seguintes cuidados para a sua pele, qual seria?”, os inquiridos mencionaram mais vezes que preferiam usar um creme hidratante (80%), relativamente à questão “Você colocou maquilhagem para ir a uma festa e, horas depois, chegou a casa de madrugada morta de cansaço, o que faz?”, mencionaram mais vezes que mesmo cansada, recorro à dupla água micelar e algodão ou desmaquilhante para retirar toda a maquilhagem (65%), a próxima questão foi “Com que frequência você passa o protector solar?”, responderam com a maioria que só usam apenas quando vão à praia (80%) e a questão “Você acorda com uma borbulha gigante no rosto, o que faz?”, a maioria dos inquiridos respondeu que aplica um gel/creme secante para tratar a inflamação e garantir um alívio instantâneo (60%). Os seguintes produtos para cuidados de rosto (excepto maquilhagem) 75% usam frequentemente, a maquilhagem 65% usa diariamente e o protector solar 80% usam nunca ou raramente. Na tabela 8 observa-se os produtos cosméticos de rejuvenescimento de rosto que o inquirido utilizou (e/ou está a utilizar) e com que periodicidade (tendo em consideração os últimos 12 meses), conforme está apresentado em baixo.

Tabela 8: Os produtos cosméticos de rejuvenescimento de rosto que os inquiridos utilizaram (e/ou está a utilizar) e com que periodicidade (tendo em consideração os últimos 12 meses).

	% (n)						
	Nunca	Diariamente	1 ou 2 vezes por semana	1 ou 2 vezes por mês	3 em 3 meses	6 em 6 meses	Anualmente
Refirmante de rosto	0	20%(4)	5%(1)	5%(1)	15%(3)	55%(11)	0
Protetor solar	0	30%(6)	5%(1)	5%(1)	5%(1)	55%(11)	0
Produtos anti-rugas contorno dos olhos	5%(1)	15%(3)	10%(2)	5%(1)	10%(2)	40%(8)	15%(3)
Produtos anti-rugas rosto	5%(1)	25%(5)	15%(3)	10%(2)	20%(4)	25%(5)	0
Produto despigmentante	70%(14)	0	0	0	20%(4)	5%(1)	5%(1)
Esfoliante	0	75%(15)	10%(2)	5%(1)	5%(1)	5%(1)	0
Produto hidratante de rosto	0	80%(16)	15%(3)	5%(1)	0	0	0
Água micelar	10%(2)	70%(14)	20%(4)	0	0	0	0
Hidratante de lábios	0	70%(14)	10%(2)	0	5%(1)	15%(3)	0
Máscara anti-idade	20%(4)	0	5%(1)	5	10%(2)	30%(6)	10%(2)
Limpeza de pele	0	70%(14)	15%(3)	5%(1)	5%(1)	5%(1)	0
Ampola anti-idade com ácido hialurónico	5%(1)	0	0	5%(1)	60%(12)	20%(4)	10%(2)

Na terceira secção, ao avaliar os resultados obtidos da autoavaliação da pele dos inquiridos (tabela 9), pode-se afirmar que maior parte tem a pele oleosa (35%), na zona T (85%). No grau de hidratação a maior parte dos inquiridos incomodam-se onde a pele repuxa (40%). A sensibilidade da pele dos inquiridos fica mais sensível após a limpeza (40%) e o seu grau de sensibilidade é quando sente ardor com frequência (com água mais quente, ao secar mais vigorosamente, etc...) (35%). Pedimos aos inquiridos para descrever as suas rugas e a maioria respondeu que tem algumas ríduladas (45%). A elasticidade da pele, a maior parte respondeu que tem alguns sinais de perda de elasticidade (50%), pedimos então para beliscar a pele na face, a ver quanto tempo demora a voltar ao normal e a maioria respondeu menos de um segundo (40%). Questionamos ao inquirido para descrever a sua pele quanto à luminosidade e presença de manchas, responderam a maioria que tem uma pele baça com manchas (35%).

Tabela 9: Autoavaliação da pele dos inquiridos

Autoavaliação da pele		%(n)
Grau de oleosidade - Qual o seu tipo de pele	Oleosa	35%(7)
	Mista	30%(6)
	Normal	15%(3)
	Seca	15%(3)
	Muito seca	5%(1)
Onde a sua pele é oleosa	Na zona T (Mista)	85%(17)
	Em todo o rosto (Oleosa)	10%(2)
	Não tenho oleosidade (Seca)	5%(1)
Onde vê poros abertos	Na zona T (Mista)	85%(17)
	Na zona T e nas bochechas (Oleosa)	10%(2)
	Não tenho poros abertos (Seca)	5%(1)
Grau de hidratação	Pele repuxa	40%(8)
	Descamação (laterais do nariz, testa e ao redor dos lábios)	5%(1)
	A absorção dos produtos é muito rápida	5%(1)
	Comichão	5%(1)
	Falta de brilho (opaca)	20%(4)
	Aspereza	15%(3)
	Pele muito fina	10%(2)
Sensibilidade	Nunca	20%(4)
	Raramente	30%(6)
	Após limpeza	40%(8)
	Frequentemente	5%(1)
	Sempre	5%(1)
Grau de sensibilidade	A sua pele fica vermelha com facilidade	30%(6)
	Costuma ter rejeição ao uso de dermo-cosméticos (ácidos clareadores, rejuvenescedores)	0
	Sente "calor interno" quando fica vermelha	20%(4)
	Sente ardor com frequência (com água mais quente, ao secar mais vigorosamente)	35%(7)
	Não tenho pele sensível	15%(3)
Descreva as suas rugas	Rugas inexistentes	20%(4)
	Tenho algumas ríduladas	45%(9)
	Rugas pouco visíveis	15%(3)
	Rugas visíveis	15%(3)
	Rugas muito visíveis	5%(1)

Elasticidade da sua pele	Com tonicidade e firme	30%(6)
	Alguns sinais de perda de elasticidade	50%(10)
	Pele sem densidade, oval do rosto descaído	20%(4)
Se beliscar a sua pele na face, quanto tempo demora a voltar ao normal	Imediato	15%(3)
	< de 1 segundo	40%(8)
	Entre 1 a 2 segundos	30%(6)
	Mais de 2 segundos	15%(3)
	Não consegue contabilizar o tempo	0
Luminosidade e presença de manchas	Uniforme e luminosa	20%(4)
	Falta de luminosidade sem manchas	30%(6)
	Baça e pouco homogénea	15%(3)
	Baça com manchas	35%(7)
	Manchas instaladas e intensas	0

A quarta secção, obteve-se os dados sobre a determinação a nível de conhecimento de produtos cosméticos naturais, tentou-se saber de que forma os inquiridos tomaram conhecimento sobre os produtos cosméticos naturais e 100% afirmaram que já tinham conhecimento (tabela 11), questionamos de que forma levariam a escolher produtos cosméticos naturais em detrimento dos convencionais e os inquiridos escolheram variavelmente, as preocupações ambientais (30%), preocupação com a realização de testes em animais (30%), preocupação com ingrediente nocivos à saúde (25%) e porque é sugerido por bloggers/youtubers, etc. (15%). Após a análise da tabela 10 que se encontra abaixo, em que pretende identificar o nível de concordância com as seguintes afirmações relativamente aos cosméticos naturais, verificou-se que apesar dos indivíduos considerar bem informados em relação a este tema, uma escolha de concordância total de 100% em relação aos cosméticos naturais de não ter ingredientes nocivos para os utilizadores. Por fim, pedimos se estariam dispostos a experimentar um gel facial de anti-idade de produtos naturais, durante 10 dias e obtemos uma resposta de 20 indivíduos.

Tabela 10: Identificar o nível de concordância com as seguintes afirmações relativamente aos cosméticos naturais.

	% (n)				
	Discordo totalmente	Discordo em parte	Não concordo nem discordo	Concordo em parte	Concordo totalmente
Têm uma elevada percentagem de ingredientes naturais	0	0	15%(3)	50%(10)	35%(7)
Têm apenas ingredientes naturais	0	10%(2)	0	55%(11)	35%(7)
Não têm ingrediente geneticamente modificados	0	0	10%(2)	10%(2)	80%(16)
Não têm ingredientes químicos	0	5%(1)	15%(3)	40%(8)	40%(8)

Não causam impacto negativo no ambiente	0	0	0	10%(2)	90%(18)
São desenvolvidos sem recurso a testes em animais (cruelty-free)	0	0	0	10%(2)	90%(18)
Não têm ingredientes nocivos para os utilizadores	0	0	0	0	100%(20)
Não têm corantes nem conservantes	0	10%(2)	20%(4)	45%(9)	25%(5)

Tabela 11: Determinação a nível de conhecimento de produtos cosméticos naturais.

		%(n)
Já ouviu falar de cosméticos naturais	Sim	100%(20)
	Não	0
Quais as principais razões que o levam ou levariam a escolher produtos cosméticos naturais em detrimento dos convencionais	Restrições por motivos de saúde	0
	Preocupação com ingrediente nocivos à saúde	25%(5)
	Preocupações ambientais	30%(6)
	Preocupação com a realização de testes em animais	30%(6)
	Porque as pessoas próximas (familiares, amigos) também consomem	0
	Porque é sugerido por bloggers/youtubers, etc.	15%(3)
	Sou indiferente quanto à origem do produto	0
Estaria disposta a experimentar um gel facial "anti-ageing" de produtos naturais, durante 10 dias	Sim	100%(20)
	Não	0

Com a disponibilidade dos 20 indivíduos, propusemos que 10 dos indivíduos experimentasse o gel de metilcelulose e a outra parte o gel de anti-idade com os extractos de cones de Lúpulo da variedade Polaris, com isto a parte dois do questionário, os participantes tiveram de avaliar a sua satisfação pós-uso dos géis. As questões foram durante quantos dias procederam à aplicação do gel em estudo e obteve-se na totalidade 100% das respostas os 10 dias de uso, a outra foi para indicar o grau de satisfação com a performance do gel de produtos naturais que experimentou referente aos seguintes aspectos indicados na tabela 12 para o gel e a tabela 13 para o gel com extracto.

Tabela 12: O grau de satisfação com a performance do gel de metilcelulose de produtos naturais que experimentou referente aos seguintes aspectos indicados.

Gel de metilcelulose	% (n)				
	Totalmente insatisfeito	Insatisfeito	Indiferente	Satisfeito	Totalmente satisfeito
Hidratação da pele	0	0	40%(4)	60%(6)	0
Firmeza da pele	0	0	50%(5)	50%(5)	0
Elasticidade da pele	0	0	70%(7)	30%(3)	0
Redução de rugas	0	0	100%(10)	0	0
Redução de manchas	0	0	0	80%(8)	20%(2)
Suavidade da pele	0	0	0	80%(8)	20%(2)
Luminosidade da pele	0	0	0	80%(8)	20%(2)
Aspecto geral da pele	0	0	10%(1)	60%(6)	30%(3)
Espalhabilidade	0	0	0	10%(1)	90%(9)
Facilidade de aplicação	0	0	0	10%(1)	90%(9)
Fragância	0	0	30%(3)	50%(5)	20%(2)
Consistência do gel	0	0	0	10%(1)	90%(9)

Tabela 13: O grau de satisfação com a performance do gel com extracto hidroalcoólico de cultivar Polaris de produtos naturais que experimentou referente aos seguintes aspectos indicados.

Gel com extracto	% (n)				
	Totalmente insatisfeito	Insatisfeito	Indiferente	Satisfeito	Totalmente satisfeito
Hidratação da pele	0	0	0	60%(6)	40%(4)
Firmeza da pele	0	0	0	60%(6)	40%(4)
Elasticidade da pele	0	0	0	60%(6)	40%(4)
Redução de rugas	0	0	0	70%(7)	30%(3)
Redução de manchas	0	0	0	100%(10)	0
Suavidade da pele	0	0	0	40%(4)	60%(6)
Luminosidade da pele	0	0	0	60%(6)	40%(4)
Aspecto geral da pele	0	0	0	50%(5)	50%(5)
Espalhabilidade	0	0	0	10%(1)	90%(9)
Facilidade de aplicação	0	0	0	10%(1)	90%(9)

Fragância	0	60%(6)	0	40%(4)	0
Consistência do gel	0	0	0	40%(4)	60%(6)

Para o produto do gel de metilcelulose questionamos acerca da recomendação da compra deste produto a um amigo obtivemos 70% que responderam afirmativamente dos quais o motivo maior foi que era um bom produto cosmético. Também perguntamos se estaria disposto a comprar este produto e obtivemos 70% que responderam afirmativamente e o preço pelo qual estaria disposto a pagar que rondou 4,50€ para 50ml, e o motivo maior foi que era refrescante/fresco, como se pode ver na tabela 14.

Tabela 14: Para o gel de metilcelulose acerca da recomendação da compra deste produto e os motivos.

Gel		%(n)
Recomendaria a compra deste produto a um amigo	Sim	70%(7)
	Não	0
	Talvez	30%(3)
Motivos	Bom	50%(5)
	Consistência boa	10%(1)
	Produto natural	10%(1)
	Não responderam	30%(3)
Estaria disposto a comprar este produto	Sim	70%(7)
	Não	0
	Talvez	30%(3)
Motivos	Produto natural	10%(1)
	Fresco/refrescante	30%(3)
	Usaria no dia-a-dia	10%(1)
	Bom produto	10%(1)
	Seca rápido	10%(1)
	Não responderam	30%(3)

Para o gel com extracto dos cones da variedade Polaris questionamos acerca da recomendação da compra deste produto a um amigo obtivemos 70% que responderam afirmativamente dos quais o motivo maior foi que era um bom produto cosmético e natural. Também perguntamos se estaria disposto a comprar este produto e obtivemos 70% que responderam afirmativamente e o preço pelo qual estaria disposto a pagar que rondou 12€ para 50ml, e o motivo maior foi que era um produto natural e à base de plantas, como se pode ver na tabela 15.

Tabela 15: Para o gel de Lúpulo acerca da recomendação da compra deste produto e os motivos.

Gel Lúpulo		%(n)
Recomendaria a compra deste produto a um amigo	Sim	70%(7)
	Não	0
	Talvez	30%(3)
Motivos	Bom	30%(3)
	Natural	30%(3)
	Base de plantas	10%(1)
	Odor	10%(1)
	Não responderam	20%(2)
Estaria disposto a comprar este produto	Sim	70%(7)
	Não	0
	Talvez	30%(3)
Motivos	Natural	20%(2)
	Base de plantas	20%(2)
	Odor	10%(1)
	Anti-idade	20%(2)
	Não responderam	30%(3)

No final perguntamos se tinham alguma sugestão/comentário que possa contribuir para a sua melhoria e referente ao gel de metilcelulose não houve comentários mas no gel com extracto de Lúpulo referiram a melhoria do odor. Na generalidade, o género feminino (80%) é mais aderente que o masculino (20%) aos produtos cosméticos de anti-idade. Relativamente à idade, verificou-se que as pessoas jovens entre 18 anos a 40 anos utilizam mais. Sobre as habilitações literárias, verificou-se que os inquiridos que possuem graus académicos superiores são os mais aderentes (80%). No que diz respeito à residência o inquirido nas zona urbana (70%) tem mais adesão de usar estes tipos de produtos de que o de zonas rurais (30%).

Analisando os resultados que obtivemos sobre a percepção dos inquiridos em relação aos géis de metilcelulose e aos géis de anti-idade com os extractos de cones de Lúpulo da variedade Polaris, a sua satisfação pós-uso na recolha de todas as informações no presente estudo a opinião geralmente é positiva e afirmaram não sentir quaisquer efeitos adversos. No entanto, foi notável uma atitude mais negativa, por parte dos indivíduos, em relação ao odor resultante da junção do óleo essencial de tomilho no gel de anti-idade com os extractos de cones de Lúpulo da variedade Polaris.

Capítulo 4: Conclusões



5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1. Conclusão

Como se sabe, a planta *Humulus lupulus* L. é conhecida e usada há muitos anos pela humanidade, no fabrico de cerveja, aromatizando-a. Com o passar dos anos, foi utilizada na medicina tradicional, devido às suas propriedades ricas em: antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Hoje em dia, também é utilizada na cosmética para tratamento e prevenção de rugas, devido ao seu extracto rico em xanthohumol (Philips, *et al.*, 2010)

Sendo Bragança uma região rica em Lúpulo, permitiu-nos fácil aquisição de matéria-prima. O desenvolver um produto cosmético natural à base de plantas de Lúpulo, poderia ainda, ser um meio de-reutilização de subprodutos da cultura do Lúpulo, uma vez que, as partes vegetativas não são usadas na indústria cervejeira. A preparação numa formulação em gel anti-idade incorporando diferentes percentagens de extractos hidroalcoólicos obtidos de cones e partes vegetativas de *Humulus lupulus* L. (Lúpulo) espontâneo e das variedades Cascade e Polaris, utilizando como conservante natural o óleo essencial de tomilho, poderia ser uma mais valia comercial para a região.

O presente trabalho permitiu determinar os compostos fenólicos presentes nos extractos hidroalcoólicos obtidos de cones e partes vegetativas de Lúpulo espontâneo e das variedades Cascade e Polaris, no qual os compostos fenólicos nos extractos hidroalcoólico, embora presentes nas partes vegetativas, são mais ricos nas flores do que nas partes vegetativas, a maior quantidade está na variedade Polaris nas flores com 22.7 ± 2.4 .

Na identificação dos compostos fenólicos do Lúpulo, o pico 37 ([M-H]⁻ a m/z 353) foi identificado como xanthohumol (UV_{max} em torno de 281,346 nm e fragmentos MS₂ em m/z 247, 233 (como o mais abundante), 199), verificou-se que este composto só se encontra nas flores do Lúpulo.

Nos testes de temperatura e humidade, temperaturas extremas, vibração mecânica e centrifugação foram comparadas com as amostras no seu estado natural/inicial e no final, não houve alterações, ou separação de fases ou de coloração, o que pode indicar a estabilidade do produto. No teste da cor, averiguamos que o gel com adição de extractos não sofre alteração dos parâmetros referidos.

O teste espectrofotométrico, verificamos o comportamento do gel, determinado se ele é diferente ao adicionar os extractos de Lúpulo em diferentes concentrações, verificando a

ocorrência de mudanças na intensidade das bandas, em que o pico máximo do gel de variedade Polaris nos cones a 5% com uma absorvância de 0,482, a seguir está a variedade Polaris dos cones a 2,5% com uma absorvância de 0,252, no entanto o gel de metilcelulose foi o mais neutro em absorvância por manter-se próximo do zero.

Os resultados da medição do pH das formulações variam entre 7,5 a 6,5. A densidade relativa obteve valores de 1 e 0,857. Já a textura na realização do teste pela extrusão inversa é possível observar os valores dos parâmetros medidos pelo equipamento, verificando que apenas a formulação com os extractos de variedade Polaris se desvia um pouco mais dos valores restantes, apresentando valores de consistência mais altos e menor viscosidade.

O teste da luz no qual ocorreu separação de fases, isto é, indicativo de instabilidade no produto cosmético mas, não houve alteração da coloração que é indicativo de estabilidade do produto, logo o produto cosmético deve ser embalado em embalagens opacas de vidro para a protecção à exposição de luz.

Na análise antimicrobiana o extracto de tomilho, foi eficaz na concentração testada, e nos extractos de lúpulo obteve-se actividade antifúngica em todas as concentrações, devido aos seus compostos.

Assim, foi possível determinar qual o melhor extracto para a finalização da formulação cosmética, sendo a cultivar Polaris com extracto hidroalcoólico de cones de Lúpulo a 2,5%, com a incorporação do óleo essencial de tomilho, é de realçar que não se notaram alterações consideráveis quando incorporado e não afectou de forma alguma os resultados obtidos, só reforçou a conservação.

Na aceitação em painel de voluntários do produto cosmético, foi avaliado por questionários em que obtemos a percepção dos inquiridos em relação aos géis de metilcelulose e aos géis com o extracto hidroalcoólico a 2,5% de cones de Lúpulo da variedade Polaris, uma opinião geralmente positiva com as respostas de satisfação total em relação as rugas, firmeza, elasticidade e hidratação no gel com extracto, enquanto no controlo as respostas foram de indiferença ou satisfatório, possivelmente devido ao composto xanthohumol, e afirmaram não sentir quaisquer efeitos adversos, no entanto o odor não foi de total agrado na formulação com adição do óleo essencial de tomilho, isso quer dizer, que devemos melhorar esse aspecto organoléptico.

No geral, a realização deste trabalho permitiu confirmar que os géis são estáveis no tempo e podem ser usados como parte principal da formulação cosmética em pesquisas futuras. Quanto à sua bioactividade, *Humulus lupulus* L. apresentou uma estabilidade físico-química optimista e características organolépticas adequadas, mantendo-se ao longo do tempo, a sua

estabilidade microbiológica que permite garantir essa estabilidade e segurança neste tipo de formulação.

5.2. Perspectivas futuras

Em futuros trabalhos seria interessante avaliar possíveis actividades citotóxicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e outras actividades de estabilidade e em linhagens celulares e painéis de análise sensorial, a fim de analisar a possibilidade desta formulação, e outras com diferentes extractos de Lúpulo, poderem ter mais efeitos benéficos e eficazes na saúde da pele.

Seria interessante também desenvolver um odor mais apelativo para o gel de anti-idade com os extractos de cones de Lúpulo da variedade Polaris, possivelmente, com adição de extractos de óleos essenciais de outras plantas aromáticas, com aromas mais apelativos, presentes na flora da região. Teriam de ser plantas com óleos essenciais com bioactividade compatível com o objectivo desta formulação. Desenvolver o fabrico de uma embalagem para este produto cosmético, para a venda no mercado.

Desenvolver extractos de outros espontâneos e cultivares, considerando utilizar as partes vegetativas (folhas), para obter extractos bioactivos. Deste modo, usaríamos material vegetal que é material não utilizado na indústria cervejeira, e, portanto, um excedente da cultura, que uma vez usado seria uma mais valias económicas e ecológicas.

Referências bibliográficas

- Afonso, A. F., Pereira, O. R., Neto, R. T., Silva, A. M., & Cardoso, S. M. (2017). Health-Promoting Effects of *Thymus herba-barona*, *Thymus pseudolanuginosus*, and *Thymus caespititius* Decoctions. *Molecular Sciences*.
- Afonso, A. F., Pereira, O. R., Válega, M., Silva, A. M., & Cardoso, S. M. (2018). Metabolites and Biological Activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* Grown under Organic Cultivation. *Molecules*.
- Almeida, A. B. (2017). *Efeitos biológicos do Lúpulo: Resultados de ensaios clínicos em humanos*. Porto: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto .
- Almeida, A. R., Maciel, M. V., Machado, M. H., Bazzo, G. C., Armas, R. D., Vitorino, V. B., Vitali, L., Block, J. M., & Barreto, P. L. (2020). Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *Food science and technology*, 340-347.
- Almeida, M. M. (2012). Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética.
- Almeida, N. E. (2014). Reatividade das lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados e compostos contendo grupos tióis livre frente aos radicais formados durante o envelhecimento da cerveja.
- Amarti, F., Ajjouri, M. E., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., & Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Pharmacologie, aromathérapie*, 149-157.
- Araldi, J., & Guterres, S. S. (2013). Tinturas capilares: existe risco de câncer relacionado à utilização desses produtos?. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, 78-83.
- Astray, G., Gullón, P., Gullón, B., Munekata, P. E., & Lorenzo, J. M. (2020). *Humulus lupulus* L. as a Natural Source of Functional Biomolecules.
- Barata R., S. A. (2019). Células estaminais na regeneração da pele: aplicações terapêuticas e cosméticas. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 39-68.

- Bartmanska, A., Walecka-Zacharska, E., Tronina, T., Poplonski, J., Sordon, S., Brzezowska, E., Bania, J., & Huszcza, E. (2018). Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules*, 1-12.
- Binic, I., Lazarevic, V., Ljubenic, M., Mojsa, J., & Sokolovic, D. (2013). Skins Ageing: Natural Weapons and Strategies. *Evidence –Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., & Rivière, C. (2018). *Humulus lupulus* L., um ingrediente de cerveja muito popular e planta medicinal: visão geral de sua fitoquímica, sua bioatividade e sua biotecnologia. *Phytochem*, 1047-1090.
- Broinizi, P. R., Andrade-Wartha, E. R., Silva, A. M., Novoa, A. J., Torres, R. P., Azeredo, H. M., & Mancini-Filho, J. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium Occidentale* L.). *Ciência Tecnologia Alimentar*, 902-908.
- Carbone, K., Macchioni, V., Petrella, G., Cicero, D. O. (2020). Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. *Industrial Crops & Products*.
- Choi, J. Y., Desta, K. T., Lee, S. J., Kim, Y.-H., Shin, S. C., Kim, G.-S., & El-Aty, A. M. (2017). LC-MS/MS profiling of polyphenol-enriched leaf, stem and root extracts of Korean *Humulus japonicus* Siebold & Zucc and determination of their antioxidant effects. *Wiley Biomedical Chromatography*.
- Chorilli, M. (2007). Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo.
- Coelho, L. G. (2014). Desenvolvimento e estudo da estabilidade de emulsões com propriedades repelentes naturais.
- Daudt, R. M. (2016). Aplicação dos componentes do pinhão no desenvolvimento de produtos inovadores nas indústrias cosméticas e de alimentos.
- Durello, R. D. (2019). Química do sabor de cervejas: detalhes moleculares de Lúpulos (*Humulus lupulus*) cultivados no Brasil no processo cervejeiro.
- Durello, R. S., Silveira, L. M., & Jr, S. B. (2019). Química do Lúpulo.
- Farias, I. E. (2009). Desenvolvimento de emulsões contendo óleos vegetais para uso cosmético.
- Ferreira, F. J. (2019). *Ingredientes de origem natural para cosméticos anti-envelhecimento da pele: a Vitis vinifera e Arbutus unedo*. Coimbra.

- Ferreira, F. S., Mejia, D. P., & Barros, A. D. (2015). Modificação estrutural da haste capilar com a utilização de amônia.
- Ferreira, L. A., & Rocha, D. C. (2018). Estudo de pré-formulação de gel contendo ácido hialurônico em embalagem massagedora microvibratória. *Psicologia e Saúde em Debate*, 130-146.
- Ferreira, R. M., & Zatti, R. A. (2013). Protocolo para ensaios de estabilidade físico-química de fitocosméticos.
- Figueiredo, M. V., Martinez, C. R., Burity, H. A., & Chanway, C. P. (2008). Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol*, 1187-1193.
- Frazão, J. S. (2017). *Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade*. Bragança.
- Galvão, J. G. (2015). *Desenvolvimento de formulação cosmética contendo carreadores lipídicos nanoestruturados à base de manteiga de Ouratea sp.: uma estratégia nanotecnológica para o aumento da hidratação cutânea*. São Cristóvão .
- Goes, H., Morais, J. S., Pedro, L., & Sousa, M. J. (2019). *Estudo cromatográfico de compostos bioactivos em cultivares e espontâneos de Lúpulo*. Bragança.
- Gonçalves, J. R. (2016). *Plantas do Algarve com aplicação em Cosmética*. Algarve.
- Hofte, A. J., Hoeven, R. A., Verpoorte, S. Y., & Greef, U. R. (1998). Characterization of Hop Acids by Liquid Chromatography with Negative Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *American Society of Brewing Chemists*, 118-122.
- Hsu, Y.-Y., & Kao, T.-H. (2019). Evaluation of prenylflavonoids and hop bitter acids in surplus yeast. *Association of Food Scientists & Technologists*.
- Infarmed*. (17 de Dezembro de 2019). Obtido de Cosméticos - INFARMED, I.P., atual. 2016: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>
- Jesus, B. C., Kakazu, C. S., Luciano, L. A., Tito, E. R., & Silva, E. S. (2020). Obtenção do extrato hidroalcoólico da folha de noqueira (*juglans regia* l.) E identificação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos para múltiplas aplicações. *Brazilian Journal of Development*, 56116-56127.
- Lee, S., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.

- Legette, L., Ma, L., Reed, R. L., Miranda, C. L., Christensen, J. M., Rodriguez-Proteau, R., & Stevens, J. F. (2012). Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration. *Molecular Nutrition Food Research*, 466-474.
- Leonardi, G. R., Gaspar, L. R., & Campos, P. M. (2001). Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Investigação Clínica, Laboratorial e Terapêutica*.
- Lopes, A. K., Carvalho, S. d., Sousa, J. d., & Meirelles, L. M. (2020). Desenvolvimento e caracterização de máscaras peel-off à base de atapulgita.
- Lou, H., Zhang, F., Lu, L., Ding, Y., & Hao, X. (2020). Xanthohumol from *Humulus lupulus* L. potentiates the killing of *Mycobacterium tuberculosis* and mitigates liver toxicity by the combination of isoniazid in mouse tuberculosis models. *RSC Advances*, 13223–13231.
- Loureiro, P. V., Jiménez, I. H., Sendón, R., Quirós, A. R.-B., & Barbosa-Pereira, L. (2019). Determination of Xanthohumol in Hops, Food Supplements and Beers by HPLC. *foods*.
- Machado, W. d., Sarnighausen, V. C., Pai, A. D., Grotto, R. M., & Rodrigues, S. A. (2020). Avaliação do efeito bacteriostático das folhas do Lúpulo para tratamento de dejetos bovinos. *Ibero-Americana de Ciências Ambientais*.
- Magalhães, P. J., Vieira, J. S., Gonçalves, L. M., Pacheco, J. G., Guido, L. F., & Barros, A. A. (2009). Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*.
- Maietti, A., Brighenti, V., Bonetti, G., Tedeschi, P., Prencipe, F. P., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2017). Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop). *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28-34.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2013). Antioxidant activity of decoction, infusion and methanolic extract of cultivated thyme (*Thymus vulgaris* L.). EJI, Polytechnic Institute of Bragança, Bragança, Portugal
- McMurrough, L., Roche, G. P., & Cleary, K. (1984). Phenolic acids in beers and worts.
- Minolta, K. (1994). *Precise color communication color control*. Perception to instrumentation.
- Monteiro, M. C., & Trugo, L. C. (2005). Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova*, 637-641.

- Nowak, B., Poźniak, B., Popłoński, J., Bobak, Ł., Matuszewska, A., Kwiatkowska, J., & Szeląg, A. (2020). Pharmacokinetics of xanthohumol in rats of both sexes after oral and intravenous administration of pure xanthohumol and prenylflavonoid extract. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 1101–1109.
- Oliveira, Â. Z. (2009). *Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurónico*. Porto.
- Olsovska, J., Bostikova, V., Dusek, M., Jandovska, V., Bogdanova, K., Cermak, P., & Kolar, M. (2016). *HUMULUS LUPULUS L. (HOPS) – A VALUABLE SOURCE OF COMPOUNDS WITH BIOACTIVE EFFECTS FOR FUTURE THERAPIES*. *Military Medical Science Letters*, 19-30.
- Parrinha, A. R. (2014). *Novas Tendências em Cosmética Anti-Envelhecimento*. Lisboa.
- Paventi, G., Acutis, L. d., Cristofaro, A. D., Pistillo, M., Germinara, G. S., & Rotundo, G. (2020). Biological Activity of *Humulus lupulus* (L.) Essential Oil and Its Main Components against *Sitophilus granarius* (L.). *biomolecules*.
- Peruzzi, M. F., & Georgetti, S. R. (2015). Avaliação da estabilidade físico-química de diferentes formulações tópicas adicionadas de extrato de folhas de azadirachta indica (neem).
- Philips, N., Samuel, M., Arena, R., Chen, Y., Conte, J., Natarajan, P., Haas, G., & Gonzalez, S. (2010). Direct inhibition of elastase and matrixmetalloproteinases and stimulation of biosynthesis of fibrillar collagens, elastin, and fibrillins by xanthohumol. *Cosmetic Science*, 125-132.
- Pianovski, A. R., Vilela, A. F., Silva, A. A., Lima, C. G., Silva, K. K., Carvalho, V. F., Musis, C. R., Machado, S. R. P., & Ferrari, M. (2008). Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Pharmaceutical Sciences*.
- Ramalho, A. T. (2007). *Caracterização dermocinética de geles de AHAs*. Lisboa.
- Rota, M., Herrera, A., Martínez, R., Sotomayor, J., & Jordán, M. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 681-687.
- Ruivo, J. S. (2012). *Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em Cosmética e Dermatologia*. Porto: Universidade Fernando Pessoa.
- Santos, P. O., Miyashiro, P. Y., & Silva, V. A. (2015). A nanotecnologia em formulação cosmética.

- Scarci, F., Iob, G., & Mailland, F. (2016). Composition for skin anti-ageing treatment. *Polichem SA*, 1-6.
- Seliger, J. M., Cicek, S. S., Witt, L. T., Martin, H.-J., Maser, E., & Hintzpeter, J. (2018). settings Open AccessArticle Selective Inhibition of Human AKR1B10 by n-Humulone, Adhumulone and Cohumulone Isolated from *Humulus lupulus* Extract. *Natural Product Pharmacology and Medicinal Chemistry*.
- Silva, C. T. (2019). Caracterizações químicas dos primeiros cultivares de Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) produzidos no brasil. 26-28.
- Silva, R. P. (2016). Correlação entre a distribuição dos derivados do ácido protocatecuico e a sua eficácia no combate à oxidação lipídica.
- Silva, T. F., Bortolotto, J. W., Deuschle, R. A., Claudino, T. d., & Deuschle, V. C. (2019). Desenvolvimento e Estudo de Estabilidade Físico-Química de Formulações Cosméticas Antienvhecimento. *Contexto & Saúde*, 107-113.
- Sousa, M. J. (2005). *Obtenção de plantas de Humulus lupulus L. resistentes a vírus*. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- Souza, A., Alves Gimenez, L., dos Santos Alves, G., Dias Meinhardt, A., Machado Abreu, S., & Machado Leitão, A. (2020). Análises de acidez, sólidos solúveis totais e cor em preparados sólidos para refresco. *Anais Do Salão Internacional De Ensino, Pesquisa E Extensão*, 11(2). Recuperado de <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/103845>
- Spies, J. A. (2018). Estudo sobre a isomerização de alfa-ácidos de Lúpulo na produção de cerveja artesanal em diferentes condições de processo.
- Sun, T.-L., Li, W.-Q., Tong, X.-L., Liu, X.-Y., & Zhou, W.-H. (2020). Xanthohumol attenuates isoprenaline-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through regulating PTEN/AKT/mTOR pathway. *European Journal of Pharmacology*.
- Tang, J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. (2019). LC-ESI-QTOF/MS Characterization of Phenolic Compounds from Medicinal Plants (Hops and Juniper Berries) and Their Antioxidant Activity. *foods*.
- Tedone, L., Staskova, L., Yan, D., Whittock, S., Shellie, R., & Koutoulis, A. (2020). Hop (*Humulus lupulus* L.) Volatiles Variation During Storage. *American Society of Brewing Chemists*, 114-125.
- Vieira, I. R.-C.-J. (2017). Development and in vivo evaluation of the moisturising potential of cosmetic formulations containing Babassu (*Orbignya phalerata* Martius) oily extract. *Biomed Biopharm*, 204-219.

Wang, G.-F., Shi, L.-P., Ren, Y.-D., Liu, Q.-F., Liu, H.-F., Zhang, R.-J., & Zuo, J.-P. (2009).
Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo
and in vitro. *Antiviral Research*, 186-190.

Anexos:

Tabela 16: Composição fitoquímica de extractos hidroalcoólicos de *Humulus lupulus* determinada por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ

NP	RT	UV _{max}	M-H-	MS ² Fragmentos Principais ESI-MS ⁿ (m/z)	Composto Provável	Cascade		Polaris		Espontâneo		Ref.
						F	PV	F	PV	F	PV	
1	1.6	264	191	173, 111	Ácido quinico	+	+	+	+	+	+	McMurrough, Roche, & Cleary, 1984
2	3.6	315	315	269, 153 , 109	Ácido protocatecuico 4- <i>O</i> -glucosídeo					+		Tang, 2019
3	5.7	290 sh, 324	353	191 , 179, 135	<i>cis</i> 3- <i>O</i> -CQA	+	+		+	+	+	Tang, 2019
4	7.1	309	355	337, 209, 191 , 181	Ácido ferúlico 4- <i>O</i> -glucosídeo				+			Tang, 2019
5	7.6	228, 307	337	191, 173, 163 , 119	Isómero 1 do ácido coumaroilquínico	+	+				+	
6	7.7	227, 310	337	191, 173, 163 , 119	Isómero 2 ácido coumaroilquínico	+	+		+		+	Tang, 2019
7	8.3	290sh, 325	353	191 , (179, 135)	<i>trans</i> 5- <i>O</i> -CQA	+	+				+	Sotto, 2018
8	8.6	290sh, 325	367	193 (173, 134)	Ácido 3-feruloilquínico	+	+		+		+	Tang, 2019
9	8.8	290 sh, 326	353	173 , 179, 191	4- <i>O</i> -CQA	+	+					
10	9.3	271, 344, 355	595	475 , 385, 355, 341	Quercetina- 3- <i>O</i> -glucosil-xilosídeo		+			+		Tang, 2019
11	9.5	273	427	337	NI	+	+	+				
12	9.6	274	447	401	NI						+	
13	10.0	312	337	191 , 163, 119	Ácido coumaroil-quínico	+	+					
14	10.5	275, 330	609	301	Isómero 1 de quercetina- <i>O</i> -rutinosídeo		+			+		
15	10.8	256, 266, 354	755	609, 591 , 489, 301	Quercetina-3-rutinosídeo-ramnosídeo	+	+		+			
16	11.1	275, 337	609	301	Isómero 2 de quercetina- <i>O</i> -rutinosídeo		+			+		

17	11.4	265, 346	739	593, 575 , 285, 284	caempferol 3- <i>O</i> -(2''-ramnosilgalactosídeo) 7- <i>O</i> -ramnosídeo	+	+		+				Tang, 2019
18	11.8	256, 266, 354	609	301	Isómero 2 de quercetina- <i>O</i> -rutinosídeo	+	+			+	+		Magalhaes,2010
19	12.1	256, 264, 352	593	429, (301) 285, 284	Isómero 1 caempferol-3-rutinosídeo		+		+				Magalhaes,2010
20	12.1	256, 264, 352	463	301, (179)	Quercetina-3-hexosídeo	+				+	+		Magalhaes,2010
21	12.6	265, 345	593	285, 284	Isómero 2 caempferol-3-rutinosídeo	+	+					+	
22	12.8	256, 265, 360	549	505, (387, 355, 329, 285)	Quercetina 3- <i>O</i> -(6''-malonil- glucosídeo)	+				+			Tang, 2019
23	13.0	265, 347	679	635, 499,	Crisoeriol 7- <i>O</i> -(6''- malonil-apiosil-glucosídeo)		+		+				Tang, 2019
24	13.1	265, 347	447	327, 284, 285	caempferol-3-hexosídeo	+	+			+	+		Magalhaes,2010
25	13.8	265, 346	533	489 , 329, 285	Derivado de caempferol-3- acetilhexosídeo	+	+		+	+	+		Magalhaes,2010
26	14.0	247	379	297	NI	+		+					
27	15.2	246, 270	393	267	NI	+		+	+				
28	15.7	259	377	359, 308 , 280, 221, 125	NI			+					
29	16.1	248, 262	409	251	NI	+			+				
30	16.3	260	393	ND	NI	+				+			
31	16.5	267	251	224, 207 , 179, 125, 151, 107	NI	+			+				
32	18.9	260	351	333, 282, 263	NI	+							
33	19.7	261	363	345, 319, 267 , 249, 209	NI	+		+					
34	20.0	256, 329	317	248 , 180	Cohulupona	+		+	+				Hsu, 2019
35	20.5	261, 275	377	359, 281, 275, 263 , 251, 223	NI	+		+					
36	21.2	274	375	ND	NI								

37	21.6	281, 346	353	247, 233 , 119	Xanthohumul	+		+		+		(Loureiro, Jiménez, Sendón, Quirós, & Barbosa-Pereira, 2019)
38	22.0	282	377	359, 208 , 281, 263, 238	NI			+				
39	22.6	283, 321	347	278	Cohumulona	+		+	+	+		Hofte, 1998 Magalhaes, 2010
40	22.8	283, 321	361	343, 292	Humulona	+		+	+	+		Hofte, 1998 Magalhaes, 2010
41	23.2	283	375	306	Adprehumulona/Prehumulona			+				Hsu, 2019
42	23.5	275, 331	399	330, 287 , 275, 262, 219, 194	Colupulona	+		+				Hofte, 1998 Magalhaes, 2010
43	23.7	282	495	477, 358, 325, 301, 289	NI					+		
44	23.8	275, 330	413	369, 344, 301 , 289, 276, 233	Lupulona	+		+	+			Magalhaes, 2010
45	24.0	285	513	ND	NI	+						
46	24.3	281	429	411, 360 , 333, 291	NI				+			

F- Extracto de Cones; CQA - Ácido cafeoilquínico PV- Extracto de Partes Vegetativas; NP- Número do pico; ND- Não determinado; NI- Não identificado; TR- Tempo de retenção; + - Composto presente.

Tabela 17: Composição do meio de crescimento bacteriano

Composto	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona	5
Agar	15

Tabela 18: Composição do meio de crescimento de leveduras

Composto	Concentração (g/L)
Glucose	20
Extrato de levedura	5
Peptona	10
Agar	20

Tabela 19: Valores do rendimento em percentagem dos extractos hidroalcoólicos liofilizados das várias variedades de Lúpulo.

Rendimentos da extracção hidroalcoólicas liofilizadas			
	Massa inicial (g)	Massa obtida após liofilização (mg)	Rendimento (%)
Amostras			
Cascade			
Flor	5	0,5057	30,34
Vegetal	5	0,1546	9,28
Polaris			
Flor	5	0,4299	25,79
Vegetal	5	0,1965	11,79
Espontâneo			
Flor	5	0,2188	13,13
Vegetal	5	0,3508	21,05

Questionários usados como instrumento de recolha de dados:

Parte 1

Questionário relativo ao uso de produtos de cuidado facial

Caro Consumidor,

Este questionário pretende estudar o perfil e hábitos de uso de produtos de cuidado facial. Faz parte do plano de trabalho de dissertação de Mestrado de Farmácia e Química dos Produtos Naturais, da Escola Superior Agrária de Bragança, sob a orientação da Prof^a. Maria João Sousa.

Agradeço a atenção dispensada no seu preenchimento. A informação recolhida tem objectivos meramente científicos e a confidencialidade assegurada. Em caso de dúvidas, é favor contactar através do e-mail: joaos@ipb.pt.

*-Obrigatório resposta

1. Informação Geral e Estilos de Vida

1.1. Idade*

1.2. Género *

Masculino

Feminino

1.3. Habilitações literárias *

< 9º ano

9.º ano

Ensino Secundário

Bacharelato ou curso tecnológico pós-secundário

Licenciatura ou superior

Outra:

1.4. Estado civil *

Solteiro

Casado ou em união de facto

Separado/divorciado

Viúvo

1.5 Situação Profissional *

Desempregado

Estudante

Trabalhador por conta de outrem

Trabalhador por conta própria

Reformado/Pensionista

Outra:

1.6. Profissão

1.7. Contando consigo, quantas pessoas constituem o seu agregado familiar?

1.8. Local de residência

	Zona urbana	Zona rural
Portugal		
Outro país		

1.9. Rendimento mensal líquido do agregado familiar

Menos de 500 €

500 a 1000 €

1000 a 3000 €

3000 a 5000 €

Mais de 5000 €

1.10. Peso (em kg)

1.11 Altura (em cm)

1.14. Apresenta algum dos seguintes problemas/doenças de pele? *

Psoríase

Rosácea

Acne

Dermatite atópica

Não tenho qualquer problema de pele

Outra:

1.15 Assinale a frequência com que realiza os seguintes comportamentos de saúde: *

	Nunca ou raramente	Às vezes	Frequentemente	Sempre
Estar ao sol durante longos períodos de tempo				
Dormir 7 a 8 horas por noite				
Fazer uma alimentação rica em peixe				
Fazer uma alimentação rica em frutas, vegetais e fibras (legumes, cereais)				
Comer alimentos pré-cozinhados				
Consumir refrigerantes				
Tomar pequeno-almoço				
Fazer exercício físico				
Beber álcool				
Fumar				
Usar protector solar				
Beber 1,5l-2l água por dia				

2. Cuidados com a pele

2.1. Se apenas pudesse escolher um dos seguintes cuidados para a sua pele, qual seria? *

Lavá-la duas vezes ao dia com um sabonete específico.

Usar um creme hidratante.

Fazer esfoliação.

Outra:

2.2. Com que frequência usa os seguintes produtos *

	Nunca/ Raramente	Frequentemente	Diariamente
Produtos para cuidados de rosto (excepto maquilhagem)	20%	70%	10%
Maquilhagem	20%	15%	65%
Protector solar	80	20	0

2.3. Assinale os produtos cosméticos de rejuvenescimento de rosto que utilizou (e/ou está a utilizar) e com que periodicidade (tendo em consideração os últimos 12 meses)? *

	Nunca	Diariamente	1/2 vezes por semana	1/2 vezes por mês	3 em 3 meses	6 em 6 meses	Anualmente
Refirmante de rosto							
Protetor solar							
Produtos anti-rugas contorno dos olhos							
Produtos anti-rugas rosto							
Produto despigmentante							
Esfoliante							
Produto hidratante de rosto							
Água micelar							
Hidratante de lábios							
Máscara anti-idade							
Limpeza de pele							
Ampola anti-idade com ácido hialurónico							

3. Autoavaliação da pele

3.1. Grau de oleosidade - Qual o seu tipo de pele? *

Oleosa (pele brilhante e poros visíveis)

Mista (pele brilhante em certas zonas, normal nas outras zonas)

Normal

Seca (sensação ocasional de pele a repuxar)

Muito seca (sensação de pele desconfortável, áspera)

3.2. Onde a sua pele é oleosa? *

Na zona T (Mista)

Em todo o rosto (Oleosa)

Não tenho oleosidade (Seca)

3.3. Onde vê poros abertos? *

Na zona T (Mista)

Na zona T e nas bochechas (Oleosa)

Não tenho poros aberto (Seca)

3.4. Grau de hidratação - Assinale o que mais te incomoda? *

Pele repuxa
Descamação (laterais do nariz, testa e ao redor dos lábios)
A absorção dos produtos é muito rápida
Comichão
Falta de brilho (opaca)
Aspereza
Pele muito fina

3.5. Sensibilidade - A sua pele é sensível? *

Nunca
Raramente
Após limpeza
Frequentemente
Sempre

3.6. Grau de sensibilidade - Assinale o que mais te incomoda? *

A sua pele fica vermelha com facilidade
Costuma ter rejeição ao uso de dermo-cosméticos (ácidos clareadores, rejuvenescedores, etc.)
Sente "calor interno" quando fica vermelha
Sente ardor com frequência (com água mais quente, ao secar mais vigorosamente, etc.)
Não tenho pele sensível.
Outra:

3.7. Descreva as suas rugas *

Rugas inexistentes
Tenho algumas ríduladas
Rugas pouco visíveis
Rugas visíveis
Rugas muito visíveis

3.8. Para medir a elasticidade da sua pele, esteja atenta à sua espessura e à oval do seu rosto. A sua pele apresenta-se: *

Com tonicidade e firme
Alguns sinais de perda de elasticidade
Pele sem densidade, oval do rosto descaído

3.9. Se beliscar a sua pele na face, quanto tempo demora a voltar ao normal? *

Imediato
< de 1 segundo;
Entre 1 a 2 segundos;
Mais de 2 segundos;
Não consegue contabilizar o tempo.

3.10. Como descreve a sua pele quanto à luminosidade e presença de manchas? *

Uniforme e luminosa
Falta de luminosidade sem manchas
Baça e pouco homogênea
Baça com manchas
Manchas instaladas e intensas
Outra:

4. Produtos cosméticos naturais

4.1. Já ouviu falar de cosméticos naturais? *

Sim

Não

4.2. Assinale o seu nível de concordância com as seguintes afirmações relativamente aos cosméticos naturais *

	Discordo totalmente	Discordo em parte	Não concordo nem discordo	Concordo em parte	Concordo totalmente
Têm uma elevada percentagem de ingredientes naturais					
Têm apenas ingredientes naturais					
Não têm ingrediente geneticamente modificados					
Não têm ingredientes químicos					
Não causam impacto negativo no ambiente					
São desenvolvidos sem recurso a testes em animais (cruelty-free)					
Não têm ingredientes nocivos para os utilizadores					
Não têm corantes nem conservantes					

4.3. Quais as principais razões que o levam ou levariam a escolher produtos cosméticos naturais em detrimento dos convencionais? *

Restrições por motivos de saúde

Preocupação com ingredientes nocivos à saúde

Preocupações ambientais

Preocupação com a realização de testes em animais

Porque as pessoas próximas (familiares, amigos) também consomem

Porque é sugerido por bloggers/youtubers, etc.

Sou indiferente quanto à origem do produto

Outra:

Obrigada pela sua colaboração no preenchimento do questionário!

Estamos procurando indivíduos dispostos a avaliar o desempenho de um gel de metilcelulose ou um gel com Lúpulo "anti-ageing" de produtos naturais.

6.1. Estaria disposta a experimentar um gel facial "anti-ageing" de produtos naturais, durante 10 dias?

Sim

Não

Talvez

6.2. Se sim, por favor, forneça um "nickname" (nome de utilizador) que permita a sua identificação para efeitos de avaliação da eficácia do produto. *

Parte 2

Questionário de satisfação pós-uso

Obrigada pela tua disponibilidade em experimentar o produto gel facial "anti-ageing" de produtos naturais.

Peço-te agora que respondas a algumas questões que por forma a avaliar a eficácia do mesmo na perspectiva do utilizador.

Recordo que a informação recolhida tem objectivos meramente científicos e a confidencialidade assegurada. Em caso de dúvidas, é favor contactar através do e-mail: joaos@ipb.pt.

1. Indique, por favor, o Nickname fornecido no questionário pré-uso.
2. Durante quantos dias procedeu à aplicação do gel "anti-ageing" em estudo?
3. Indique o seu grau de satisfação com a performance do gel "anti-ageing" de produtos naturais que experimentou, quanto aos seguintes aspectos: *

	Totalmente insatisfeito	Insatisfeito	Indiferente	Satisfeito	Totalmente satisfeito
Hidratação da pele					
Firmeza da pele					
Elasticidade da pele					
Redução de rugas					
Redução de manchas					
Suavidade da pele					
Luminosidade da pele					
Aspecto geral da pele					
Espalhabilidade					
Facilidade de aplicação					
Fragância					
Consistência do gel					

4. Recomendaria a compra deste produto a um amigo? *

Sim

Não

Talvez

Explique os motivos para tal:

5. Estaria disposto a comprar este produto? *

Sim

Não

Talvez

Explique os motivos para tal

6. Se sim, quanto estaria disposto a pagar por uma embalagem de 50ml de produto?

Muito obrigada pela tua participação neste estudo!

7. Tem alguma sugestão/comentário que possa contribuir para a sua melhoria?

Tabela 20: Características sociodemográficas

Características sociodemográficas		%(n)
Sexo	Feminino	80%(16)
	Masculino	20%(4)
Estado Civil	Solteiro(a)	90%(18)
	Casado (a) ou em união de facto	5%(1)
	Viúvo(a)	5%(1)
	Separado(a)/Divorciado(a)	0
Rendimento económico	Menos de 500 €	10%(2)
	500 a 1000 €	45%(9)
	1000 a 3000 €	45%(9)
	3000 a 5000 €	0
	Mais de 5000 €	0
Idade	18-29	45%(9)
	30-39	40%(8)
	40-49	10%(2)
	50-59	5%(1)
	≥60	0
Habilitações literárias	<9ºano	0
	9ºano	5%(1)
	Ensino Secundário	5%(1)
	Bacharelato ou curso tecnológico pós-secundário	10%(2)
	Ensino Superior	80%(16)
Local de residência	Portugal zona urbana	70%(14)
	Portugal zona rural	30%(6)
Situação profissional	Desempregado	5%(1)
	Estudante	55%(11)
	Trabalhador por conta de outrem	35%(7)
	Trabalhador por conta própria	5%(1)
	Reformado/Pensionista	0
Profissão	Estudante	55%(11)
	Outra	45%(9)
Agregado familiar	1	5%(1)
	2	0
	3	55%(11)
	4	40%(8)

	% (n)	
Peso (Kg)	≤50	0
	50-60	35%(7)
	60-70	50%(10)
	≥70	15%(3)
Altura (cm)	≤150	0
	150-160	60%(12)
	160-170	30%(6)
	≥170	10%(2)
Problemas/doenças de pele	Psoríase	0
	Rosácea	5%(1)
	Acne	20%(4)
	Dermatite atópica	5%(1)
	Não tenho qualquer problema de pele	70%(14)